

THAMIRIS MAGALHÃES GIMENEZ

Efeitos dos fatores de transcrição FOX (Forkhead-Box) na resistência ao tratamento com quimioterápicos nos pacientes com neuroblastoma

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Estela  
Maria Novak

São Paulo

2021

THAMIRIS MAGALHÃES GIMENEZ

Efeitos dos fatores de transcrição FOX (Forkhead-Box) na resistência ao tratamento com quimioterápicos nos pacientes com neuroblastoma

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Estela  
Maria Novak

São Paulo

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gimenez, Thamiris Magalhães  
Efeitos dos fatores de transcrição FOX (Forkhead-  
Box) na resistência ao tratamento com  
quimioterápicos nos pacientes com neuroblastoma  
/ Thamiris Magalhães Gimenez. -- São Paulo, 2021.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Pediatria.  
Orientadora: Estela Maria Novak.

Descritores: 1.Neuroblastoma 2.Fatores de  
transcrição 3.Resistência a medicamentos  
antineoplásicos

USP/FM/DBD-356/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*Dedicado a pequena cientista Sophie*

## **Agradecimentos**

A Dra. Estela Maria Novak por me dar a oportunidade de realizar este trabalho e acreditar no meu potencial. Pela orientação, dedicação e principalmente pela inspiração. Obrigada por sempre me incentivar nos momentos mais difíceis e despertar o “bichinho” da ciência que existia dentro de mim. Mais do que um modelo profissional, um modelo de pessoa.

A minha pequena cientista Sophia, que sempre me enxergou como exemplo, e por ela eu nunca desisti. Minha maior incentivadora, sempre doce e alegre.

Ao Raphael, meu companheiro e meu melhor amigo acima de tudo, que me amparou nos momentos de dificuldade e desespero, que encheu meus dias de alegria com seu bom humor e luz que são contagiantes. Sem você, eu não teria chegado até aqui.

A toda minha família: meu pai Antonio Carlos, pela base dos meus estudos e exemplo de ética e caráter. Meus tios Liliane e Mauro, que me acolheram como filha e me deram um suporte essencial. Minha madrinha Luciane, meu maior exemplo de dedicação e sucesso. Meus avós, pelo amor incondicional. Meus tios Eduardo e Tatiane, pelos preciosos momentos de amor e carinho.

As minhas parceiras de laboratório Alana, pelas conversas, risadas, almoços e muitos chocolates que salvaram minhas tardes; e Vanessa sempre muito prestativa e disposta a ajudar. Muito obrigada pela amizade de vocês.

Ao Dr Vicente Odone, pelo suporte e acolhimento. Um exemplo de profissional e ser humano. Seu amor e dedicação pelos cuidados com as crianças nos inspiram e nos fazem querer avançar sempre mais. Sem a sua ajuda, todo esse trabalho não teria sido possível. Muito obrigada!

A Dra Nathalia Halley e a Dra Carolina Camargo Vince, muito obrigada pela disposição em nos ajudar com a parte clínica dos trabalhos e também pela amizade. É um privilégio poder trabalhar ao lado de pessoas como vocês.

A todos os colegas do LIM 36, por todo apoio e troca de conhecimento.

Ao Instituto Stella Demarco, em especial ao senhor Luis Roberto Demarco e ao Ricardo Nunes de Oliveira, sempre atenciosos e dispostos em ajudar. E também a SH Formas, em especial a senhora Ruth Katz de Castro Gelbrand. Pelo incentivo e apoio no desenvolvimento das nossas atividades de pesquisa.

Ao Dr Antonio Lerario e a Anna Benedetti, pela ajuda com as análises de bioinformática.

A Fundação Criança pelo apoio financeiro, contribuindo sempre pelos avanços na busca de melhores condições para as crianças atendidas no ITACI.

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

A todas as crianças e famílias que aceitaram participar deste estudo.

## SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

### 1.0 – INTRODUÇÃO 01

1.1 – NEUROBLASTOMA.....01

1.2 – ESTADIAMENTO.....02

1.3 - RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA EM NEUROBLASTOMA.....04

1.4 - FAMÍLIA DOS FORKHEAD-BOX (*FOX*).....06

1.5 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXMI*.....07

1.5.1 - Estrutura *FOXMI*.....08

1.6 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXO3a*.....10

1.6.1 - MECANISMO DE AÇÃO DO FOXO3 NA APOPTOSE E PARADA DO CICLO CELULAR.....10

1.6.1.1 – Apoptose.....10

1.6.1.2 - Parada do ciclo celular.....11

1.6.2 - *FOXO3* E A RESPOSTA AOS TRATAMENTOS COM QUIMIOTERÁPICOS.....12

1.7 - REGULAÇÃO GÊNICA ATRAVÉS DA COMPETIÇÃO DO *FOXO3* E *FOXMI* PELOS MESMO SÍTIO DE LIGAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA.....15

1.8 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXK2*.....16

1.9 – A MODELAGEM DA ESTRUTURA 3D DA PROTEÍNA.....17

**2.0 HIPÓTESE.....17**

**3.0 – JUSTIFICATIVA.....18**

<b>4.0 - OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>18</b>
4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>5.0 - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 - DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	19
5.2 – CASUÍSTICA.....	19
5.3 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	21
5.4 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	21
5.5 - TRATAMENTO DOS PACIENTES.....	22
5.6 - AMOSTRAS DOS TUMORES DOS PACIENTES ESTUDADOS.....	22
5.7 - Extração de DNA.....	22
5.7.1 - Extração DNA genômico de sangue periférico.....	22
5.7.2 - Extração do DNA genômico de tumores.....	23
5.7.3 - Extração do DNA genômico de tumores preservados em parafina – FFPE .....	23
5.8 - Quantificação do DNA genômico.....	24
5.9 - Sequenciamento Completo do Exoma.....	24
5.9.1 - Preparação da Biblioteca.....	24
5.9.1 - Preparação da Biblioteca.....	25
5.9.3 - Sequenciamento na Plataforma Illumina HiSeq 2500.....	25
5.9.4 - Análise da Qualidade dos Reads e Filtragem.....	26
5.9.5 - Análise dos dados – Bioinformática.....	26
5.10 EXTRAÇÃO DE RNA TUMORAL.....	27
5.10.1 - Quantificação RNA.....	27
5.10.2 – Análise de expressão de RNA m por PCR em tempo real.....	28
5.11 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS <i>FOX</i> .....	28
5.11.1 - Extração de proteína de tumores.....	28
5.11.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	29
5.11.3 - Western Blotting.....	29



5.12 - Modelagem 3D e cálculos de estabilidade.....	30
<b>6.0 – RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
6.1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO.....	31
<b>A-) FOXM1</b>	
6.2 - MUTAÇÕES DO GENE <i>FOXM1B</i> IDENTIFICADAS NOS PACIENTES NEUROBLASTOMA <i>MYCN</i> NÃO AMPLIFICADOS E RECIDIVADOS.....	33
6.3 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÕES DOS GENE <i>FOXM1B</i> .....	37
6.3.1 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAm DO GENE <i>FOXM1B</i> MUTADO.....	37
6.4 - SUBLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FOXM1 MUTADAS.....	38
6.5 - ANÁLISES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL2 E BIRC5/SURVIVIN NAS MUTAÇÕES FOXM1.....	40
6.6 - ANÁLISE DA ESTRUTURA PROTEICA DAS MUTAÇÕES DE FOXM1B..	42
<b>B-) FOXK2</b>	
6.7 - MUTAÇÕES DO <i>FOXK2</i> NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA NÃO AMPLIFICADO RECIDIVADOS.....	44
6.8 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÃO DOS GENE <i>FOXK2</i> .....	49
6.8.1 - Avaliação da expressão de RNAm do gene <i>FOXK2</i> mutado.....	49
6.9 - SUBLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FOXK2 MUTADAS.....	50
6.10 - ANÁLISE FUNCIONAL DE FOXK2.....	52
6.11 - ANÁLISE ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS MUTADAS DO FOXK2.....	53
6.11.1 - LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA FOXK2.....	53

6.11.2 - MODELAGEM 3D IN SILICO DE FOXK2 DAS MUTAÇÕES DE FOXO3 E AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DAS MUTAÇÕES.....	55
---	----

### **C) *FOXO3A***

6.12 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM <i>FOXO3A</i> NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA.....	60
--	----

6.13 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÕES DO GENE <i>FOXO3A</i> .....	63
---	----

6.13.1 - Avaliação da expressão de RNAm do gene <i>FOXO3a</i> mutado encontrado nos pacientes em estudo.....	63
--	----

6.14 - ANÁLISE DA SUB-LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS FOXO3.....	64
--	----

6.15 - ANÁLISE DAS MUTAÇÕES FOXO3 NA REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRÓ- APOPTÓTICAS.....	66
--	----

6.16 - ANÁLISE ESTRUTURAL DAS MUTAÇÕES DA PROTEINA FOXO3.....	68
---	----

6.16.1 - LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NA ESTRUTURA DE FOXO3.....	68
--	----

6.16.2 - MODELAGEM 3D IN SILICO DE FOXO3 DAS MUTAÇÕES DE FOXO3 E AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DAS MUTAÇÕES.....	69
---	----

<b>7.0 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
-----------------------------	-----------

<b>8.0 - CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
-----------------------------	-----------

<b>9.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
--	-----------

<b>ANEXO I.....</b>	<b>85</b>
---------------------	-----------

## **Lista de abreviaturas**

NB – neuroblastoma

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INSS – Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma

INRGSS – Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco

IDRFs – Fatores de Risco Definidos por Imagem

FOX – Forkhead Box

FOXM1 – Forkhead Box M1

FOKK2 – Forkhead Box K2

FOXO3 - Forkhead Box O3

FHRE – elemento de resposta forkhead

RNA-seq – Sequenciamento de RNA

RT-PCR – PCR em tempo real

FFPE – tecido embebido em parafina e fixado em formol

NGS – sequenciamento de última geração

SNP – polimorfismos de nucleotídeo único

COSMIC – Catálogo de Mutações Somáticas em Câncer

SIFT - *Sorting Intolerant From Tolerant*.

PolyPhen2 – *Polimorphism Phenotyping*.

PDB - *Protein Data Bank*

NRD – Domínio repressor N-terminal

FKH - *forkhead domain*

FHA - domínio *forkhead* associado

TAD – domínio de transativação

NSL - sequencia de localização nuclear

NES - sequencia de exportação nuclear

CR2 - região conservada 2

RNAm – RNA mensageiro

### **Lista de figuras**

**Figura 1.** Estrutura genômica e isoformas codificadoras em *FOXMI*.

**Figura 2.** Controle do fator de transcrição *FOXO3A* pelas vias PI3K-AKT, JNK e Mst1.

**Figura 3.** Ativação e repressão do *FOXO3A* e *FOXMI* através das vias de sinalização.

**Figura 4.** Mecanismo pelo qual *FOXO3A* antagoniza com *FOXMI*.

**Figura 5.** Expressão relativa de mRNA de *FOXMI* nos tumores de pacientes com NB.

**Figura 6.** Identificação da sublocalização e concentração das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXMI*.

**Figura 7.** Análises de expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e BIRC5/Survivin

**Figura 8.** Esquema e alinhamento das sequências normal e mutadas de FOXMI identificadas em pacientes de NB *MYCN* não amplificado

**Figura 9.** Análise de expressão de mRNA de *FOXK2* nos tecidos tumorais de pacientes de NB.

**Figura 10.** Identificação da sublocalização nuclear e citoplasmática das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXK2*

**Figura 11.** Análises de expressão por western blot de FOXO3.

**Figura 12.** Esquema e alinhamento das sequências normal e mutadas de FOXK2 identificadas em pacientes de NB *MYCN* não amplificado

**Figura 13.** Modelagem estrutural na mutação R58H na região FHA de FOXK2.

**Figura 14.** Modelagem estrutural da mutação R333W na região do domínio FKH de FOXK2.

**Figura 15.** Análises de expressão de RNAm de *FOXO3a* nos pacientes de NB.

**Figura 16.** Identificação da sublocalização das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXO3a*.

**Figura 17.** Análise da expressão proteica pró apoptóticas de Bim, P27kip1 e p21 através de western blot.

**Figura 18.** Estrutura da proteína FOXO3 com a presença das mutações identificadas em pacientes de NB.

**Figura 19.** Modelagem estrutural da mutação N213S na região de domínio forkhead de FOXO3.

**Figura 20.** Modelagem estrutural da mutação S482N na região de domínio KIX de FOXO3.

## RESUMO

Gimenez TM. Efeitos dos fatores de transcrição FOX (Forkhead-box) na resistência ao tratamento com quimioterápicos nos pacientes com neuroblastoma [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021

Neuroblastoma (NB) é o tumor sólido extra craniano mais comum da faixa etária pediátrica, derivado do sistema nervoso simpático periférico. Apesar de uma melhora na resposta ao tratamento baseada na estratificação de risco, em pacientes com a forma mais agressiva da doença, a taxa de sobrevida é inferior a 50%. Sendo assim, novas estratégias que previnam a resistência ao tratamento são necessárias. Estudos recentes demonstraram o envolvimento de alguns membros da família dos genes *FOX*, como *FOXO3*, *FOXM1* e *FOXK2* com a resistência ou sensibilidade de alguns quimioterápicos convencionais (cisplatina, epirubicina e doxorubicina). Neste estudo identificamos em 10 pacientes com *MYCN* não amplificado, mutações em *FOXM1*, *FOXK2*, *FOXO3* por análise de sequenciamento de exoma completo (NGS). Todos esses pacientes recidivaram e foram a óbito. As mutações do oncogene *FOXM1* levaram ao aumento de expressão nuclear nos tumores desses pacientes, ativando a transcrição de seus dois alvos anti – apoptóticos, *BCL2* e *BIRC5/Survivin* diretamente relacionados com a resistência ao tratamento com os quimioterápicos doxorubicina e carboplatina. Nos *FOX* supressores tumorais, *FOXK2* e *FOXO3*, as mutações diminuíram a expressão na fração nuclear em relação a fração citoplasmática levando-os a degradação e diminuindo a regulação de seus alvos pró apoptóticos. As mutações em *FOXK2* diminuíram a expressão de seu alvo transcricional apoptótico *FOXO3*. As mutações em *FOXO3* diminuíram a expressão de seus alvos *Bim*, *p27<sup>kip1</sup>* e *p21*.

Concluindo os nossos resultados demonstraram que as mutações identificadas em FOXM1, FOXK2 e FOXO3 estão associadas a resistência ao tratamento observada nesses pacientes. Estes dados podem contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que melhorem a resposta ao tratamento dos pacientes com neuroblastoma MYCN não amplificado.

Descritores: neuroblastoma, MYCN não amplificado, fatores de transcrição, resistência a quimioterapia, alterações genéticas, variantes FOXM1, variantes FOXO3, variantes FOXK2.

## ABSTRACT

Gimenez TM. Effects of FOX transcription factors on chemotherapy treatment resistance in neuroblastoma patients. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Neuroblastoma (NB), is the most common extracranial solid tumor of the childhood, derived from the peripheral nervous system. *Although* risk-based treatment approaches have led to improvements in outcomes for children with neuroblastoma, approximately 50% of neuroblastoma patients have a clinically aggressive form of the disease. Therefore, new strategies are needed to simplify *treatment and* overcome *resistance*. Recent studies have demonstrated the involvement of some FOX transcriptional family members, such *FOXO3*, *FOXMI* and *FOXK2* with resistance or sensibility to cisplatin, epirubicin and doxorubicin. We identified in 10 patients with MYCN non amplified, mutation in *FOXMI*, *FOXK2* and *FOXO3* using whole exome sequencing analysis (NGS). All these patients relapsed and died. Mutation of FOXMI, a potent *oncogenic* factor, localized in nucleus led increase of expression and activation of two anti-apoptotic targets, BCL2 and BIRC5/Survivin on these patients tumors. BCL2 and BIRC5/Survivin are directly related to drugs resistance of doxorubicin and carboplatin treatment. *FOXK2* and *FOXO3* mutations decreased expression in nuclear fraction when compared to cytoplasmatic fraction. This event led to decreasing of proapoptotic targets. *FOXK2* mutations decreased expression of its transcriptional apoptotic target FOXO3. *FOXO3* mutations decreased expression of its targets Bim, p27<sup>kip1</sup> e p21. In conclusion, our results have demonstrated that *FOXMI*, *FOXK2* and *FOXO3* mutations are associated to treatment resistance observed in this patients and



these data may contribute to development of new therapeutic targets that improve the response to treatment of neuroblastoma MYCN non amplified patients.

Descriptors: Neuroblastoma, MYCN non-amplified, transcription factors, chemotherapy resistance, genetic alterations, FOXM1 variants, FOXO3 variants, FOXK2 variants.

## 1.0 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - NEUROBLASTOMA

O Neuroblastoma (NB) é o tumor sólido mais comum diagnosticado nos primeiros anos de vida (Maris, 2007). Origina-se a partir das células da crista neural precursoras do sistema nervoso periférico, que se diferenciam para formar as células simpáticas ganglionares ou as células cromafins da medula adrenal (células secretoras de catecolaminas da medula adrenal) (L'Abbate, A, 2014).

Este tumor pode surgir em qualquer ponto do neuro eixo, mas cerca de metade de todos os neuroblastomas tem origem intra-abdominal com aproximadamente 1/3 (65%) dos casos primários de adrenal (Odone et al 1983; Brodeur et al.2006) e frequentemente se apresenta com metástases ao diagnóstico (Maris, 2010). Outros sítios comuns onde estes tumores podem se desenvolver são: região cervical, tórax ou pélvis (Brodeur et al.2006).

Estima-se que a incidência anual no Brasil alcança por volta de 7,3 casos/milhão, com cerca de 12.600 novos casos por ano, sendo que as regiões Sudeste e Nordeste possuem a maior prevalência seguidas pelas regiões Sul, Centro-Oeste e Norte com discreta predominância em crianças do sexo masculino (INCA, 2017).

Os NB apresentam características clínicas heterogêneas que variam da regressão espontânea ou diferenciação das células em ganglioneuroma, para uma rápida progressão apesar de tratamentos multimodais mais agressivos. Esta propensão depende de diversos fatores como as características biológicas do tumor, perfil genômico, idade do paciente, histologia do tumor, *status* de amplificação do gene *MYCN*, grau de diferenciação celular, ploidia e estadiamento (Maris et al., 2007).

Atualmente, as pesquisas em NB se voltam para o aprofundamento do conhecimento das bases genéticas e epigenéticas do desenvolvimento dessa doença.

## **1.2 - ESTADIAMENTO**

Baseado em muitos estudos clínicos, histológicos e genéticos, os neuroblastomas foram estratificados dentro de categorias de risco (baixo, intermediário e alto risco) que auxiliam no prognóstico e tratamento (Cohn, 2009).

Sendo assim foi estabelecido o Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS), que utiliza informações baseadas na extensão da excisão cirúrgica e metástase ao diagnóstico classificando os tumores em 1 e 2 como baixo risco e em 3 e 4 como tumores de alto risco (Tabela 1). Nos casos de estádios 1 e 2, é realizada somente a intervenção cirúrgica que retira toda a lesão primária sem a utilização de tratamento com quimioterápicos. Também pode ocorrer em alguns casos somente acompanhamento clínico pois esses tumores tendem a regredir espontaneamente ou se diferenciarem em ganglioneuromas benignos. Nos pacientes de estádios 3 e 4, na maioria das vezes, o tumor é irresssecável. Nestes casos, se torna necessário o tratamento com agentes quimioterápicos e em alguns casos, radioterápicos, como descrito por Brodeur et al, 1993.

**Tabela 1. Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS)**

<b>Estádio 1</b>	o tumor localizado, possível de ser totalmente removido por cirurgia; presença de células de NB dentro dos gânglios linfáticos intratumorais, porém sem acometimento de linfonodos fora do tumor.
<b>Estádio 2A</b>	tumor localizado, com excisão incompleta grosseira; linfonodos não-aderentes, ipsilaterais negativos para tumor microscopicamente.
<b>Estádio 2B</b>	tumor localizado com ou sem excisão grosseiramente completa, com linfonodos não aderentes ipsilaterais, positivos para tumor. Linfonodos contra-laterais aumentados devem ser negativos microscopicamente.
<b>Estádio 3</b>	tumor que ultrapassa a linha média irressecável, com ou sem envolvimento de linfonodos; ou tumor unilateral localizado, com envolvimento de linfonodos contralaterais, ou tumor da linha média, com extensão bilateral por infiltração (irressecável) ou por envolvimento de linfonodos.
<b>Estádio 4</b>	qualquer tumor primário com disseminação a linfonodos distantes, osso, medula óssea, fígado, pele, e/ou outros órgãos (exceto como definido no estágio 4S).
<b>Estádio 4s</b>	tumor localizado (1, 2A ou 2B) limitado a lactentes, 1 ano de idade, com metástases limitadas a pele, fígado e medula óssea (menos de 10% de células na medula são cancerosas).

Além do INSS, outro critério de classificação utilizado é o Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRGSS) (Tabela 2) (Cohn et al., 2009), que utiliza os Fatores de Risco Definidos por Imagens (IDRFs) para definir a complexidade da retirada do tumor, como a localização do tumor muito próximo de um órgão vital ou de vasos sanguíneos importantes.

**Tabela 2. Estadiamento de Neuroblastoma para Grupos de Risco (INRGSS).**

L1	Tumor localizado, sem envolvimento de estruturas vitais definido por IDRFs e confinado a um compartimento (pescoço, tórax, abdome, pelve).
L2	Tumor loco-regional com a presença de um ou mais IDRFs
M	Presença de metástase
MS	Doença metastática em crianças menores de 18 meses, com metástases confinadas em pele, fígado e medula óssea

O estadiamento da doença é combinado com outros fatores prognósticos como idade ao diagnóstico, características histopatológicas (classificação de Shimada), alterações cromossômicas, amplificação do gene *MYCN* e ploidia do DNA (Maris et al., 2007).

### **1.3 - RESISTÊNCIA A QUIMIOTERAPIA EM NEUROBLASTOMA.**

A resistência a quimioterápicos é um problema comum no tratamento de câncer de uma maneira geral, estima-se que seja o motivo do fracasso terapêutico em 90% dos pacientes com câncer metastático (Longley et al., 2005).

A resistência pode ocorrer por fatores intrínsecos ou de maneira adquirida. Os fatores intrínsecos são características que fazem a mediação da resistência que já estão presentes na célula tumoral desde o desenvolvimento do câncer. Enquanto a resistência que ocorre de forma adquirida, ocorre nas células que inicialmente eram sensíveis ao tratamento, porém sofreram mutações que favoreceram a ativação de vias de sinalizações compensatórias que lhes conferiram vantagens proliferativas fazendo com que não respondam mais ao tratamento (Holohan et al., 2013).

O neuroblastoma é um câncer quimiossensível que responde ao tratamento com vários agentes quimioterápicos. Em crianças menores de 18 meses com doença localizada, cirurgia e quimioterapia são na maioria das vezes curativas. Entretanto, para pacientes maiores de um ano e meio de idade e com doença em estádios avançados, utilizam-se terapias empregando vários agentes para induzir remissões completa ou parcial. Porém frequentemente não são eficazes e se desconhece uma opção terapêutica eficaz nesses casos.

Apesar da utilização de esquemas terapêuticos conhecidos, conseguindo-se alcançar remissões completas e de maior duração, a taxa de sobrevida final continua muito baixa.

A resistência aos quimioterápicos como topotecano (inibidor da enzima DNA topoisomerase, tipo 1) (Nakashio et al., 2012) carboplatina (intercala-se entre os nucleotídeos no DNA) (Natarajan et al., 1999), etoposideo (inibidor da enzima topoisomerase II) (Knox et al., 1986) e doxorrubicina (intercala-se entre os nucleotídeos no DNA) (Laginha et al., 2005) manifestada por alguns pacientes durante o

tratamento de neuroblastoma com os protocolos de quimioterapias convencionais, podem estar associadas ao silenciamento ou ativação dos membros da família *FOX*.

#### **1.4 - FAMÍLIA DOS FORKHEAD-BOX (*FOX*).**

Os membros da família *FOX* influenciam o ciclo celular, proliferação e diferenciação, reparo de dano do DNA, metabolismo, angiogênese, destino celular e senescência (Lam et al., 2014). As proteínas *FOX* são associadas com a iniciação do câncer, invasão, progressão e resistência a quimioterápicos quando ocorrem alterações que desregulam a expressão.

Como os fatores de transcrição da família *FOX* regulam genes de várias vias envolvidas na proliferação e apoptose, angiogênese, migração, invasão celular, bem como na reparação do DNA através da ativação dos genes alvos (Kato et al., 2013), podem afetar a resposta celular ao tratamento com quimioterápicos, tornando-se importantes alvos terapêuticos e biomarcadores da doença.

Estas proteínas regulatórias formam uma grande família de genes com domínio de ligação ao DNA altamente conservados de 100 amino ácidos (Wijchers et al., 2006).

O domínio *FOX* é também conhecido como domínio “hélice-alado” porque a sua estrutura tridimensional consiste em duas voltas de asa, e três alfa-hélices (Kato et al., 2013). A família *FOX* consiste em 50 membros no genoma humano, 2 pseudogenes (*FOXO1B* e *FOXOB3B*) e 19 subfamílias (Lam et al.2013).

As proteínas *FOX* estão envolvidas em múltiplas vias de sinalização que controlam a proliferação celular, a apoptose, a sobrevivência, e funções imunes em resposta a estímulos externos e internos em diversos tumores (Kato, et al., 2013).

Os membros da família *FOX* são frequentemente associados com doenças congênitas ou hereditárias (*FOXC1*, *FOXC2*, *FOXE1*, *FOXE3*, *FOXL2*, *FOXN1*, *FOXP2* e *FOXP3*) e na carcinogênese como oncogenes, *FOXMI*, *FOXO1* e genes supressores de tumor *FOXO3* e *FOXK2* (Katoh et al 2013).

### **1.5 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXMI*.**

*FOXMI* é o principal regulador do ciclo celular e sua expressão elevada correlaciona-se com a superexpressão de diversos oncogenes e pior prognóstico em pacientes de diversos tipos de câncer. O aumento da expressão da *FOXMI* está associado com vários fatores incluindo a amplificação dos genes *N-MYC*, *TRKB*, perda do cromossomo 1p e com pior prognóstico (Lam et al 2013; Katoh et al 2013). Pelo menos em parte, o *FOXMI* confere resistência as drogas genotóxicas e a terapia de radiação regulando os genes de reparo de danos no DNA, particularmente no processo de recombinação homóloga, incluindo *XRCC1*, *BRCA2*, *CHEK1* (também conhecido como *CHK1*), *RAD51* e *BRIP1* (Lam et al 2013).

Outros estudos demonstraram que o *FOXMI* atua na manutenção do estado indiferenciado das células tumorais aumentando a atividade tumorigênica das células do neuroblastoma (Wang et al, 2011). Wang et al, 2011 demonstraram que *FOXMI* diretamente ativa a expressão de *SOX2* e *BMI-1*, genes responsáveis pela proliferação celular em neuroblastomas.

Além disso, *FOXMI* diminui a ativação da apoptose através da regulação de oncogenes. Um desses oncogenes é o *Bcl-2*, um gene anti-apoptótico pertencente a família Bcl2. *FOXMI* contribui para a modulação da apoptose, induzida por dano ao DNA, por regular diretamente o controle da atividade transcricional de *Bcl-2* (Halasi et al., 2012). A proteína *Bcl-2* previne a apoptose por sequestrar as caspases e também por



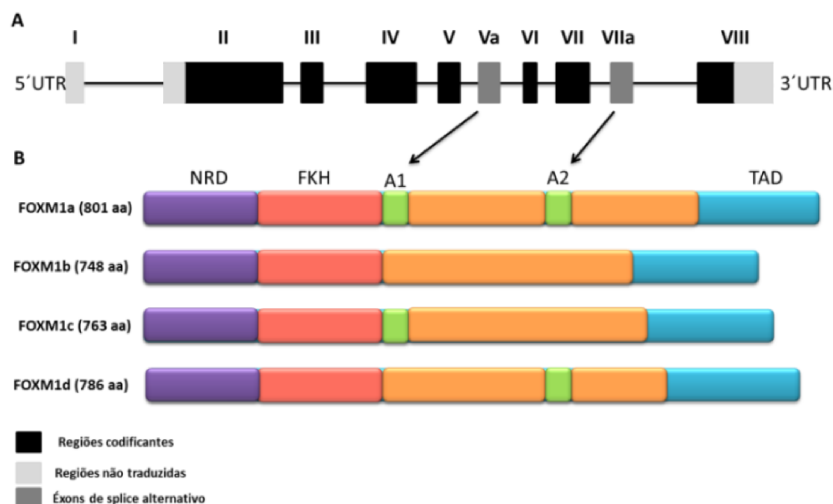
prevenir a liberação dos fatores apoptogênicos mitocondriais como o citocromo c dentro do citoplasma (Tsujimoto, 1998).

### 1.5.1 - Estrutura *FOXM1*.

O gene *FOXM1* humano consiste em 10 éxons, dois deles (Va e VIIa) são expressos alternativamente resultando em 4 isoformas praticamente idênticas, *FOXM1a*, *FOXM1b*, *FOXM1c* e *FOXM1d*. Dentre essas isoformas, apenas a *FOXM1a* não possui atividade de transativação, este possui os dois éxons (Va e VIIa). *FOXM1b* não possui nenhum desses éxons, *FOXM1c* possui apenas o Va e o *FOXM1d* somente o VIIa (Figura 1). Foi demonstrado que o éxon VIIa leva à inativação do domínio de transativação (TAD) na isoforma *FOXM1a* justificando sua inativação transcricional, enquanto as isoformas *FOXM1b* e *FOXM1c* são transcricionalmente ativas e capazes de ativar a expressão de seus genes alvos através de diferentes mecanismos (Ye et al., 1997).

Estudos demonstraram que *FOXM1a* pode ser um regulador negativo das outras isoformas (Laoukili et al. 2007), enquanto *FOXM1b* e *FOXM1c* podem regular oncogenes importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer (Klinhom-on et al., 2021).

A isoforma *FOXM1b* é a predominantemente expressa em câncer com maior potencial de transformação de células normais em células malignas e funcionalmente mais ativa (Lam et al., 2013).



(Adaptado Huang et al., 2014)

**Figura 1. Estrutura genômica e isoformas codificadoras em *FOXM1*.** A-) Estutura genômica de *FOXM1*. B-) Possíveis isoformas de *FOXM1*. NRD: domínio repressor N-terminal; FKH: domínio forkhead de ligação ao DNA; TAD: domínio de transativação.

A proteína FOXM1 contém 3 domínios principais: Domínio *Forkhead* (FKH), domínio de transativação (TAD) e domínio repressor do N-terminal (NRD) (figura 1). O domínio FKH é o domínio mais bem conservado em todos os tipos de FOX, responsável pela ligação ao DNA de seus alvos transcripcionais (Littler et al., 2010). O TAD dos fatores de transcrição é responsável pelo recrutamento da maquinaria transcripcional ao promotor alvo (Ptashne e Gann, 1997). Outro domínio comum em diversos fatores de transcrição é o NRD, responsável por se ligar e inibir o TAD (Park et al., 2008).

## **1.6 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXO3a*.**

*FOXO3a* é o fator de transcrição central que media diversos processos fisiológicos e patológicos por induzir genes envolvidos na apoptose, proliferação, progressão do ciclo celular, sobrevivência e dano ao DNA (Lam et al., 2013). Por ter um papel importante em todos esses processos, a desregulação da expressão de *FOXO3a* pode levar ao desenvolvimento de várias doenças, como o câncer. Em câncer de mama, foi mostrado que *FOXO3a* é capaz de inibir a tumorigênese (Zou et al., 2008), além disso a função de supressor tumoral é bem descrita em outros tipos de câncer.

Quando ativado *FOXO3a* pode aumentar a expressão de genes como *BIM* e *TRAIL*, para induzir a apoptose, ou p27, p21 e ciclina D para inibir o ciclo celular (Zhang et al.2011).

### **1.6.1 - MECANISMO DE AÇÃO DO FOXO3 NA APOPTOSE E PARADA DO CICLO CELULAR**

#### **1.6.1.1 - Apoptose**

A superexpressão de *FOXO3a* induz a apoptose em diversos tipos celulares. Diversos estudos o classificam com funções de gene supressor de tumor e o sugerem como alvo direto e indireto para terapia do câncer (Liu et al., 2018).

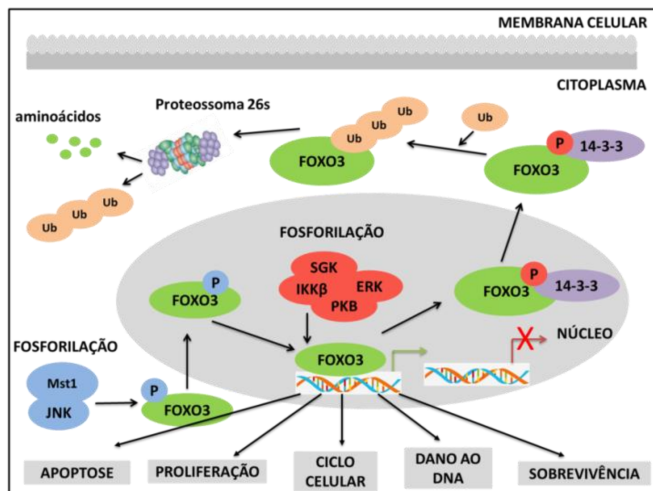
Em células de NB, a ativação de *FOXO3a* promove a liberação do citocromo C e a apoptose dependente de caspase. *FOXO3a* induz *TRAIL* e as proteínas BH3-only, Noxa e Bim promovendo a apoptose por via intrínseca e extrínseca (Obexer et al., 2007).

### 1.6.1.2 - Parada do ciclo celular

A proteína P27<sup>kip1</sup> faz parte da família de inibidores do ciclo celular CDK, (Cip/Kip). Proteínas dessa família inibem as atividades quinases das ciclinas e são consideradas CDKIs (inibidores de CDKs) universais, por inibirem a atividade quinase de diversos complexos com as ciclinas A, E, D1 e D3 e as CDKs (Xiong et al., 1993). O aumento de expressão de P27<sup>kip1</sup> regulado por *FOXO3a* auxilia a parada do ciclo celular em resposta de dano ao DNA.

Outro importante alvo de *FOXO3a* é a proteína p21, assim como o P27<sup>kip1</sup>, pertence a família de proteínas inibidoras de CDK (Cip/Kip). Em resposta a TGFβ interage com o domínio de ligação ao DNA de *FOXO3a*, formando um complexo que induz a parada do ciclo celular mediada por p21 na transição G1/S (Liu et al., 2018).

Normalmente FOXO3 está presente no núcleo de células quiescentes, onde atua como regulador da transcrição gênica. Na presença de fatores de crescimento celular, o FOXO3 transloca para o citoplasma e é degradado pela via de ubiquitina-proteossoma (Figura 2). Na ausência de fatores de crescimento como PDGF e IGF-1, o fator de transcrição FOXO3 permanece no núcleo (Essaghir et al., 2009), e regula a expressão de genes envolvidos na parada do ciclo celular, resistência ao estresse, apoptose e resistência a quimioterápicos (Greer, 2005).



**Figura 2. Controle do fator de transcrição *FOXO3a* pelas vias PI3K-AKT, JNK e Mst1.** O *FOXO3a* atua na transcrição dos genes que promovem a apoptose (Bim, FasL, and TRAIL) e a parada do ciclo celular (p27, p21 e c-MYC). O mecanismo de inibição da proteína regulatória FOXO3, se inicia quando os fatores de crescimento ligam se aos seus respectivos receptores e ativam as vias de sinalização (ERK, AKT e IKK $\beta$ ) fosforilando através da enzima fosfatidilinositol-3-quinase a proteína FOXO3. Esta proteína fosforilada é exportada para o citoplasma sofrendo uma ubiquinação e degradação no proteossoma 26S.

### 1.6.2 - *FOXO3* E A RESPOSTA AOS TRATAMENTOS COM QUIMIOTERÁPICOS.

A resistência ou quimiosensibilidade ao tratamento com quimioterápicos convencionais como: vincristina, doxorrubicina, melfalan, imidazol-carboxamida, peptichemio, teniposídeo, lapatinibe, gefitinibe, imatinibe, cisplatina e uma variedade de fármacos anti-neoplásicos também dependem da ativação *FOXO3a* (Lam et al 2013).

A cisplatina liga-se ao DNA e provoca a formação de um complexo DNA-platina, originando ligações intra e intercadeias que induzem alterações estruturais do DNA. O seu efeito citotóxico causa a inibição da transcrição e replicação, induzindo a apoptose. A doxorubicina e epirubicina são exemplos antibióticos antraciclina de

intercalação que causam danos ao DNA e morte celular. A doxorrubicina e a epirrubicina, bem como a cisplatina, diminuem a regulação da *FOXMI*. A doxorrubicina também ativa a via p38 dependente da fosforilação da *MAPK* e translocação nuclear de *FOXO3a* (Lam et al., 2013).

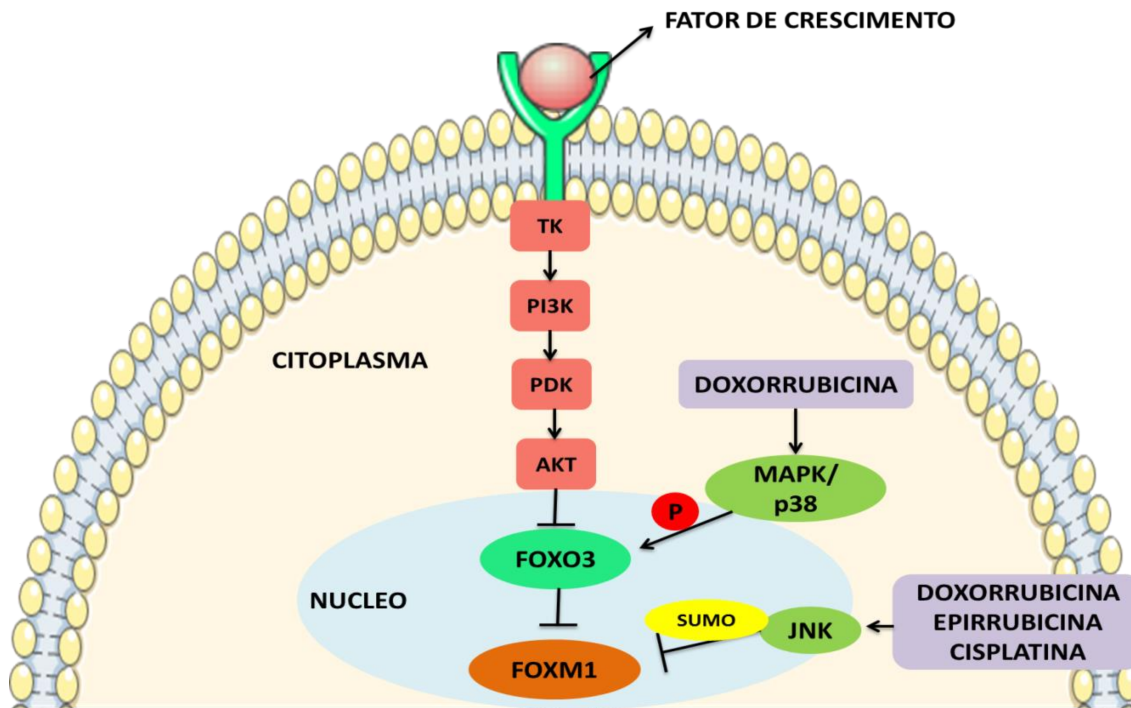
O mecanismo pelo qual ocorre a resistência aos quimioterápicos ainda não está completamente esclarecido, mas alguns estudos demonstram que o aumento da atividade da via de sinalização PI3K/AKT, fenômeno que ocorre em quase todos os aspectos da fisiologia tumoral, como no ciclo celular, pode ter uma grande participação com a quimioresistência. (Westfall et al., 2005).

Em NB, o principal mecanismo de inativação de FOXO3a em pacientes com tumores agressivos é através da via de PI3K/AKT (Santo et al., 2013). A fosforilação do *FOXO3a* mediada pela via de AKT induz a sua translocação citoplasmática e degradação deste fator. Mas, o *FOXO3a* também é regulado pelo sinal extracelular relacionado com as vias de sinalização ERK1/2 /MAPK e I $\kappa$ B quinase (IKK) (Lam et al., 2013).

O efeito dessas cascatas de sinalização, frequentemente desreguladas, culminam na inativação da função supressora de tumor do *FOXO3a*.

Alguns estudos demonstraram que os efeitos citostáticos e citotóxicos de muitos agentes terapêuticos antineoplásicos, incluindo o paclitaxel, doxorrubicina, lapatinibe, gefitinibe, imatinibe, a cisplatina e tamoxifeno (Lam et al 2013), atuam na ativação de membros da família *FOXO*, principalmente através da inibição do eixo de sinalização PI3K-AKT. Por exemplo, após o tratamento com paclitaxel, a via JNK induz a atividade *FOXO3a*. Além disso, a via MAPK /P38 fosforila *FOXO3a* na posição 7 do amino ácido serina (Ser7), promovendo realocização do *FOXO3a* e ativação nuclear em

resposta à doxorrubicina. Assim, as drogas antineoplásicas interagem para ativar *FOXO3a*. (Figura 3).



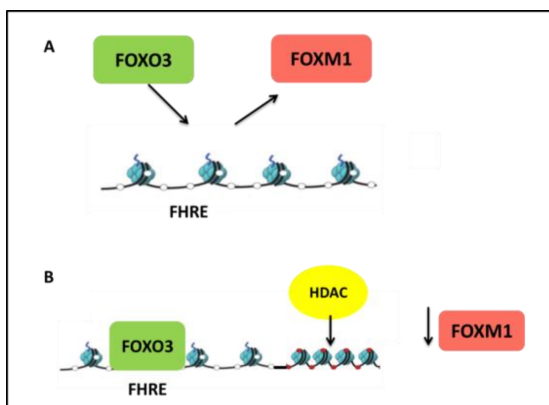
(Adaptado de Lam et al., 2013)

**Figura 3. Ativação e repressão do *FOXO3a* e *FOXM1* através das vias de sinalização.** As drogas antineoplásicas como: etoposídeo, cisplatina, epirrubicina e doxorrubicina, utilizados no tratamento do NB, têm mecanismos de ação distintos, atuam no eixo envolvendo as proteínas *FOXO3a-FOXM1*, ativando as vias de sinalização para induzir a inibição da proliferação e / ou morte celular ou para ativar os mecanismos de proliferação celular. O FOXO3 é fosforilado através da via MAPK /P38 e a sumoilação do FOXM1 é inibida via JNK.

## 1.7 - REGULAÇÃO GÊNICA ATRAVÉS DA COMPETIÇÃO DO *FOXO3* E *FOXMI* PELOS MESMO SÍTIO DE LIGAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA.

A expressão do gene *FOXMI* aumentada é consequência da inibição do gene *FOXO3a* (Lam et al 2013).

A competição entre o *FOXO3a* e o *FOXMI* é um mecanismo importante na resposta a quimioterápicos. O fator de transcrição *FOXO3* compete com o fator de transcrição *FOXMI* por regiões específicas no promotor, impedindo a ligação do *FOXMI* a esta região do promotor dos mesmos genes, levando assim a inibição dos genes apoptóticos (Lam et al 2013) (Figura 4). Como consequência da perda ou ganho no equilíbrio entre *FOXO3-FOXMI*, podem ocorrer os eventos como: a tumorigênese, progressão do câncer e desenvolvimento de resistência a terapia. A regulação de *FOXO3* e *FOXMI* é feita através de expressão proteica, modificações pós-traducionais e localização subcelular (Yao, 2018).



(Adaptado de Lam et al., 2013)

**Figura 4. Mecanismo pelo qual *FOXO3a* antagoniza com *FOXMI*.** a) A Proteína Foxo3a desloca o *FOXMI* do sítio de ligação na região promotora (FHRE) dos genes associados a apoptose e parada do ciclo celular. b) A Proteína Foxo3a remodela a cromatina, incluindo as histonas deacetilases (HDACs)



para promover a condensação do DNA, dificultando a ligação do *FOXMI* ao FHRE e conseqüentemente reprimindo os genes ativados por *FOXMI*.

## **1.8 - FATOR DE TRANSCRIÇÃO *FOXK2*.**

*FOXK2* foi recentemente relacionado à sobrevivência, proliferação celular e resistência para drogas quimioterápicas. Moraes et. al. demonstraram que *FOXK2* tem função central na mediação de resposta para drogas citotóxicas em câncer de mama, através de mediação da ativação de *FOXO3a*. Em resposta a epirrubicina e/ou paclitaxel, *FOXK2* liga-se à região promotora de *FOXO3a* e induz sua transcrição (Nestal-Moraes et. al 2015).

Assim como os outros membros da família *FOX*, *FOXK2* também é regulado por fosforilação. A fosforilação de *FOXK2* é mediada por CDK1 e ciclina B, que afetam a estabilidade induzindo a sua degradação e prejudicando a sua atividade transcricional (Marais et al., 2010).

Além do processo de fosforilação, *FOXK2* é regulado por uma outra modificação pós traducional, o processo de SUMOilação que é caracterizado por uma ligação covalente e reversível das proteínas SUMO em direção a suas proteínas alvo. Esse processo regula diversos processos biológicos, como por exemplo: reparo de dano ao DNA, respostas imunes, carcinogênese, progressão do ciclo celular e a apoptose. Alterações na SUMOilação pode levar ao desenvolvimento de algumas doenças e também de tumores (Bettermann et al., 2012).

## 1.9 – A MODELAGEM DA ESTRUTURA 3D DA PROTEÍNA

A modelagem molecular permite determinação da estrutura tridimensional (3D) de uma proteína partindo da sua sequência primária e se baseia nas interações entre os aminoácidos, sejam elas interações por ligações ou por interações de não ligantes. O estudo e a previsão de redes de interação proteína-proteína é um dos campos em crescimento na biologia de sistemas moderna. Além disto, determinar a estrutura de uma proteína é crucial para a elucidação da sua função, possibilitando aplicações nas áreas de engenharia de proteínas, anotação genômica e desenho racional de fármacos (Kumar et al, 2020). As proteínas sofrem mudanças conformacionais significativas durante o desempenho de sua função. Como regra, qualquer complexo feito por qualquer proteína implica em algum rearranjo estrutural. Essas conformações estão associadas a alterações de energia livre.

A avaliação de energia livre de uma proteína é um dos passos essenciais para a predição da sua estrutura, sendo analisada em biologia computacional. A proteína no seu estado nativo deve possuir o valor mínimo de energia livre de Gibbs (Contessoto et al., 2018 ). Uma função de energia potencial possui dois tipos de termos: ligantes e não ligantes (Dorn et al., 2014).

## 2.0 HIPÓTESE

As bases moleculares de pacientes com NB *MYCN* não amplificado que desenvolvem resistência as drogas quimioterápicas, ainda não foram elucidadas. Sendo assim, a nossa hipótese é de que membros da família *FOX* de fatores de transcrição, especialmente *FOXM1b*, *FOXK2* e *FOXO3a* possam estar envolvidos no pior prognóstico apresentado por esses pacientes que deveriam ter uma melhor sobrevida.

### 3.0 - JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços terapêuticos, as expectativas de sobrevida de longo prazo para NB de alto risco ainda são inferiores a 50% (Brodeur, 2006). Desta maneira, estudos que ampliam o conhecimento sobre estes novos alvos terapêuticos permitirão auxiliar a resposta ao tratamento aumentando a sobrevida dos pacientes com NB.

### 4.0 - OBJETIVO GERAL

-Identificar em uma coorte de 50 pacientes com neuroblastoma MYCN não amplificados com estadiamento 1, 2, 3 e 4, tratados com quimioterápicos convencionais (carboplatina, doxorrubicina, etoposídeo, topotecano e ciclofosfamida), as mutações dos genes *FOXO3A*, *FOXM1B* e *FOXK2*. Estabelecer uma possível associação entre as mutações e a resposta ao tratamento com os quimioterápicos.

### 4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Sequenciar o exoma completo dos pacientes com neuroblastoma MYCN não amplificado nos estádios 1, 2, 3, e 4 na coorte de estudos.

- Avaliar a expressão gênica e proteica das mutações dos genes *FOXO3a*, *FOXMb1* e *FOXK2* identificadas nos tumores de pacientes em estudo.

- Elaborar *in silico* através da modelagem tridimensional (3D), as estruturas das variantes identificadas no *FOXK2* e *FOXO3* e calcular a energia livre (Kcal/mol).

## 5.0 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 - DELINEAMENTO DO ESTUDO:

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo e prospectivo.

### 5.2 - CASUÍSTICA

Neste estudo, foram sequenciados o exoma dos tumores de 50 pacientes com neuroblastoma estágio 1 (n=5), 2 (n= 4), 3 (n=8) e 4 (n= 33), admitidos na unidade de Oncologia do Instituto de Tratamento de Câncer Infantil (ITACI) entre 2015 a 2021 (Tabela 3).

**TABELA 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO**

Casos	Gênero	Idade ao diagnóstico (meses)	Estadiamento INSS	Grupo de risco	Recidiva	Desfecho
1	M	36m	1	baixo risco	não	fora de terapia
2	F	37m	1	baixo risco	não	fora de terapia
3	M	18m	1	baixo risco	não	fora de terapia
4	M	42m	1	baixo risco	sim	óbito
5	F	4m	1	baixo risco	não	fora de terapia
6	F	18m	2A	baixo risco	não	fora de terapia
7	F	41m	2A	baixo risco	não	óbito
8	F	17m	2A	baixo risco	não	fora de terapia
9	F	9m	2B	baixo risco	sim	óbito
10	F	17m	3	risco intermediário	sim	óbito
11	F	1m	3	risco intermediário	não	fora de terapia
12	M	6m	3	risco intermediário	não	fora de terapia
13	M	48m	3	risco intermediário	sim	óbito
14	M	1m	3	risco intermediário	não	fora de terapia
15	M	23m	3	risco intermediário	não	fora de terapia
16	M	6m	3	risco intermediário	não	fora de terapia
17	M	46m	3	risco intermediário	não	óbito
18	F	13m	3	risco intermediário	sim	óbito
19	M	6m	4	alto risco	não	em tratamento
20	F	30m	4	alto risco	sim	em remissão
21	M	2m	4	alto risco	não	fora de terapia
22	M	32m	4	alto risco	sim	fora de terapia
23	F	18m	4	alto risco	não	em tratamento
24	F	84m	4	alto risco	não	fora de terapia

25	M	1m	4	alto risco	não	óbito
26	M	24m	4	alto risco	não	em tratamento
27	F	38m	4	alto risco	sim	em tratamento
28	M	4m	4	alto risco	não	em tratamento
29	M	6m	4	alto risco	não	em tratamento
30	F	36m	4	alto risco	não	em tratamento
31	F	21m	4	alto risco	não	em tratamento
32	F	4m	4	alto risco	sim	óbito
33	F	41m	4	alto risco	sim	óbito
34	F	108m	4	alto risco	sim	óbito
35	F	8m	4	alto risco	não	fora de terapia
36	F	5m	4	alto risco	sim	fora de terapia
37	F	60m	4	alto risco	não	óbito
38	F	10m	4	alto risco	não	óbito
39	F	56m	4	alto risco	não	em tratamento
40	F	6m	4	alto risco	não	em tratamento
41	M	14m	4	alto risco	não	em tratamento
42	F	84m	4	alto risco	não	fora de terapia
43	M	23m	4	alto risco	sim	óbito
44	F	17m	4	alto risco	sim	óbito
45	M	59m	4	alto risco	não	em tratamento
46	F	10m	4	alto risco	não	em tratamento
47	F	27m	4	alto risco	não	em remissão
48	F	168m	4	alto risco	sim	óbito
49	M	24m	4	alto risco	não	óbito
50	F	36m	4	alto risco	sim	óbito

---

**\*INSS: International Neuroblastoma Staging System**

Como controle foram selecionados pacientes que apresentaram estadiamento 1, 3 e 4 com status MYCN não amplificado, apresentaram boa resposta ao tratamento e sobrevida livre de doença há mais de 5 anos. Esses pacientes não apresentaram mutações identificadas nos genes *FOXM1B*, *FOXK2* e *FOXO3A*.

As características clínicas dos pacientes utilizados como controle estão descritas da tabela 4.

<b>Tabela 4 Características clínicas dos pacientes utilizados como controle neste estudo</b>				
<b>Caso controle</b>	<b>Estadiamento</b>	<b>Idade ao diagnóstico (meses)</b>	<b>gênero</b>	<b>Risco INSS</b>
001	1	36m	M	baixo
002	1	37m	F	baixo
005	1	4m	F	baixo
011	3	1m	F	Intermediário
012	3	6m	M	Intermediário
014	3	1m	M	Intermediário
024	4	84m	F	Alto
035	4	8m	F	Alto
042	4	84m	F	Alto

As amostras foram coletadas e estudadas após todos os pacientes ou responsáveis assinarem um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Termo de Assentimento 7 a 12 anos e 13 a 18 anos, concordando em participar da pesquisa, que também foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP. Aprovação da CAPPESQ: 1.959.008 (Anexo I).

### **5.3 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:**

- Pacientes diagnosticados com neuroblastoma *MYCN* não amplificado.
- Pacientes com neuroblastoma nos estádios 1, 2, 3 ou 4
- Pacientes tratados ou acompanhados na unidade de Oncologia do Instituto de Tratamento do Câncer Infantil (ITACI)/ Instituto da Criança do Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **5.4 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:**

- Pacientes com outros tipos de câncer.
- Pacientes com neuroblastoma *MYCN* amplificado.

- Pacientes que não assinaram termo de consentimento

## **5.5 - TRATAMENTO DOS PACIENTES**

Embora o tratamento não tenha sido uniforme, 50 pacientes seguiram o tratamento convencional que utiliza as drogas: carboplatina, doxorubicina, etoposídeo, topotecano e ciclofosfamida.

Os pacientes recidivados ou que foram a óbito foram acompanhados por um período médio de 24 meses.

## **5.6 - AMOSTRAS DOS TUMORES DOS PACIENTES ESTUDADOS.**

As amostras do tecido tumoral a fresco foram obtidas através da ressecção cirúrgica ou biópsia dos pacientes durante exame de rotina para auxiliar o diagnóstico. Estas amostras foram imediatamente transferidas para nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Para o estudo retrospectivo, amostras foram obtidas de tecido tumoral fixados em formaldeído e impregnados em parafina (FFPE -formalin-fixed, paraffin-embedded tissue), que se encontram depositadas no laboratório de Patologia do Instituto Central HC/FMUSP.

Amostras de sangue foram coletadas em tubos Paxgene com conservante para DNA.

## **5.7 - Extração de DNA.**

### **5.7.1 - Extração DNA genômico de sangue periférico.**

Para o isolamento de DNA, o sangue foi coletado em tubos PAXgene Blood DNA( PreAnalytix, Hombrechtikon, Suíça) e a extração foi processada com o kit Paxgene blood DNA kit (PreAnalytix, Hombrechtikon, Suíça) conforme instrução dos

fabricantes. Os tubos PAXgene Blood DNA contém 1.5 mL de solução estabilizadora para leucócitos e anticoagulante.

### **5.7.2 - Extração do DNA genômico de tumores.**

Amostras de tumores coletados e posteriormente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido no aparelho L 3 Leader (Loccus Biotecnologia, São Paulo. Brasil).

O isolamento de DNA genômico dos tumores foi realizado utilizando o kit de extração de Purelink Genomic DNA mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Estas amostras foram utilizadas para o estudo de sequenciamento de exoma completo.

### **5.7.3 - Extração do DNA genômico de tumores preservados em parafina – FFPE**

As amostras de tumor FFPE foram processadas no serviço de Anatomia Patológica (HC-FMUSP), sendo realizados cortes histológicos com a espessura de  $5\ \mu\text{m}$  utilizando-se micrótomo (Leica Microsystems RM 2025). As amostras foram armazenadas em microtubos de 1.5ml.

A deparafinização das amostras foi realizada com a adição de 1 ml de xilol, seguida de centrifugação a 10.000 xg por dois minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de etanol a 100%. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 xg por dois minutos, e o sobrenadante descartado. Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora para evaporação do etanol.



Após a incubação, foi realizado o processo de extração de acordo com as recomendações do fabricante do Kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA). Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C até o momento do uso.

### **5.8 - Quantificação do DNA genômico.**

A concentração do DNA foi determinada por meio de espectrofotômetro Fragment Analyzer Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O DNA foi diluído em tampão TE (0,01mM ácido etilenodiamino tetracético e 10mM Tris HCl, pH 8,0) para 50ng/μl e armazenado a -20°C até o momento do uso.

### **5.9 - Sequenciamento Completo do Exoma.**

O DNA de tumores e sangue dos pacientes com neuroblastoma foram analisados através do sequenciamento do exoma completo com uma média de cobertura 100X. Todas as lesões genéticas, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), pequenas inserções/deleções (indels) e variações estruturais (SVs) foram validadas experimentalmente, como descrito a seguir

#### **5.9.1 - Preparação da Biblioteca.**

As preparações das bibliotecas para o sequenciamento das amostras dos pacientes e controle, incluindo a fragmentação do DNA, adição de sequências do adaptador e do index foram realizadas de acordo com o protocolo Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina. San Diego, CA, USA), conforme orientações do fabricante.

### 5.9.2 - Quantificação da Biblioteca.

Após a preparação das bibliotecas de DNA, as amostras foram quantificadas no Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e tiveram sua qualidade e tamanho dos fragmentos gerados avaliada pelo TapeStation 2200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), conforme instruções do fabricante.

### 5.9.3 - Sequenciamento na Plataforma Illumina HiSeq 2500.

A metodologia de sequenciamento por síntese da plataforma Illumina HiSeq 2500 se inicia com a amplificação das bibliotecas de DNA ligados a superfície de uma célula (*flowcell*) na forma de pontes através da enzima DNA polimerase, que produz múltiplas cópias da sequência original (*clusters*).

As bibliotecas foram reunidas, desnaturadas e diluídas a 12pM e submetidas a clusterização pelo TruSeq kit PE kitCluster v3 (Illumina. San Diego, CA, USA) em uma estação de cluster C-bot (Illumina. San Diego, CA, USA). A clusterização se baseia na ligação dos adaptadores presentes nas extremidades dos fragmentos das bibliotecas (P5 e P7), complementares aos que estão presentes na superfície da célula. Durante o sequenciamento das múltiplas cópias, são adicionados oligonucleotídeos com a terminação OH bloqueada a fim de que seja adicionado apenas um a cada etapa. Em seguida, uma excitação por feixe de luz faz com que seja emitida uma fluorescência, que tem cor diferente para cada oligonucleotídeo. O ciclo de adição de nucleotídeo e aquisição de imagem é repetido por 200 vezes, que são sequenciados 100 nucleotídeos da extremidade do fragmento no sentido senso e 100 nucleotídeos no sentido antissenso, caracterizando uma corrida com extremidades pareadas (*paired end*) (2x150).

#### 5.9.4 - Análise da Qualidade dos Reads e Filtragem

As sequências geradas do sequenciamento estão no formato FASTQ, que contém a sequência de bases nucleotídicas e a qualidade correspondente a cada base em um único arquivo.

Os dados foram analisados no programa FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). O programa gera um relatório onde podemos analisar a quantidade de dados gerados para cada biblioteca, a qualidade relativa a cada base e a qualidade média da sequência, o tamanho médio de cada leitura e diversas outras características. As bibliotecas foram filtradas no programa Sickle-Master (disponível em <https://github.com/najoshi/sickle>) para selecionar leituras com qualidade superior a 28 na escala de Phred e tamanho superior a 20 pb. A escala de Phred é uma escala logarítmica ligada à probabilidade de erro de determinação da base (*base-calling*) usada para caracterizar a qualidade da sequência de DNA e pode ser usada também para comparar a eficácia entre diferentes métodos de sequenciamento. Esta ferramenta de filtragem avalia a qualidade da base e a retira se ela não for acima do limiar estabelecido pelo usuário. Também descarta leituras abaixo do limiar de tamanho definido. Após essa filtragem, as leituras foram submetidos novamente ao programa FastQC, gerando um relatório que foi comparado com o inicial para avaliar a quantidade de *reads* restantes e a qualidade média.

#### 5.9.5 - Análise dos dados – Bioinformática.

As análises de dados gerados no painel e no exoma completo foram realizadas com o auxílio de serviço de bioinformata do laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (*SELA*) da Rede PREMium (SELA –HCFMUSP) para geração dos arquivos VCF e BAM a partir dos arquivos FASTQ.

Para verificação da frequência na população, todas as mutações foram consultadas nos principais bancos de dados genômicos internacionais: 1000 genomes (Siva et al., 2008), ExAC (Kobayashi et al., 2017) e GnomAD\_exomes (Haeussler et al., 2019).

Além disso, as mutações identificadas foram analisadas no COSMIC - catálogo de mutações somáticas em câncer (Tate et al., 2019). A patogenicidade foi obtida através dos algoritmos de predição de dano SIFT (Vaser et al., 2016) e PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2013). Foram considerados somente as mutações *missense*, *frameshift*, *stopgain* cuja prevalência foi menor que 1%.

## **5.10 EXTRAÇÃO DE RNA TUMORAL.**

As amostras dos tumores previamente armazenadas em reagente de estabilização de RNA (RNA Later® Solution – Life Technologies) a -80°C foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido no aparelho L3 Leader (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

O isolamento de RNA dos tumores foi realizado utilizando o kit de extração RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

### **5.10.1 - Quantificação RNA.**

A concentração do RNA foi determinada por meio de espectrofotômetro Fragment Analyzer Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O RNA foi diluído em água livre de RNase para 50ng/μl e armazenado a -20°C até o momento do uso.

### **5.10.2 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE RNAm POR PCR EM TEMPO REAL.**

As reações de PCR em tempo real foram padronizadas utilizando o kit Taqman Universal PCR Master MIX (Applied Biosystems) e a amplificação e aquisição dos dados foram realizadas no StepOne.

O equipamento utilizado foi o StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Singapura). A expressão gênica foi determinada como a expressão relativa entre o gene de interesse e o gene housekeeping *GAPDH*, calculadas pelo software do equipamento StepOnePlus, a partir do *threshold cycle* (CT) das reações.

### **5.11 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS FOX.**

Para avaliar a expressão das proteínas resultantes das mutações dos genes *FOXO3a*, *FOXM1b* e *FOXK2*, foram realizadas análises de western blot e observadas a sua localizações no núcleo e no citoplasma.

#### **5.11.1 - Extração de proteína de tumores.**

As amostras das proteínas obtidas a partir dos tumores dos pacientes de NB foram extraídas utilizando o tampão RIPA para lise e extração contendo um coquetel com inibidores de proteases (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL USA).

Para extração das proteínas citoplasmáticas e nucleares por subfracionamento celular de proteínas foi utilizado o kit comercial NER-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

As concentrações das proteínas foram determinadas através do Fragment Analyzer Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de utilização.

### **5.11.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

Foram utilizados 20  $\mu\text{g}$  de amostras para separação por SDS-PAGE. De acordo com o tamanho das proteínas, foram utilizados géis de 10 a 15%. Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-GEL and BLOT module (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e o padrão de massa molecular foi o Spectra Multicolor Broad Range ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). As configurações para a eletroforese foram as seguintes: amperagem constante de 15mA/gel e voltagem limite de 110V por 120 minutos em tampão de corrida Tris glicina (Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

### **5.11.3 - Western Blotting.**

Após a separação por SDS-PAGE as proteínas foram transferidas para membrana PVDF Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA) previamente preparada conforme as instruções do fabricante. Seguinte a transferência, a membrana foi bloqueada com albumina de soro bovino (BSA) (150mM NaCl, 50mM Tris-base, BSA 5%, Tween 20 0,1%) durante uma hora, evitando ligações inespecíficas, após o bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo primário durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$  sob leve agitação.

A seguir foram feitas três lavagens de 10 minutos cada com a solução de bloqueio. A membrana foi então incubada por 1 hora com anticorpo secundário (goat anti-mouse ou goat anti-rabbit – Invitrogen, Rockford, IL USA) em solução de bloqueio

(1:1000) a temperatura ambiente por 2 horas. A membrana foi novamente lavada como já descrito e em seguida incubada por 3 minutos em ECL (SignalFire Plus ECL Reagente, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Após incubação com ECL a membrana foi colocada no fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) para visualização das bandas e depois analisadas por densitometria no Software Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Os anticorpos primários utilizados no WB foram: Anti-FOXO3a/FKHRL1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Anti-FOXM1, Anti-FOXK2 e Anti-p27 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) Anti-Bim, Anti-p21 e Anti-BCL2 (*BD Biosciences*, San Jose, CA, USA).

Os valores relativos à expressão representados nos gráficos das análises foram obtidos através de densitometria das proteínas de interesse em relação à proteína constitutiva GAPDH.

## **5.12 - Modelagem 3D e cálculos de estabilidade.**

Os softwares FOLDx e YASARA foram utilizados nos parâmetros padrões pré definidos, pH7 e temperatura 37°C para a geração dos modelos 3D das mutações de FOXM1, FOXK2 e FOXO3. As sequências foram obtidas no PDB (Protein Data Bank - <https://www.rcsb.org/>).

De uma maneira geral o FOLDx faz o cálculo de energia livre de uma macromolécula baseado em sua estrutura 3D permitindo o cálculo da estabilidade da proteína e a análise de energia livre da formação do complexo (Schymkowitz et al., 2005).

## 6.0 - RESULTADOS

### 6.1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO

A idade ao diagnóstico dos 50 pacientes em estudo variou de 1 a 108 meses, com uma média de 23,6 meses e a mediana de 54 meses, sendo que 44% dos pacientes apresentavam idades  $\leq 18$  meses e enquanto que 56% apresentaram idade superior a 18 meses.

No estadiamento da doença, segundo os critérios de INSS, a maioria dos pacientes 82%, apresentaram estádios de alto risco com prognóstico desfavorável (III/IV) e 18% estádios de baixo risco com prognóstico favorável (I/II). Dentre os 50 pacientes estudados, 22% apresentaram mutações em alguns genes da família *forkhead box* (FOX) associados a resistência a quimioterápicos, como os genes *FOXM1B*, *FOXK2* e *FOXO3A*. Entre 22% dos pacientes distribuídos: 4 mutações foram em *FOXMI*, 4 mutações foram em *FOXK2* e 4 mutações foram em *FOXO3A*. Estes pacientes recidivaram e foram a óbito (Tabela 5)



**TABELA 5. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO COM MUTAÇÕES IDENTIFICADAS EM *FOXM1B*, *FO XK2* E *FOXO3A*.**

<b>Casos</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade ao diagnóstico (meses)</b>	<b>Estadiamento INSS</b>	<b>Grupo de risco</b>	<b>Mutações FOX</b>
<b>004</b>	M	42m	1	baixo risco	FOXM1
<b>009</b>	F	9m	2B	baixo risco	FO XK2
<b>010</b>	F	17m	3	risco intermediário	FOXO3
<b>032</b>	F	4m	4	alto risco	FO XK2
<b>033</b>	F	41m	4	alto risco	FOXO3
<b>034</b>	F	108m	4	alto risco	FO XK2 / FOXO3
<b>037</b>	F	60m	4	alto risco	FOXO3
<b>043</b>	M	23m	4	alto risco	FOXM1
<b>044</b>	F	17m	4	alto risco	FOXM1
<b>048</b>	F	168m	4	alto risco	FOXM1
<b>050</b>	F	36m	4	alto risco	FO XK2

As mutações dos genes *FOXM1B*, *FO XK2* e *FOXO3A* serão descritas a seguir.

## A-) *FOXMI*

### 6.2 - MUTAÇÕES DO GENE *FOXMI* IDENTIFICADAS NOS PACIENTES NEUROBLASTOMA *MYCN* NÃO AMPLIFICADOS E RECIDIVADOS.

Na isoforma *FOXMI* foram identificadas quatro mutações em heterozigose, não sinônimas nos éxons: 2 (chr12: 2983220 G>A; G142E), 7 (chr12: 2973891 G>A; R350C), 8 (chr12: 2973547 G>T; A402E) e 9 (chr12: 2968078 G>A; P673L) (Tabela 6).

#### Caso 004

O paciente 004 com diagnóstico de NB estágio 1 (INSS), apresentou a mutação c.1205C>A:p.A402E. Esta mutação já foi identificada em adenocarcinoma de pulmão (COSM7368661) (McMillan et al., 2018), com frequência de 0,6% no banco de dados genômicos 1000 genomes, e ainda não descritas nos outros bancos de dados genômicos consultados, GnomAD e ExAC. A doença neste paciente, progrediu rapidamente, recidivando e levando a óbito, ao contrário do que ocorre com pacientes, classificados com baixo risco estágio 1 (INSS), que se recuperam bem.

Na mutação c.1205C>A:p.A402E, ocorre a troca no códon de uma citosina (GCG) por uma adenina (GAG), ocasionando a substituição de um resíduo de alanina por um resíduo de ácido glutâmico na posição 402 da proteína FOXM1. Esses aminoácidos possuem características diferentes, enquanto a alanina pertence ao grupo de aminoácidos apolares, hidrofóbicos, o ácido glutâmico pertence ao grupo de aminoácidos polares carregados negativamente, e ácido hidrofílico. A substituição de um aminoácido mais solúvel pode levar a alterações da conformação da estrutura original. A mutação A402E ocorre em uma região que encontra-se entre o domínio FOX de ligação ao DNA (FKH) no resíduo do aminoácido 333 e o início do TAD no resíduo

do aminoácido 589. Neste local existem resíduos responsáveis pela regulação da atividade de FOXM1.

Nos dois algoritmos preditores de danos consultados (SIFT e PolyPhen2), a mutação A402E foi considerada deletéria e patogênica, respectivamente com pontuação 0.001 no SIFT e 0.8 no PolyPhen2 (Tabela 6).

### **Caso 043**

No paciente 043, estágio 4 (INSS), foi identificada a mutação c.425G>A:p.G142E. Esta mutação já foi descrita em adenocarcinoma de pulmão (COSM7368660). Nesta mutação ocorre uma substituição de uma guanina no códon (GGA) por uma adenina (GAA), levando a uma troca entre o resíduo do aminoácido glicina por um ácido glutâmico na posição 142 da proteína FOXM1. A glicina é considerada apolar, enquanto que o ácido glutâmico é polar com carga negativa. Assim como a mutação anterior, essa substituição pode alterar a conformação original, afetando a estabilidade da estrutura da região do domínio repressor N-terminal (NRD) da proteína FOXM1B. O domínio NRD é responsável pela auto regulação negativa da atividade, através de ligação com o TAD, e expressão de FOXM1, aumentando a expressão de FOXM1 (Marceau et al., 2019).

Com uma pontuação de 0,001 pelo SIFT e de 0,786 pelo PolyPhen2 é uma mutação considerada deletéria e patogênica, apresentando uma frequência de 0,02%, 0,01% e 0,03% nos banco de dados genômicos 1000 genomes, GnomAD e ExAC, respectivamente (Tabela 6).

#### **Caso 044**

A paciente 044, apresentou a mutação missense c.1048C>T;p.R350C em *FOXMI1B*, que já foi descrita em carcinoma de ovário (COSM1717044) (Bashashati et al., 2013) e apresenta uma frequência de 0,1% nos bancos de dados genômicos 1000 genomes, GnomAD e ExAc (Tabela 6).

A alteração de uma citosina no códon (CGC) por uma timina (TGC), resulta numa troca de um resíduo de prolina por um resíduo de cisteína na posição 350. Esta mutação encontra-se entre a região do domínio FOX (FKH) e o TAD de FOXM1. A substituição de uma arginina de natureza básica, carregada positivamente, portanto hidrofílica, por uma cisteína também polar porém não carregada, pode influenciar a conformação e a estabilidade dessa importante região regulatória de FOXM1.

Essa mutação é considerada como deletéria pelo SIFT, com uma pontuação de 0.014, e patogênica pelo PolyPhen2, apresentando uma pontuação de 0.646 (Tabela 6).

#### **Caso 045**

A paciente 045, apresentou a mutação missense, c.2018C>T;p.P673L, que substitui uma citosina no códon (CCG) por uma timina (CTG), gerando a troca de um resíduo de prolina por um resíduo de leucina na posição 673.

Esta mutação foi descrita em melanoma maligno (COSM9928750) (Rabbie et al., 2021). A análise com o algoritmo SIFT demonstrou que é uma modificação deletéria com uma pontuação de 0.001 e patogênica pelo PolyPhen2 com a pontuação 0.8 (Tabela 6). A frequência de 0,4% no banco de dados genômicos 1000 genomes, de 0,6% nos bancos de dados GnomAD e ExAc foram descritas na tabela 6.

**TABELA 6 – MUTAÇÕES *FOXMI1B* IDENTIFICADAS EM PACIENTES COM NEUROBLASTOMA *MYCN* NÃO AMPLIFICADO**

Casos	Mutação	dbSNP	Frequência 1000 genomes	Frequência GnomAD	Frequência ExAc	SIFT	SIFT score	Polyphen2	Polyphen2 score	COSMIC	Referências
004	A402E	rs28990715	0,60%	N.D.	N.D.	D	0,001	P	0,8	COSM 7368661	McMillan et al., 2018
043	G142E	rs140520587	0,02%	0,01%	0,03%	D	0,001	P	0,786	COSM 7368660	McMillan et al., 2018
044	R350C	rs146299415	0,10%	0,10%	0,10%	D	0,014	P	0,646	COSM 1717044	Bashashati et al., 2013
048	P673L	rs28919870	0,40%	0,60%	0,60%	D	0,001	P	0,8	COSM 9928750	Rabbie et al., 2021

**D: deletéria; P: patogênica.**

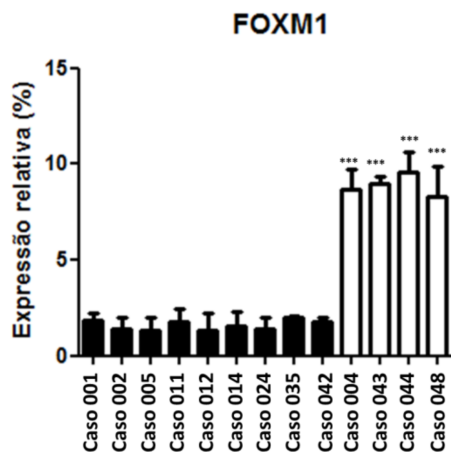
### 6.3 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÕES DOS GENE *FOXM1B*.

#### 6.3.1 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAm DO GENE *FOXM1B* MUTADO.

A expressão de mRNA *FOXM1B* foi analisada nos tumores dos pacientes que apresentaram mutações neste gene.

Os pacientes estudados apresentaram a expressão de RNAm de *FOXM1B* aproximadamente, 11 vezes maior do que a encontrada nos pacientes controles ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 5), demonstrando que estas mutações afetaram a região promotora do gene, aumentando sua expressão.

O aumento da expressão de RNAm de *FOXM1B*, leva à resistência ao tratamento quimioterápico (Liao et al., 2018), através do aumento da regulação de alvos anti-apoptóticos.



**Figura 5.** Expressão relativa de RNAm de *FOXM1B* nos tumores de pacientes 004, 043, 044 e 048 com NB, comparados com os controles (caso 001 a 042). A expressão de RNAm nos pacientes com mutações de *FOXM1B* foi significativamente maior comparado com os controles. A análise estatística foi realizada pelo método Anova test t. ( $***p \leq 0.05$ ).

#### 6.4 - SUBLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FOXM1 MUTADAS.

FOXM1B tem atividade aumentada quando permanece localizado no núcleo. Em condições normais, FOXM1B, desloca-se do núcleo para o citoplasma, onde será degradado (Park et al., 2008). A permanência no núcleo, durante o desenvolvimento do tumor, aumenta a sua atividade como fator de transcrição nuclear, gerando um aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2, BIRC5/Survivin (Halasi et al., 2012; Nestal de Moraes et al., 2015).

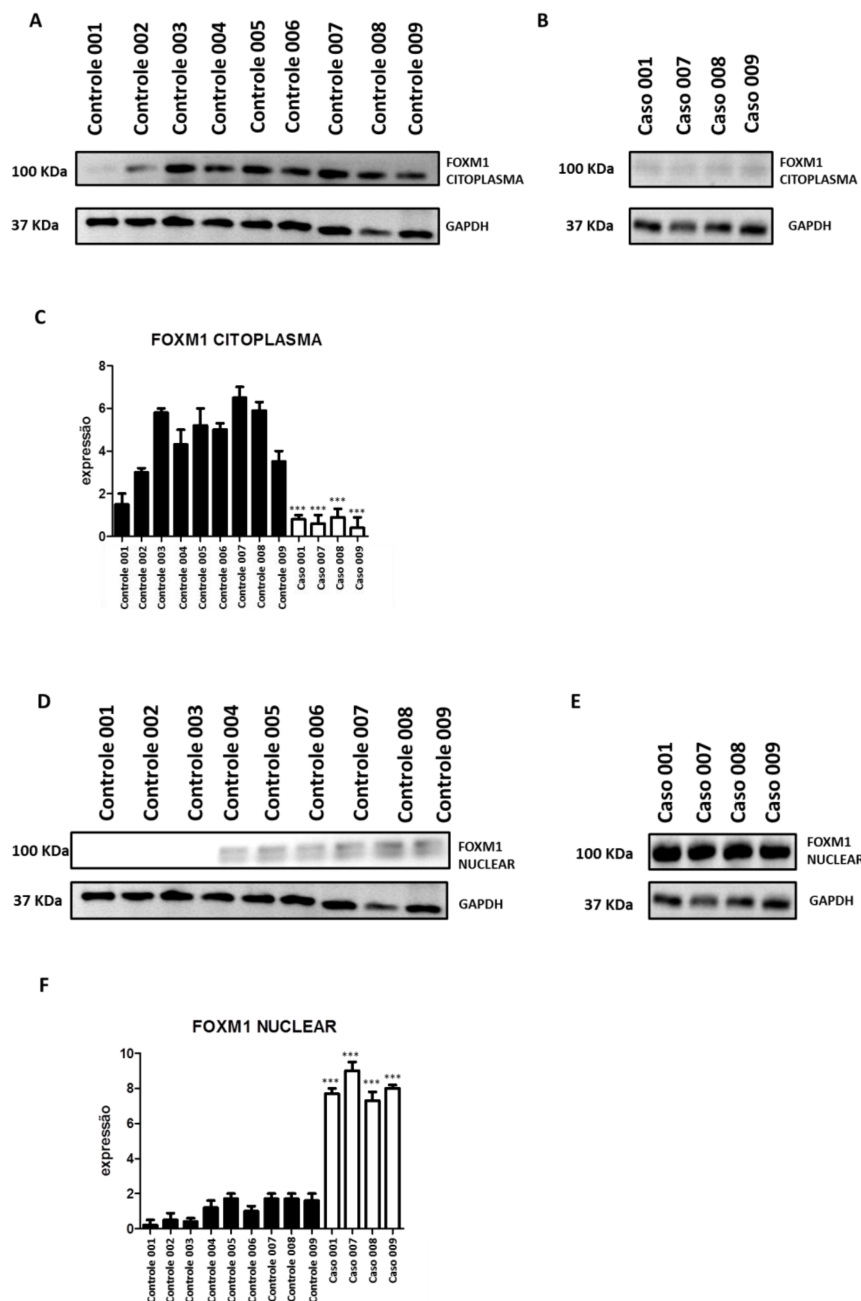
Para avaliar as sublocalizações das mutações do *FOXM1B* no citoplasma ou núcleo das células tumorais dos pacientes, foi utilizado o método de western blot.

Como controle foram utilizados nove amostras de tumores de pacientes de NB, sendo três com estadiamento I (casos 001, 002 e 005), três com estadiamento III (011, 012 e 014) e três com estadiamento IV (casos 024, 035 e 042). Estes pacientes não possuíam mutações identificadas em *FOXM1B* e receberam o mesmo regime terapêutico que os pacientes com mutações. Estes pacientes controle não recidivaram, tiveram boa resposta e estão fora de tratamento há mais de 5 anos.

A expressão das proteínas das mutações de FOXM1B estavam pouco expressas no citoplasma, sendo significativamente menor comparadas com as amostras controles ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 6 A-B).

Entretanto, a expressão de FOXM1B nuclear é significativamente maior nas amostras dos pacientes com mutações em FOXM1 ( p.A402E, p.G142E, p.R350C, p.P673L) em comparação com as amostras dos pacientes controle ( $p \leq 0.05$ ) ( Figura 6 D-E).

Estes dados sugerem que as mutações em *FOXM1B* favoreceram a sua permanência no núcleo e conseqüentemente aumentaram a expressão de seus alvos anti-apoptóticos (Liao et al., 2018).



**Figura 6.** Identificação da sublocalização citoplasmática e nuclear das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXM1B* (B e E) e controles (A e D) analisados por western blot. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração das proteínas com mutações em FOXM1B no citoplasma (C) ( $p \leq 0.05$ ), em relação ao controle ( $p \leq 0.05$ ). E uma relação diferencialmente expressa e



menor no citoplasma em relação a concentração proteica destas mutações no núcleo. (\*\*\*)  $p \leq 0.05$ ). GAPDH foi usado como controle endógeno.

## **6.5 - ANÁLISES DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL2 E BIRC5/SURVIVIN NAS MUTAÇÕES FOXM1.**

FOXM1 também contribui para inibição da apoptose e senescência induzida por danos no DNA. Acredita-se, que isso seja alcançado pelo controle direto da atividade transcricional de genes antiapoptóticos e anti-senescência, incluindo Bcl-2 e Survivin (BIRC5), respectivamente (Halasi et al., 2012; Nestal de Moraes et al. 2015).

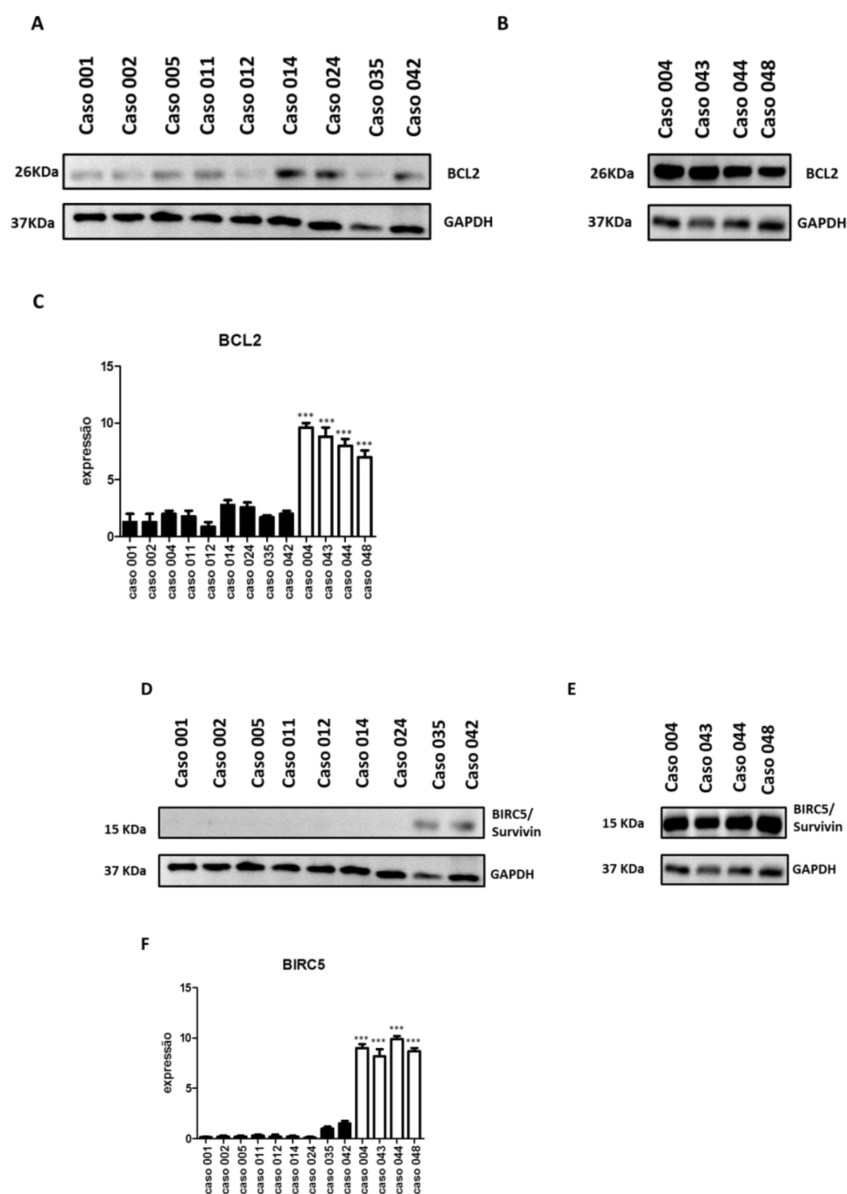
A expressão aumentada de BIRC5/Survivin está correlacionada com o pior prognóstico de pacientes com NB (Islam et al., 2000). Além disto, o aumento da regulação de oncogenes como FOXM1, e conseqüentemente BCL2 e BIRC5/Survivin esta diretamente relacionado com o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (carboplatina, doxorubicina, etoposídeo, topotecano e ciclofosfamida) (Obexer et al., 2009).

Para avaliar se as mutações de *FOXM1B* afetaram a expressão proteica dos genes antiapoptóticos BCL2 e BIRC5/Survivin, análises das amostras proteicas dos pacientes em estudo que recidivaram foram avaliadas através do método de western blot ( Figura 7).

Os resultados demonstraram que a localização das mutações do *FOXM1* no núcleo, como observado no item anterior (item 5.4), regulou a expressão das proteínas anti apoptóticas, aumentando significativamente a expressão das proteínas BCL2 (Figura 7B) e BIRC5/Survivin (Figura 7E), quando comparado com os controles ( $P \leq 0.05$ ) (figura 7A – D). Estes resultados sugerem que estas mutações podem ter

aumentado também a proliferação celular e resistência aos quimioterápicos, como observado nos estudos de Halasi e Nestal de Moraes (Halasi et al., 2012; Nestal de Moraes et al. 2015).

Isso pode explicar também a baixa sobrevida e resistência nesses pacientes com mutações, independentemente do estágio da doença, uma vez que ocorreu um aumento da expressão de oncogenes como FOXM1.



**Figura 7.** Análises das expressões das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e BIRC5/Survivin, através do western blot. (A e D) Expressão de BCL2 e BIRC5/Survivin nos controles, respectivamente. (B e E)

Expressão de BCL2 e BIRC5/Survivin nas mutações (004, 043, 044 e 048), respectivamente. Expressão proteica do Bcl-2 (C) e BIRC5/Survivin (F) nas amostras tumorais dos pacientes com mutações identificadas em *FOXMI1B* foi estatisticamente maior em relação aos controles (\*\*\*)  $p \leq 0.05$ . GAPDH foi usado como controle endógeno.

FOXMI1 faz com que a expressão de BCL-2 aumente, através da inibição da ativação da via pró apoptótica JNK, impedindo assim que a apoptose ocorra sob o tratamento com doxorrubicina em células cancerosas (Halasi et al., 2012). Assim como a expressão de BCL2, a expressão de BIRC5/Survivin também está aumentada nos tumores desses pacientes.

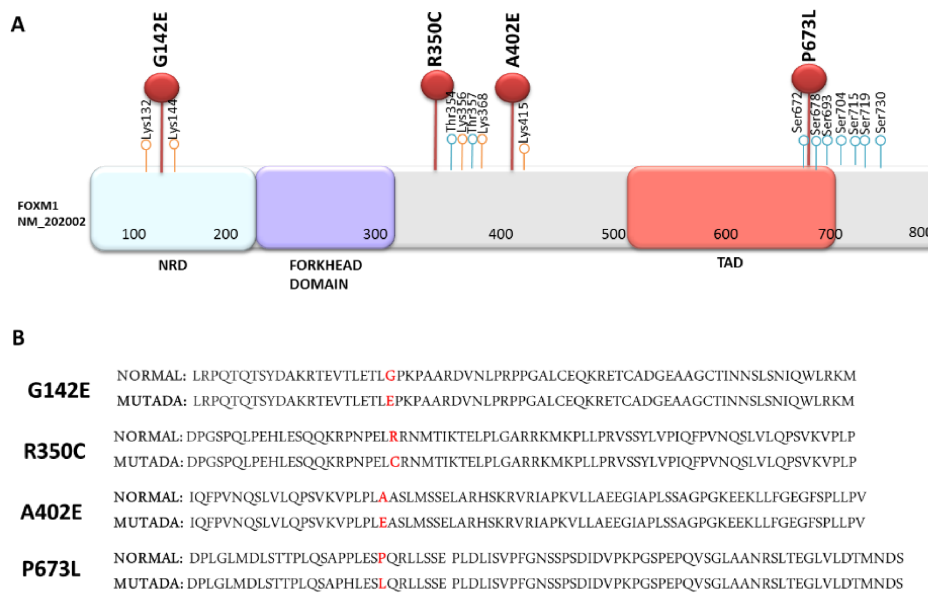
Os resultados sugerem que as alterações das expressões desses dois alvos anti apoptóticos de FOXMI1B, estão associadas com a baixa sobrevida e a resistência nesses pacientes (Liat et al., 2018).

## **6.6 - ANÁLISE DA ESTRUTURA PROTEICA DAS MUTAÇÕES DE FOXMI1B.**

A proteína *FOXMI1* possui 3 principais domínios, onde podem ocorrer estas modificações pós-tradução: o domínio repressor N-terminal (NRD), o domínio *Forkhead* (FKH) e o domínio de transativação (TAD).

Neste estudo, a mutação G142E foi identificada no domínio NRD, e a mutação P673L na região do TAD (Figura 8). As alterações nesses domínios podem levar a alterações na atividade auto regulatória de FOXMI1, uma vez que a atividade de transativação do TAD pode ser suprimida diretamente pela interação com o NRD (Park et al., 2008).

Enquanto que, as mutações R350C e A402E encontram-se entre as regiões de domínio FOX (FKH) e o TAD, como observado na figura 8. Esta região é importante para a regulação de FOXM1 (Shimmel et al., 2014).



**Figura 8.** Esquema e alinhamento das sequências normal e mutadas de FOXM1 identificadas em pacientes de NB *MYCN* não amplificado. A-) Esquema da localização das mutações na proteína FOXM1, a mutação G142E localizada no domínio NRD, as mutações R350C e A402E entre o domínio FKH e o domínio TAD. A mutação P673L localizada na região TAD entre dois sítios de fosforilação. B-) Alinhamento das sequências normais e mutadas das regiões descritas acima, em vermelho comparados com as regiões sem mutações, citadas como normais.

## B-) *FO XK2*

### 6.7 - MUTAÇÕES DO *FO XK2* NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA NÃO AMPLIFICADO RECIDIVADOS.

*FO XK2* é um gene supressor de tumor. Este fator de transcrição quando localizado no núcleo liga-se ao promotor de genes envolvidos em diversos processos biológicos, como reparo ao dano de DNA (Ji et al., 2014), regulação do ciclo celular (Zhu et al., 2000) e apoptose (Nestal de Moraes et al., 2015).

Em quatro pacientes (casos 009, 032, 034 e 050), foram identificadas 4 mutações em heterozigose não sinônimas nos éxons: 1 (chr17: 80477937 G>A; R58H), 5 (chr:17: 805451567 C>T; R333W) 7, (chr17: 80543938 G>A; V480M), 8 (chr17: 80545106 G>A; V582M) e 9 (chr17: 80559272 C>T; P627L) (chr17: 80559335 C>T T648M) que originam as substituições missenses descritas a seguir:

#### **Caso 009**

Na paciente 009, foi identificada a mutação p.V582M. A troca do nucleotídeo guanina no códon (GTG) por um nucleotídeo adenina (ATG), leva a uma mudança de um aminoácido valina por um aminoácido metionina na região C-terminal de *FO XK2*. A prolina e a metionina são apolares, porém essa mutação com pontuação de 0.001 no algoritmo SIFT e 0.883 no algoritmo PolyPhen2 é considerada como deletéria e patogênica, respectivamente. Além disto, esta mutação apresenta frequência nos bancos de dados genômicos de 0,01% no 1000 genomes, GnomAD e ExAc. Essa mutação ainda não foi descrita em nenhum tipo de câncer (Tabela 7).

Apesar de estadiamento de baixo risco, estágio 2B (INSS) com diagnóstico inferior a 18 meses, essa paciente recidivou e foi a óbito apresentando um pior prognóstico, diferente do esperado em pacientes com esse estadiamento.

### **Caso 032**

Na paciente 032 foi identificada uma mutação missense (c.1180 C>T p.P627L) que altera o nucleotídeo citosina no códon (CCG) por um nucleotídeo timina (CTG), levando a alteração do aminoácido prolina por um resíduo de leucina na região C-terminal de FO XK2. Essa mutação está presente em uma região que compreende diversos resíduos importantes para a regulação da expressão e atividade de FO XK2. Alterações nessas regiões podem causar instabilidade e levar à perda de sua função supressora de tumor.

Sua frequência na população é de 1.2%, segundo o banco de dados genômico 1000 genomes e de 1% nos bancos de dados genômicos GnomAD e ExAc. No algoritmo SIFT apresentou uma pontuação de 0.002 sendo considerada deletéria e de 0.971 no PolyPhen 2 considerada como patogênica (Tabela 7).

Também foi identificada nesta paciente, uma segunda mutação no gene *FO XK2*. A mutação c.1003C>T (p. R333W), provoca a substituição no códon 333 de um resíduo de arginina (CGG) por um resíduo de triptofano (AGG). Essa mutação encontra-se dentro do domínio *forkhead* (FKH) de *FO XK2*, onde este fator de transcrição liga-se ao DNA de seus genes alvos apoptóticos (Nestal de Moraes et al., 2019). Esta mutação pode impedir essa ligação ao DNA dos genes alvos prejudicando a sua função de gene supressor de tumor. Esta mutação é considerada patogênica (Tabela 7).

### Caso 034

Na paciente 034 foram identificadas duas mutações: uma no éxon 7 c.1438G>A: p.V480M e outra no éxon 9 c.1943C>T:p.T648M.

A primeira mutação (c.1438G>A: p.V480M) substitui um nucleotídeo guanina no códon (GTG) por um nucleotídeo adenina (ATG), levando a troca de um aminoácido valina por um aminoácido metionina na posição 480. Esta mutação está presente na região C-terminal de FOXK2, entre diversos resíduos de modificação pós traducional, e pode afetar a conformação e estabilidade de regiões importantes para a regulação da expressão e atividade de FOXK2.

A mutação V480M ainda não foi descrita em nenhum tipo de câncer. A frequência dessa mutação é de 0,001% nos bancos de dados genômicos GnomAD e ExAc. É considerada deletéria pelo SIFT com uma pontuação de 0.017, e patogênica pelo PolyPhen2 com uma pontuação de 0.972 (Tabela 7).

A segunda mutação gera a troca de um nucleotídeo citosina no códon (ACG) por um nucleotídeo timina (ATG), que leva a substituição de um resíduo de aminoácido treonina por um resíduo de aminoácido metionina na posição 648 da região C-terminal. A treonina possui característica polar e hidrofílica, sendo mais solúvel que a metionina que é classificada como aminoácido apolar (hidrofóbica). Estas alterações podem levar a uma modificação conformacional e instabilidade desta proteína. Além disso, a treonina nesta posição apresenta um sítio de fosforilação, podendo afetar a entrada desta proteína no núcleo e, conseqüentemente afetar as expressões das proteínas apoptóticas.

Esta mutação foi descrita no COSMIC (COSM4685407) e foi encontrada em adenocarcinoma de cólon (Giannakis et al, 2014). A frequência dessa mutação ainda não foi descrita no banco de dados 1000 genomes, entretanto aparece com uma

frequência de 0,13% no ExAC e 0,2% no GnomAD\_exomes. No algoritmo preditor de patogenicidade SIFT é considerada deletéria com uma pontuação de 0.002, enquanto que no PolyPhen2 é considerada como patogênica com uma pontuação de 0.989 (Tabela 7).

### **Caso 050**

No paciente 050 foram identificadas duas mutações missenses (tabela 7). A mutação c.1180 C>T p.P627L, como observada no caso 004 (Tabela 7). Essa paciente apresentou características clínicas muito parecidas, recidivando e indo a óbito.

A segunda mutação c.173G>A: p.R58H, leva a substituição no códon 58 de um resíduo de arginina (CGT) por um resíduo de histidina (CAT) na região de domínio associado a *forkhead* (FKH) presente na região N-terminal de FOXK2. Nesse códon ocorre a interação com BAP1 (Ji et al., 2014). Em células de neuroblastoma, BAP1 induz a apoptose via interação com a proteína 14-3-3 (Sime et al., 2018). A proteína adaptadora 14-3-3 está envolvida na regulação de várias vias de sinalização, como a apoptose, através da ligação com diversos alvos associados a essas vias (Sime et al., 2018).

Pelos algoritmos de predição de dano, essa mutação foi considerada deletéria e danosa pelo SIFT e PolyPhen2, respectivamente (Tabela 7).



TABELA 7 - MUTAÇÕES FOXK2 IDENTIFICADAS EM PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO

Casos	Mutação	dbSNP	Frequência 1000 genomes	Frequência GnomAD	Frequência ExAc	SIFT	SIFT score	Polyphen2	PolyPhen2 score	COSMIC	Referências
009	V582M	rs144638934	0,01%	0,01%	0,01%	D	0,001	P	0,883	-	-
032	P627L	rs35832203	1.2%	1%	1%	D	0,002	D	0,971	-	-
	R333W	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	D	0,016	P	0,888	-	-
034	V480M	rs759304962	N.D.	0.001%	0.001%	D	0,017	P	0,972	-	-
	T648M	rs148208901	N.D.	0,01%	0,02%	D	0,002	P	0,989	COSM 4685407	Gianakis et al., 2014; Gianakis et al., 2016
050	P627L	rs35832203	1.2%	1%	1%	D	0,002	D	0,971	-	-
	R58H	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	D	0,912	D	1	-	-

D: deletéria; P: patogénica

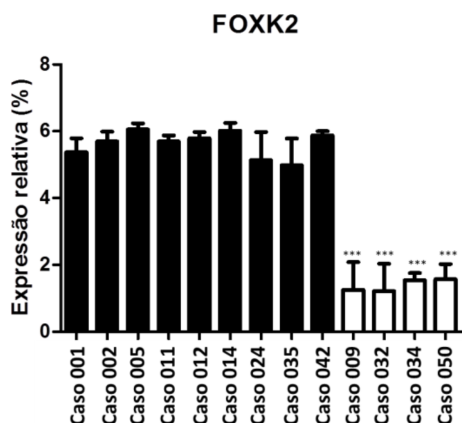
## 6.8 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÃO DOS GENE *FOXK2*.

### 6.8.1 - Avaliação da expressão de RNAm do gene *FOXK2* mutado.

Nos tumores dos pacientes com mutações em *FOXK2* foi analisada a expressão de RNAm deste gene.

Os pacientes estudados que apresentaram mutações em *FOXK2*, possuem a expressão de RNAm de *FOXK2* aproximadamente 5 vezes menor do que os pacientes controle ( $P \leq 0.05$ ), sugerindo que essas mutações contribuem para a diminuição da regulação da expressão de *FOXK2* (Figura 9).

Estudos demonstraram que baixos níveis de expressão de RNAm de *FOXK2* estão diretamente associado com baixa sobrevida em câncer gástrico (Liu et al., 2018) e com o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos, como a doxorrubicina e a cisplatina, em células tumorais de câncer de mama (Nestal de Moraes et al., 2015).



**Figura 9.** Análise de expressão de RNAm de *FOXK2* nos tecidos tumorais de pacientes de NB, comparados com os níveis do controle (001 a 042). Análises estatísticas pelo método Anova test t, demonstraram que a expressão de RNAm de *FOXK2* encontram-se significativamente diminuídas nos pacientes que apresentaram mutações em relação aos controles (\*\*\*  $P \leq 0.05$ ).

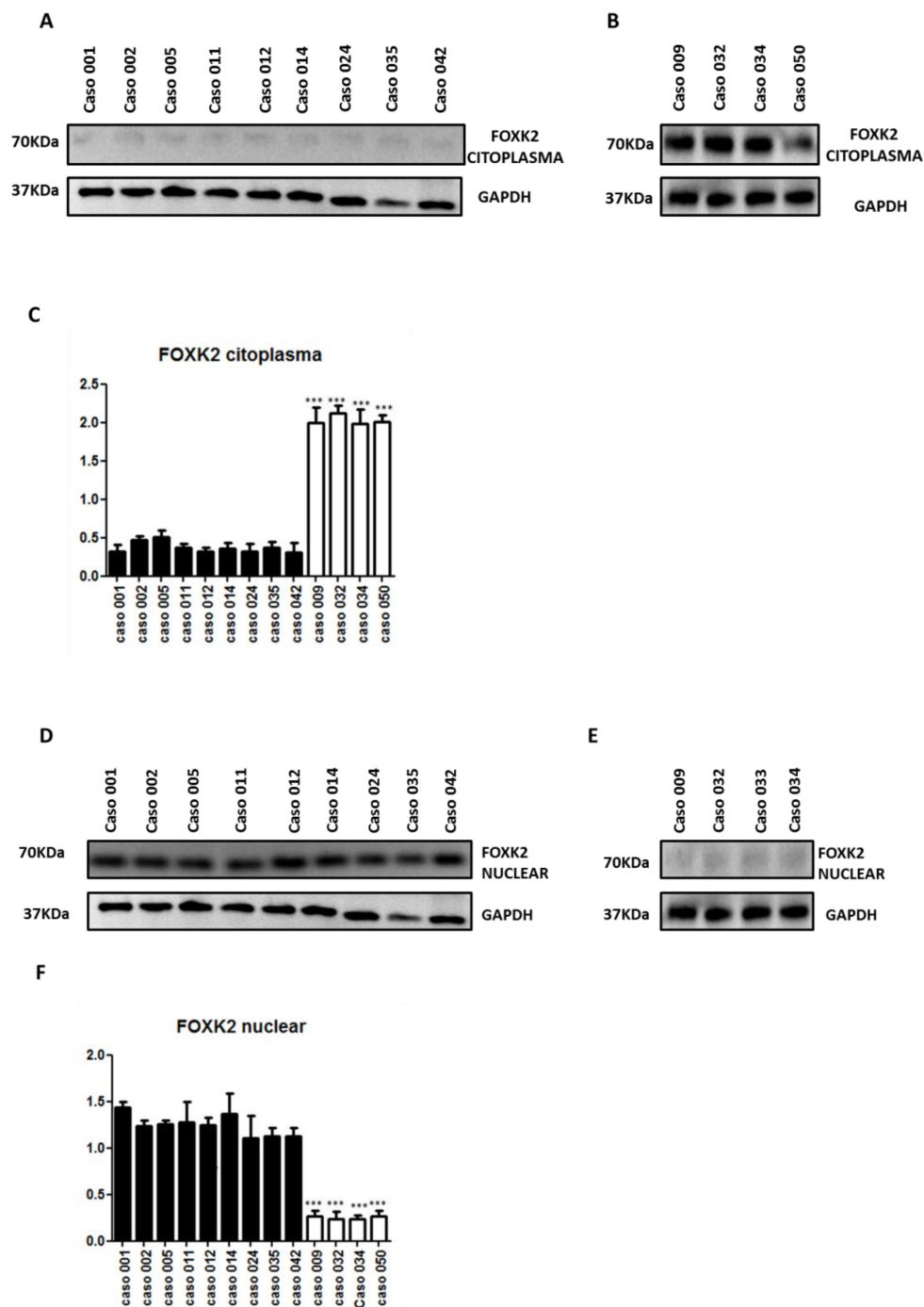
## 6.9 - SUBLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS FOXK2 MUTADAS.

Para as localizações de FOXK2 mutado no citoplasma ou núcleo das células tumorais dos pacientes 009, 032, 034 e 050, foram realizados ensaios pelo método de Western blot. Estas localizações são importantes, porque estão relacionadas com a atividade do fator de transcrição no núcleo, onde se liga ao DNA dos genes alvos.

Em relação aos níveis citoplasmáticos, nos pacientes com FOXK2 mutado, os níveis são significativamente maiores nesses pacientes (Figura 10B), em relação aos níveis detectados nos controles ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 10A).

Os resultados mostraram que os níveis de FOXK2 nuclear dos pacientes que apresentaram mutações em FOXK2 (Figura 10E), é significativamente menor em relação aos níveis de expressão apresentados pelo controle ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 10D).

Estes resultados sugerem que as mutações em FOXK2 sofreram alterações que impediram a proteína migrar para o núcleo, mantendo-se no citoplasma, onde são degradadas, como descrito por Marais, 2010. A ausência ou baixa expressão de FOXK2 está relacionada ao menor nível de atividade dessa proteína supressora tumoral (Liu et al., 2018). A ausência ou diminuição da atividade de FOXK2, também está associada a resistência a quimioterápicos, como observado por Nestal de Moraes, 2018.



**Figura 10.** Identificação da sublocalização nuclear e citoplasmática das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXK2* e avaliadas por western blot. (A) Localização das amostras controles comparados com (B) as expressões das amostras dos pacientes no citoplasma. (C) Análise estatística das expressões proteicas no citoplasma. As amostras dos pacientes controles apresentaram expressões significativamente menores que nos pacientes com mutações em *FOXK2* ( $p \leq 0.05$ ). (D) Localização das amostras controles, comparados com as amostras dos pacientes (E), no núcleo. (F) Análise estatística da expressão proteica

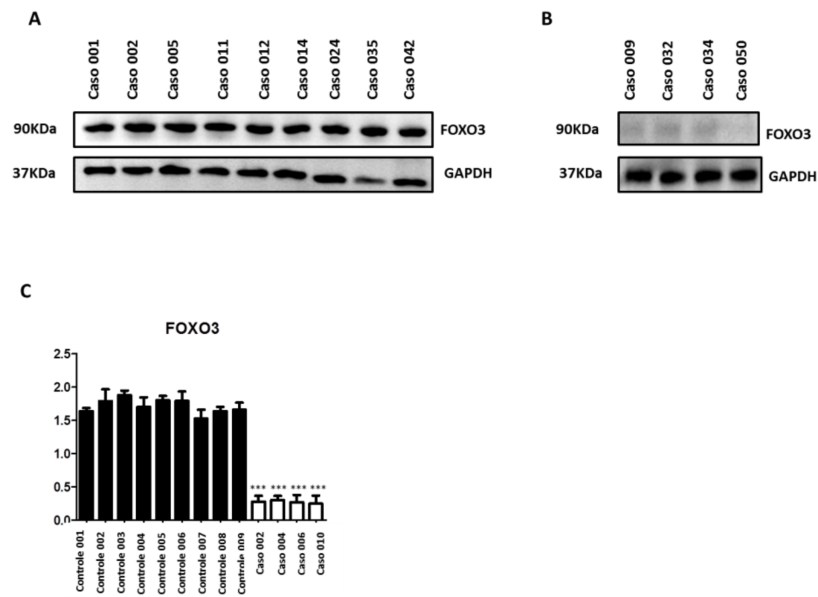
no núcleo. A expressão das amostras controles foi estatisticamente maior em relação as amostras dos pacientes FOXK2 mutado ( $p \leq 0.05$ ). GAPDH foi usado como controle endógeno. (\*\*\*)  $p \leq 0.05$ .

## 6.10 - ANÁLISE FUNCIONAL DE FOXK2.

FOXK2 ativa a expressão de outro fator de transcrição, FOXO3, ligando a sua região promotora (Nestal de Moraes et al., 2015). FOXO3 é um outro fator de transcrição com função de supressor de tumor que aumenta a sensibilidade aos quimioterápicos doxorrubicina, carboplatina e etoposídeo, através de seus genes alvos apoptóticos (Yao et al., 2018).

Os resultados demonstraram que nos pacientes com mutações em FOXK2, a expressão da proteína FOXO3, é significativamente menor, comparado com a expressão de FOXO3 apresentada pelos controles ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 11 A-C). Esses resultados sugerem que as mutações em FOXK2, podem ter relação com a baixa sobrevida e pior prognóstico nos pacientes de NB. Como observado em câncer de mama, FOXO3a media as funções citoestáticas e citotóxicas da doxorrubicina (Lam et al., 2013), reforçando esta possibilidade em relação aos pacientes com neuroblastoma. As antraciclinas são os medicamentos utilizados no protocolo de tratamento de NB.

Análises de sobrevivência em pacientes com câncer de mama demonstraram que a ausência da regulação de FOXO3 por FOXK2 está significativamente associada com pior prognóstico e baixa sobrevida nesses pacientes que receberam o tratamento quimioterápico convencional com doxorrubicina e cisplatina (Nestal de Moraes et al., 2015).



**Figura 11.** Análises da proteína pró apoptótica FOXO3. (A) Expressão de FOXO3 nos controles (001 a 042). (B) Expressão de FOXO3 nos pacientes 009, 032, 034 e 050 com mutações em FOXK2. Expressão proteica do FOXO3 (C) nas amostras tumorais dos pacientes com mutações identificadas em FOXK2 foram estatisticamente maior em relação aos controles (\*\*\*)  $p \leq 0.05$ ). GAPDH foi usado como controle endógeno.

## 6.11 - ANÁLISE ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS MUTADAS DO FOXK2.

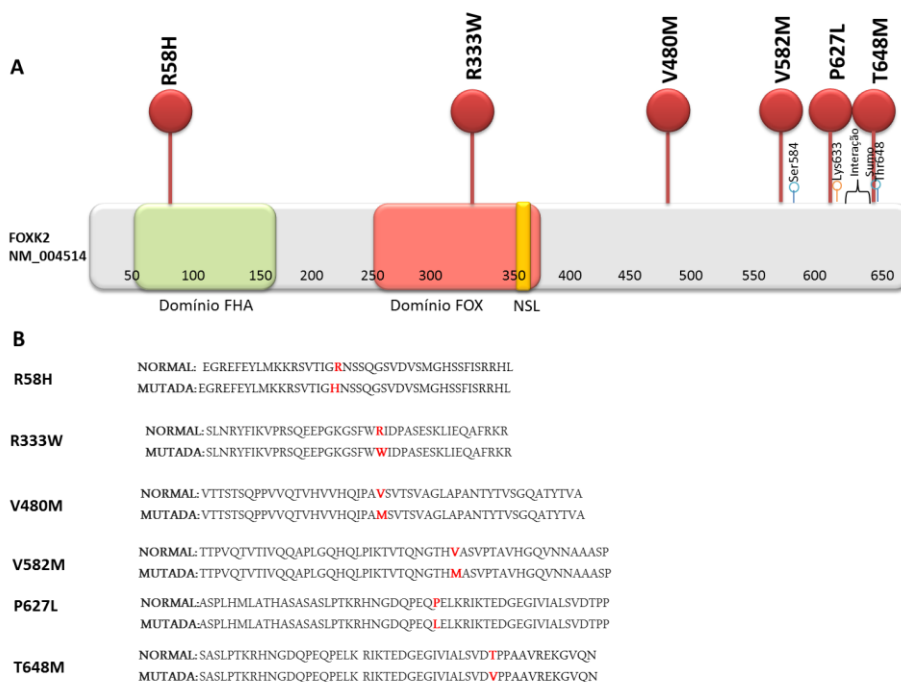
### 6.11.1 - LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA FOXK2.

FOXK2 é uma proteína composta por 660 aminoácidos, caracterizada pela presença de um domínio *forkhead* associado (FHA), um domínio FOX de ligação ao DNA e um domínio de sinal de localização nuclear (Figura 12). Geralmente as proteínas que possuem um domínio FHA, estão envolvidas em cascatas de sinalização celular, como de dano ao DNA, crescimento celular, transdução de sinal e regulação do ciclo celular (Almawi et al., 2017).

A mutação R58H se encontra na região FHA. A principal função dessa região é a interação entre o domínio FHA do FOXK2 e a região promotora de seus genes alvos. (Renhardt & Yaffe, 2013).

A mutação R333W se encontra dentro do domínio FOX (FKH) de ligação ao DNA. Variações de aminoácidos nessas regiões contribuem para alterações na especificidade de ligação dessa proteína (Tsai et al., 2006). Podem também prejudicar a ligação de FOXK2 a seus alvos supressores tumorais, como descrito por Tsai.

As mutações V480M, V582M, P627L e T648M identificadas se encontram na região C-terminal de FOXK2, logo após o final do domínio FOX; esta região é repleta de sítios regulatórios de modificações pós traducionais por fosforilação e SUMOilação (Nestal de Moraes, et al., 2019) (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema e alinhamento das sequências normal e mutadas de FOXC2 identificadas em pacientes de NB *MYCN* não amplificado. (A) Esquema da localização das mutações na proteína FOXC2, a mutação R58H localizada no domínio FHA, a mutação R333W localizada no domínio FKH. As mutações V480M, V582M, P627L e T648M localizadas na região C-terminal de FOXC2. (B) Alinhamento das sequências normais e mutadas das regiões descritas acima, em vermelho comparados com as regiões sem mutações, citadas como normais.

### 6.11.2 - MODELAGEM 3D IN SILICO DE FOXC2 DAS MUTAÇÕES DE FOXO3 E AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DAS MUTAÇÕES.

Utilizamos os softwares YASARA e o PyMol para obter a modelagem 3D e o impacto das mutações na estrutura de FOXC2. O Pymol foi utilizado para o cálculo da distância entre os átomos.

Além disto, analisamos as variantes pelo software FoldX para demonstrar os efeitos das mutações na estabilidade da proteína FOXM1. O software FOLDx calcula a



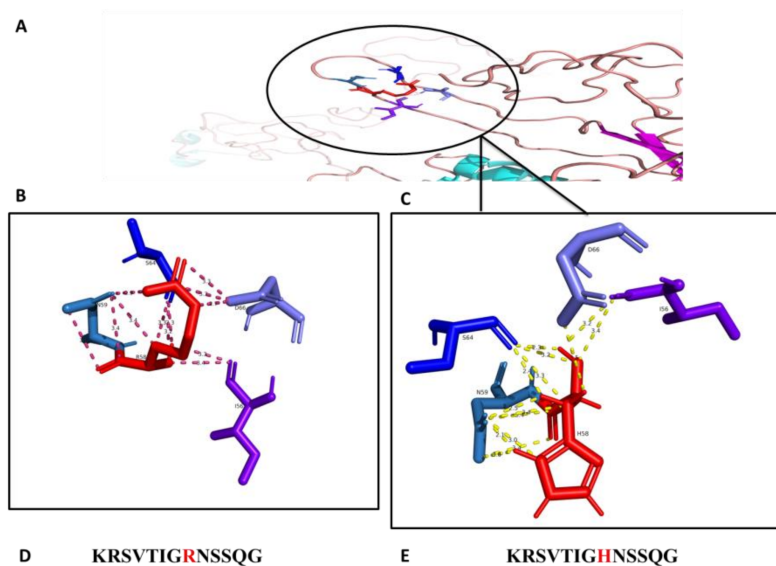
energia livre de uma macromolécula baseado em sua estrutura 3D, permitindo o cálculo da estabilidade da proteína e a análise de energia livre da formação do complexo (Schymkowitz et al., 2005).

As análises baseadas no potencial de energia através de valores obtidos pelo software FoldX demonstraram que todas as variantes levaram a uma diminuição da estabilidade das regiões alteradas.

Todas as mutações identificadas obtiveram valores de  $\Delta\Delta G$  negativos, indicando uma perda de estabilidade importante. A mutação R58H apresentou um valor de  $\Delta\Delta G$  de -0,72 kcal/mol, e a mutação R333W apresentou um valor de  $\Delta\Delta G$  de -0,27 kcal/mol.

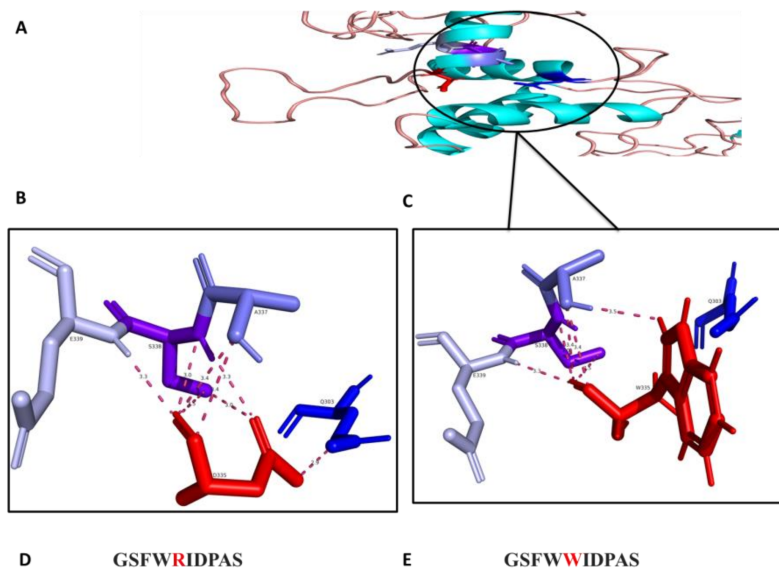
Os efeitos preditivos obtidos pelos cálculos de potencial de energia alterados demonstram que essas regiões mutadas desestabilizam a proteína FO XK2 podendo diminuir sua atividade de supressor tumoral pela perda de atividade do domínio FHA afetado pela mutação R58H e do domínio FKH afetado pela mutação R333W.

A modelagem 3D da mutação R58H de FO XK2 (Figura 13) demonstrou que nesta região houve uma alteração conformacional ocasionada pela troca entre um resíduo de arginina por um resíduo de histidina no domínio FHA. O distanciamento entre o resíduo mutado H58 e o resíduo de asparagina na posição 59 (N59), diminuiu em relação à conformação original (Figura 13). Nesta região passaram a existir mais pontes de hidrogênio entre esses dois resíduos (Figura 13), assim como ocorreu com outro resíduo de serina na posição 64 (S64). Entretanto, com o resíduo de ácido aspártico na posição 66 (D66), a mutação provocou perda de pontes de hidrogênio entre esses aminoácidos (Figura 13).



**Figura 13.** Modelagem estrutural na mutação R58H na região FHA de FOXK2. (A) Domínio FHA alterado pela mutação destacado em azul claro, azul escuro e vermelho. (B) Região R58, em vermelho, sem a mutação com suas interações e distanciamento originais: asparagina 59 em azul claro; serina 64 em azul escuro; ácido aspártico 66 em lilás; isoleucina 56 em roxo. (C) Região mutada H58 em vermelho com perda da interação com ácido aspártico 66 em lilás, e ganho de pontes de hidrogênio com asparagina 59 em azul claro e serina 64 em azul escuro. (D) Sequência normal de FOXK2. (E) Sequência da mutação R58H destacada em vermelho do resíduo alterado.

A mutação R333W também provocou uma alteração conformacional importante na região FKH de FOXK2. A alteração de um resíduo de arginina (básico) por um resíduo de ácido aspártico (ácido) levou a alterações de distanciamento e interações de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos nessa região. Na forma mutada, o resíduo W333 perde totalmente a interação com o resíduo de glutamina na posição 303 (Q303) (Figura 14) e perde algumas interações por pontes de hidrogênio com o resíduo de alanina na posição 337 (A337).



**Figura 14.** Modelagem estrutural da mutação R333W na região do domínio FKH de FOXK2. (A) Domínio FKH alterado pela mutação destacado em azul claro, azul escuro e vermelho. (B) Região R333, em vermelho, sem a mutação com as suas interações e distanciamento originais: ácido glutâmico 339 em lilás; serina 338 em roxo; alanina 337 em azul claro; glutamina 303 em azul escuro. (C) Região mutada W333 em vermelho com a perda da interação com a glutamina 303 em azul escuro, e perdas de pontes de hidrogênio com a alanina 337 em azul claro. (D) Sequência normal de FOXK2. (E) Sequência da mutação R333W destacada em vermelho do resíduo alterado.

Todas as mutações identificadas em FOXK2 nos pacientes de NB foram previamente consideradas como patogênicas e/ou possivelmente patogênicas pelos algoritmos de predição de dano (Tabela7), e também revelaram alterações na estrutura da proteína em comparação com a proteína nativa pelo software YASARA (Figura 14). Essas variantes podem induzir a conformação espacial e consequentemente a desestabilização da regulação e função de FOXK2. Perdas e ganhos de ligações de

hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes de sal devido a SNPs deletérios podem afetar a estrutura e função da proteína (Rose et al., 1993; Shirley et al., 1994).

### C) *FOXO3A*

#### 6.12 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM *FOXO3A* NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA.

As análises de sequenciamento de exoma completo identificaram 3 mutações no gene *FOXO3a*, presente nos tumores de 4 pacientes estudados (casos 010, 033, 034 e 037).

Dessas mutações foram identificadas duas em heterozigose, não sinônimas no éxon 2 (chr6: 108985481 G>A; S482N) e (chr6:108984674 A>G; N213S), que originam substituições missenses, e uma mutação de inserção (chr6: 108985176 dupG; D380fs), que produz uma mutação em *frameshift* (Tabela 8).

A mutação em *frameshift* c.1141dupG (p.D380fs), foi encontrada nos pacientes 010 e 034. Esse tipo de mutação resulta na inserção de aminoácidos incorretos dentro da proteína, alterando a matriz de leitura. Desta maneira, as mutações do tipo inserção em *frameshift* causam proteínas anormais com um tamanho maior que a proteína original. Dentro da região conservada CR2 (aa331 a aa478), pode interferir na ligação de FOXO3 a CBP/p300 e causar prejuízos a sua atividade transcricional (Wang et al., 2012). Além disso, essa mutação está localizada dentro de uma região onde ocorre a interação de FOXO3a com p53 (Calissi et al., 2021; Wang et al., 2008). Esta mutação ainda não foi descrita em nenhum tipo de câncer (Tabela 8).

A mutação missense em FOXO3 c.1445G>A (p.S482N), encontrada nos pacientes 033 e 034, altera o nucleotídeo guanina no códon (AGC) pelo nucleotídeo adenina (AAC), levando a troca de um resíduo de serina por um resíduo de asparagina na posição 482, está no domínio KIX na região C-terminal de FOXO3.

Neste domínio KIX, ocorre a sua ligação com seu co-fator CBP/p300, necessário para o funcionamento de sua função supressora de tumor. Estas mutações no domínio KIX, podem impedir que esta interação entre coativadores e o FOXO3, prejudicando a transcrição dos alvos pró apoptóticos, como Bim, p21 e p27KIP1, pelo FOXO3 (Wang et al., 2012). Esta mutação já foi identificada em carcinoma de tireóide e leucemia mielóide aguda (COSM5424494). Porém, ainda não foi descrita em neuroblastoma. A sua frequência de 0.001% e 0.002% nos bancos de dados genômicos GnomAD e ExAC, respectivamente. Foi considerada tolerado pelo SIFT com pontuação de 0,673, e patogênica pelo PolyPhen2 com uma pontuação de 0,715. Essa análise varia pois cada um dos algoritmos de predição de dano, consultados avaliam aspectos diferentes da mutação, o SIFT avalia a troca no nucleotídeo no genoma e o PolyPhen2 as alterações na sequência proteica (Tabela 8).

### **Caso 037**

A paciente 037 apresentou uma mutação (c.638A>G :p.N213S), no códon 213 que substitui uma asparagina (AAT) por uma serina (AGT).

Essa mutação encontra-se na região do domínio *Forkhead* (FKH). A região FKH do fator de transcrição FOXO3 é importante porque permite a ligação à região promotora de seus genes alvos. A sua patogenicidade é definida como deletéria com um score de 0 pelo SIFT e patogênica com um score de 0,877 pelo PolyPhen2 (Tabela 8). A frequência na população ainda não foi descrita nos banco de dados genômicos. Além disso, esta mutação ainda não foi descrita em nenhum tipo de câncer.

**TABELA 8 - VARIANTES FOXO3A IDENTIFICADAS EM PACIENTES COM NEUROBLASTOMA MYCN NÃO AMPLIFICADO**

Casos	Mutação	dbSNP	Frequência 1000 genomes	Frequência GnomAD	Frequência ExAC	SIFT score	SIFT score	Polyphen2 score	Polyphen2 score	COSMIC	COSMIC	Referências
010	D380fs	rs34133353	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	-	-	-	-
033	S482N	rs199833934	N.D.	0.001%	0.002%	T	0,673	P	0,715	COSM 5424494	-	-
034	S482N	rs199833934	N.D.	0.001%	0.002%	T	0,673	P	0,715	COSM 5424494	-	-
	D380fs	rs34133353	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-	N.D.	-	-	-	-
037	N213S	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	D	0	P	0,877	-	-	-

**D: Deletéria; P: Patogênica; T: tolerada; N.D: não descrito**

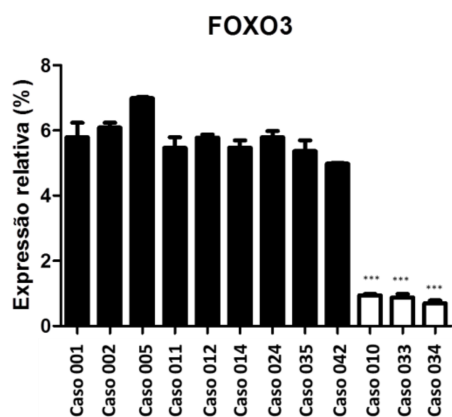
## 6.13 - ANÁLISE FUNCIONAL DAS MUTAÇÕES DO GENE *FOXO3A*.

### 6.13.1 - Avaliação da expressão de RNAm do gene *FOXO3a* mutado encontrado nos pacientes em estudo.

Analisamos a expressão de RNAm de *FOXO3a* nos tumores dos pacientes que apresentaram mutações neste gene.

Os pacientes com as mutações em *FOXO3a* apresentaram as concentrações do RNAm 6 vezes menor comparados aos controles ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 15).

Em diversos tipos de câncer, as concentrações diminuídas de RNAm de *FOXO3a*, estão diretamente relacionados ao pior prognóstico e resistência a quimioterápicos, pela diminuição da regulação de seus alvos pró apoptóticos (Yao, et al., 2018).



**Figura 15.** Análises de expressão de RNAm de *FOXO3a* nos pacientes de NB.

Comparados com os níveis do controle (001 a 042). Análises estatísticas pelo método Anova test t mostraram que a expressão de *FOXO3a* encontram-se significativamente diminuída nos pacientes que apresentaram mutações em comparação com os controles (\*\*\*  $P \leq 0.05$ ).



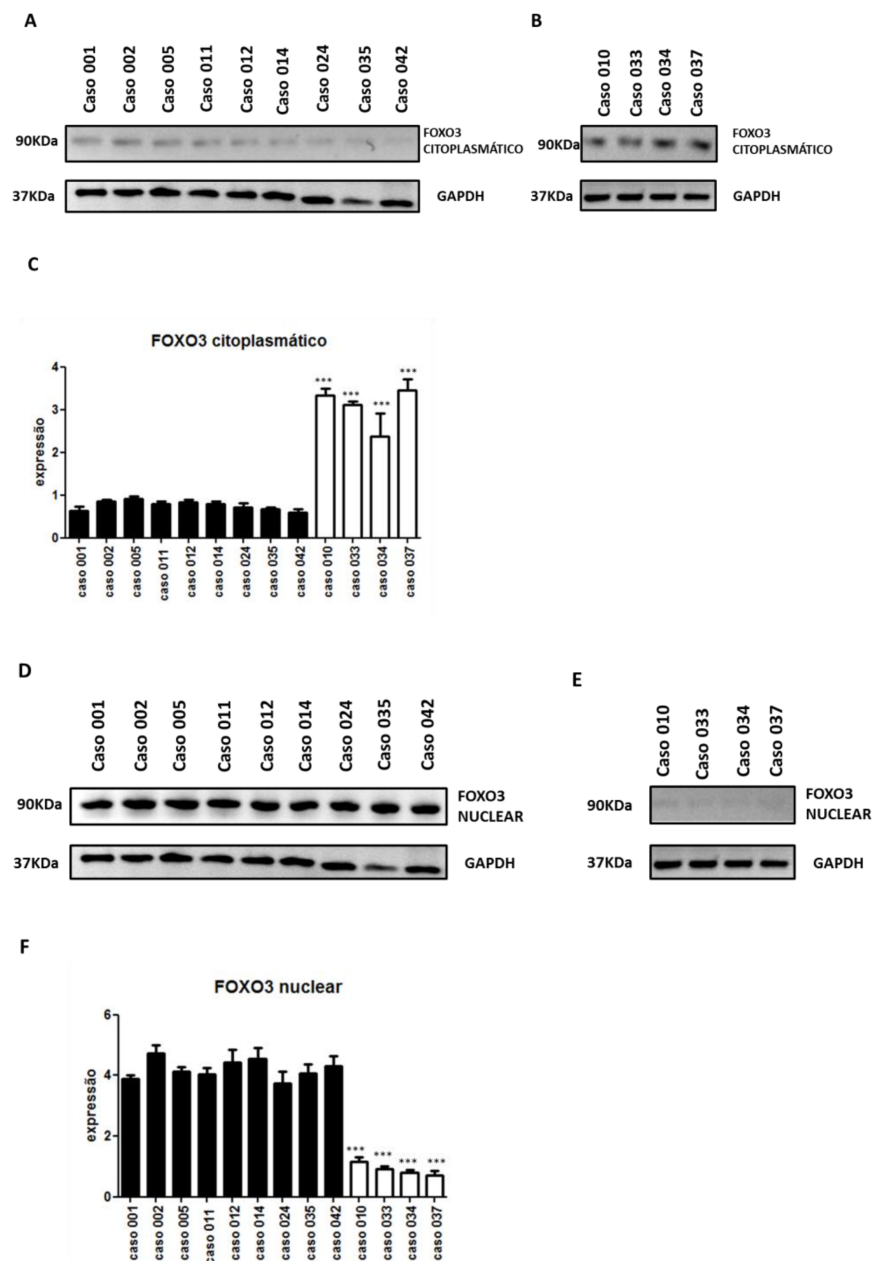
#### **6.14 - ANÁLISE DA SUB-LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS FOXO3.**

Em NB, FOXO3 está associado com a sensibilização para apoptose induzida por etoposídeo e doxorrubicina (Obexer et al., 2009). Além disso, evidências demonstram que a localização celular alterada de FOXO3 está associada com tumorigênese e progressão do câncer (Yao et al., 2018).

Para identificar localização dessas mutações p.D380fs e p.S482N, no núcleo ou citoplasma das células tumorais desses pacientes, foram realizados ensaios de western blot, com amostras de proteínas dos tumores dos pacientes com NB, como descrito em material e métodos.

Os resultados demonstraram que as mutações FOXO3 encontravam-se no citoplasma e não no núcleo (Figura 16 A-F). As concentrações das proteínas mutadas no citoplasma foram significativamente maiores que as concentrações observadas no controle ( $p \leq 0.05$ ) (figuras 16 A-B). O mesmo não foi observado nas proteínas FOXO3 mutadas localizadas no núcleo em relação aos controles (16 D-E) ( $p \leq 0.05$ ).

Esses resultados sugerem que *FOXO3a*, poderia ter a sua atividade como supressor de tumor diminuída devido à sua localização no citoplasma onde possivelmente sofreu o processo de degradação, como descrito por Wang et al., 2016.



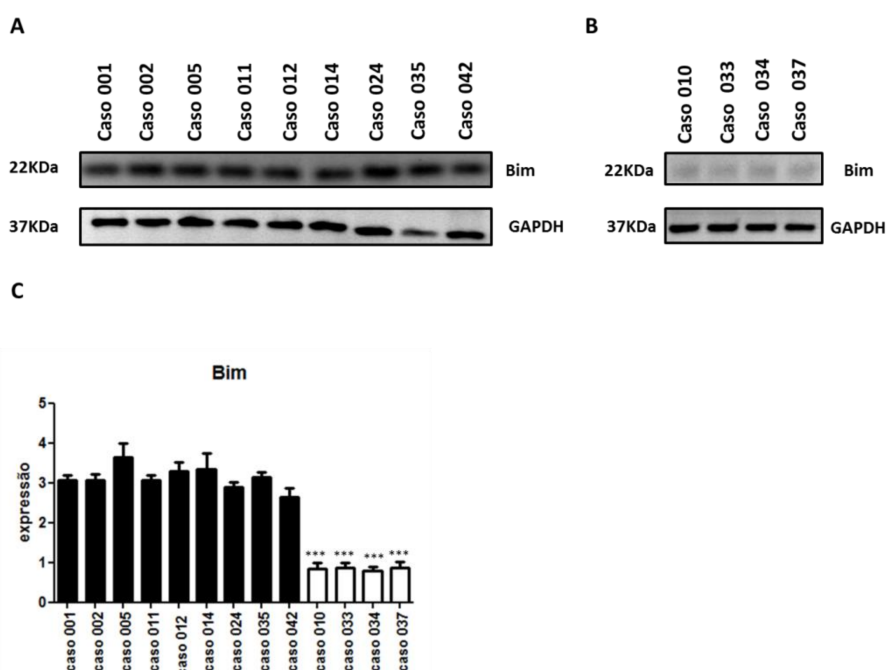
**Figura 16.** Identificação da sublocalização das proteínas geradas pelas mutações do gene *FOXO3a*. (A) Expressão das proteínas dos tumores dos pacientes com mutações *FOXO3* no citoplasma. (B) Mutações proteicas no citoplasma são significativamente maiores em relação ao controle ( $P \leq 0.05$ ). (C) Expressão das proteínas dos tumores dos pacientes com mutações *FOXO3* no núcleo ( $P \leq 0.05$ ). (D) Fração proteica das mutações *FOXO3* nucleares são significativamente menores que a proteína controle ( $P \leq 0.05$ ). GAPDH foi usado como controle endógeno (\*\*\*) ( $P \leq 0.05$ ).

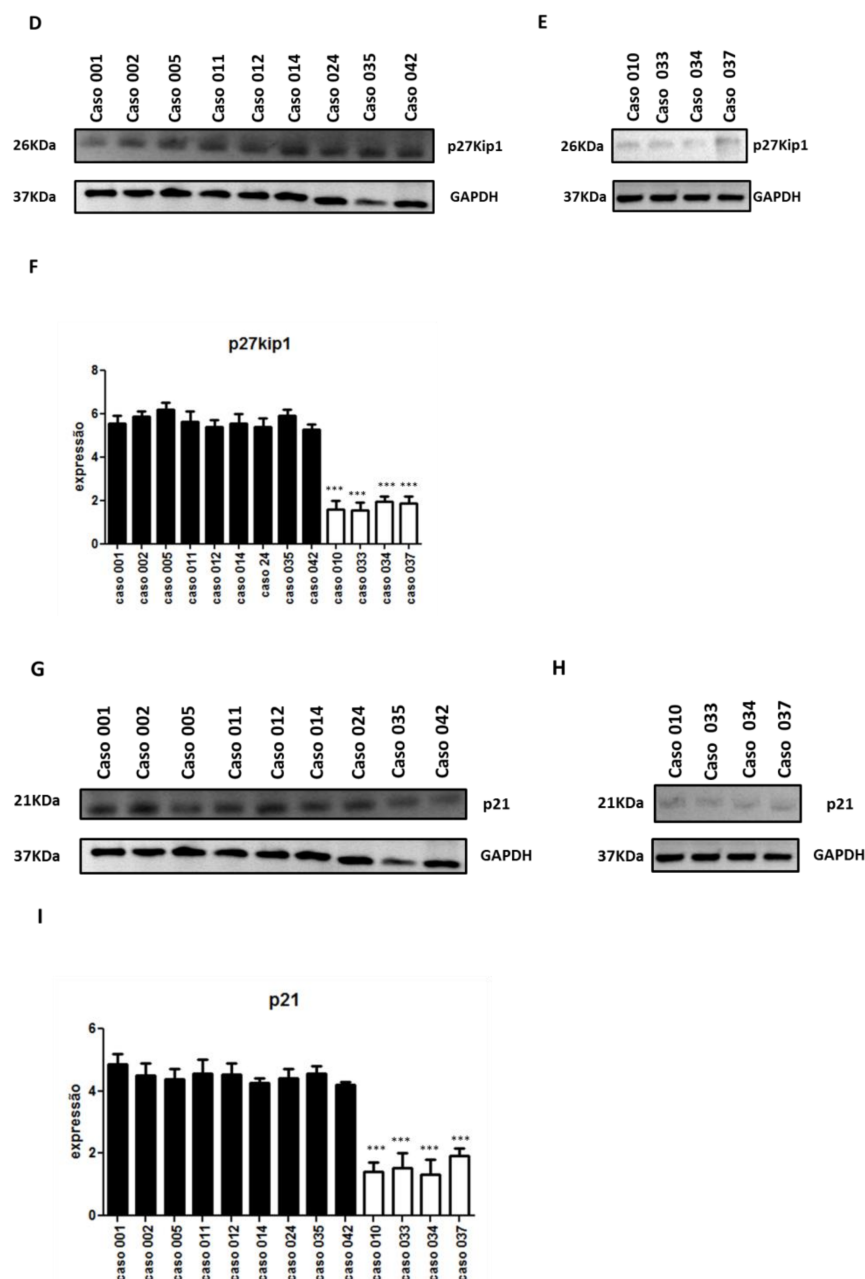
## 6.15 - ANÁLISE DAS MUTAÇÕES FOXO3 NA REGULAÇÃO DAS PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS.

Em resposta ao tratamento quimioterápico com etoposídeo, carboplatina e doxorubicina, FOXO3 ativa a morte celular via apoptose a partir do aumento da regulação da expressão de Bim (Sunters et al., 2003; Obexer et al., 2009). O FOXO3 também controla a proliferação negativamente através da regulação de inibidores do ciclo celular P27<sup>kip1</sup> (Mayahi et al., 2019) e p21 (Hauck et al., 2007).

A análise dos efeitos das mutações p.D380fs, p.P456Q e p.S482N na regulação das proteínas pró-apoptóticas, Bim, P27<sup>kip1</sup> e p21, foi feita nas amostras tumorais dos pacientes através de western blot.

As proteínas Bim, p27 e p21 estavam significativamente menos expressas nas amostras dos pacientes com mutações em FOXO3 em relação ao controle ( $P \leq 0.05$ ), sugerindo que estas mutações afetaram a capacidade de ativar a expressão dos genes alvos de FOXO3, Bim (Figura 17 A-C), p27 (Figura 17 D-F) e p21 (Figura 17 G-I).





**Figura 17.** Análise da expressão proteica pró-apoptótica de Bim, P27<sup>kip1</sup> e p21 através de western blot. (A, C e G) Expressão de Bim, P27<sup>kip1</sup> e p21 nos controles, respectivamente. (B, E e H) Expressão de Bim, P27<sup>kip1</sup> e p21 nas mutações ( 010, 033, 034 e 037) respectivamente. Expressão proteica Bim (C), P27<sup>kip1</sup> (F) e p21 (I) nas amostras tumorais dos pacientes com mutações identificadas em *FOXO3a* foram significativamente menores em relação aos controles (\*\*\*)  $p \leq 0.05$ ). GAPDH foi usado como controle endógeno.

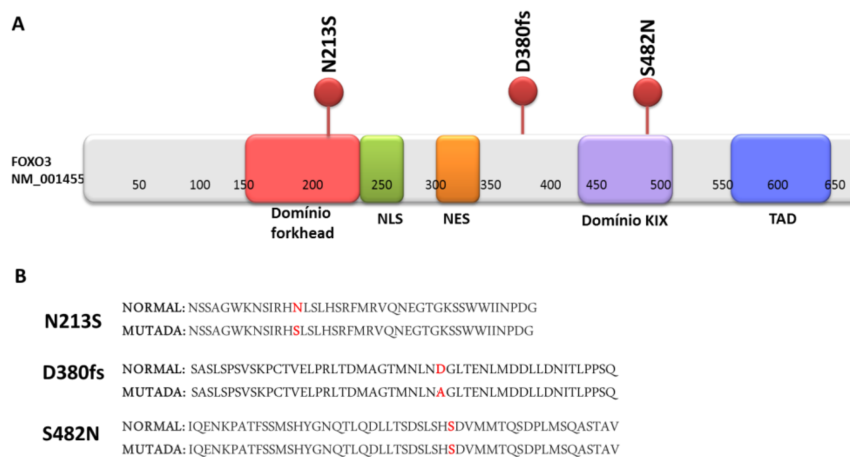
## 6.16 - ANÁLISE ESTRUTURAL DAS MUTAÇÕES DA PROTEÍNA FOXO3.

### 6.16.1 - LOCALIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES IDENTIFICADAS NA ESTRUTURA DE FOXO3.

A proteína FOXO3 é composta por 5 domínios: um domínio FOX de ligação ao DNA (FKH) altamente conservado, uma sequência de aminoácidos denominada sequência de localização nuclear (NSL), uma sequência de aminoácidos denominada de sequência de exportação nuclear (NES), um domínio de transativação (TAD) e um domínio KIX (Liu et al., 2018) (Figura 18).

A mutação S482N encontra-se no domínio KIX (Figura 18). Este domínio é necessário para a ligação dos co-fatores (CBP/p300), necessários para a transcrição dos genes alvos (Wang et al., 2012).

A mutação de inserção em *frameshift* D380fs, está localizada dentro da região conservada 2 (CR2) (Figura 18). Esta região também é um sítio para a ligação de FOXO3, com o co-fator CBP/p300, necessário para a sua atividade transcricional (Wang et al., 2012).

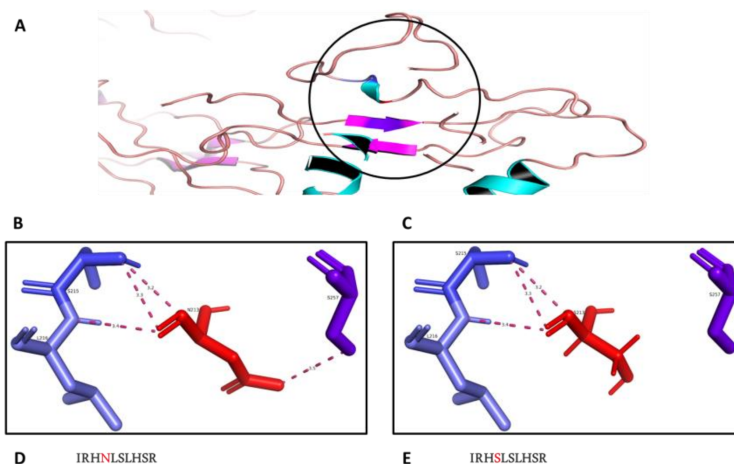


**Figura 18.** Estrutura da proteína FOXO3 com a presença das mutações identificadas em paciente de NB. A-) Estrutura com as mutações D380fs, e a mutação S482N presentes no domínio KIX, e a mutação N213S no domínio *forkhead*. Em vermelho, o domínio *forkhead* de ligação ao DNA; em verde, a região de sequência de localização nuclear (NLS); em laranja, a região da sequência de exportação nuclear (NES); em roxo a região KIX de ligação de FOXO3 a seus co-ativadores; em azul, o domínio de transativação (TAD).

### 6.16.2 - MODELAGEM 3D IN SILICO DE FOXO3 DAS MUTAÇÕES DE FOXO3 E AVALIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DAS MUTAÇÕES.

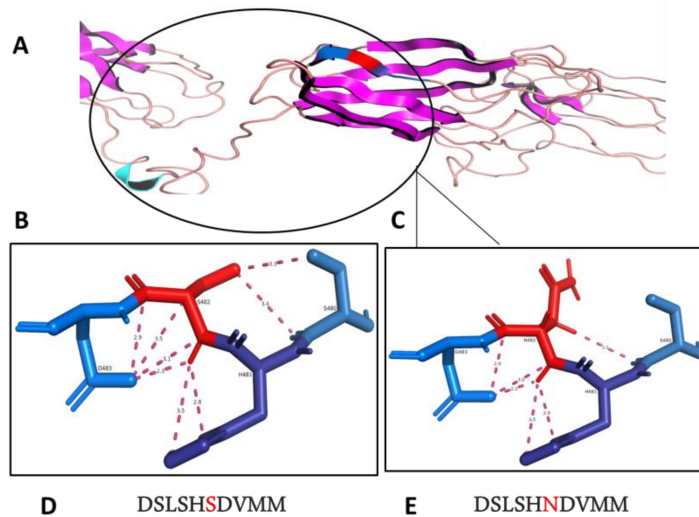
Para análise do impacto na conformação das mutações do FOXO3, e avaliar melhor estas estruturas patogênicas para futura aplicação do tratamento do neuroblastoma, foram construídos modelos 3D das regiões afetadas pelas mutações N213S e S482N, através do programa YASARA. Também foram avaliados a energia livre  $\Delta\Delta G$  kcal/mol libradas por essas substituições. As análises de conformação espacial e cálculos de estabilidade baseados na energia livre não foram possíveis para a mutação de inserção em *frameshift*.

A mutação N213S provocou a perda da interação com um resíduo serina 257 dentro do domínio *forkhead* (Figura 19), que pode causar prejuízos à ligação de FOXO3 a seus alvos transcrpcionais, além disso a mutação provoca uma desestabilização da região apresentando um  $\Delta\Delta G$  com valor -0,47 kcal/mol.



**Figura 19.** Modelagem estrutural da mutação N213S na região de domínio forkhead de FOXO3. (A) Domínio *forkhead* alterado pela mutação destacado em azul claro, azul escuro e vermelho. (B) Região N213, em vermelho, sem a mutação com suas interações e distanciamento originais: serina 215 em azul, leucina 216 em lilás e serina 257 em roxo. (C) Região mutada S213 em vermelho com a perda da interação com a serina 275, em roxo. (D) Sequência normal de FOXO3. (E) Sequência da mutação N213S destacada em vermelho do resíduo alterado.

A troca de uma serina por uma asparagina gerada pela mutação S482N, leva a alteração conformacional dessa região no resíduo alterado, além de modificações no distanciamento dos aminoácidos que interagem com esse resíduo. Entre essas alterações, ocorre uma mudança no distanciamento com a região D483 e S480 que pode levar a alteração conformacional do domínio KIX de FOXO3 (Figura 20). Alterações nesse domínio prejudicam a ligação de co-fatores e consequentemente o recrutamento da maquinaria transcricional e transcrição dos genes alvo de FOXO3 (Wang et al., 2012). Essa alteração provocou uma desestabilização,  $\Delta\Delta G$  com valor  $-0,63$  kcal/mol, dessa região que reforça a hipótese de prejuízo na ligação aos co-fatores.



**Figura 20.** Modelagem estrutural da mutação S482N na região de domínio KIX de FOXO3. (A) Domínio KIX alterado pela mutação destacado em azul claro, azul escuro e vermelho. (B) Região S482, em vermelho, sem a mutação com suas interações e distanciamento originais: serina 480 e ácido aspártico 483 em azul; histidina 481 em roxo. (C) Região mutada N482 em vermelho com as alterações no distanciamento e novas interações localizadas dentro do domínio KIX: serina 480 e ácido aspártico 483 em azul; histidina 481 em roxo. (D) Sequência normal de FOXO3. (E) Sequência da mutação S482N destacada em vermelho do resíduo alterado.



## 7.0 - DISCUSSÃO

O neuroblastoma é um tumor infantil muito agressivo, frequentemente metastático e que apresenta altos índices de resistência ao tratamento (Bagatell et al., 2016). Assim, a aplicação de medicina personalizada utilizando terapias alvo, torna-se interessante, com intuito de aumentar a sobrevida dos pacientes. Sendo assim, é importante levar em consideração todos os tipos de informações disponíveis, como as alterações específicas do tumor de cada indivíduo, as características da mutação e expressão do gene mutado, pois esses modelos têm o potencial de contribuir para a seleção dos quimioterápicos para compor um regime de multi – agentes de tratamento e assegurar uma resposta ideal para cada paciente individual (Han et al., 2021).

Os alvos terapêuticos potenciais do NB são classificados em quatro categorias: i) genes ativados por amplificação, mutação, translocação ou superexpressão autócrina; ii) genes inativados por deleção, mutação ou silenciamento epigenético; iii) genes associados a membrana expressos na maioria dos NBs, pouco em outros tecidos; ou iv) genes alvo comuns relevantes para o NB, bem como para outros tumores (Brodeur et al.2006).

A alteração de expressão de fatores de transcrição, como membros da família FOX, que podem influenciar diversos processos biológicos como o ciclo celular, reparo de dano ao DNA e a apoptose, estão associados a quimioresistência em diversos tipos de câncer (Lam et al. 2013).

Algumas informações sobre mutações patogênicas ou deletérias identificadas por programas de predição de danos podem ser enriquecidas com análises da conformação estrutural da proteína.

Neste estudo com uma coorte de 50 pacientes com neuroblastoma MYCN não amplificado, 11 pacientes apresentaram recidiva e foram a óbito, sendo que 4 pacientes apresentaram mutações no gene *FOXM1* ( p.A402E, p.G142E, p.R350C, p.P673L) , 4 pacientes apresentaram mutações em *FOXK2* (R58H, R333W, V582M, P627L, V480M e T648M) e em 4 pacientes foram identificadas mutações em *FOXO3* (S213N, D380fs e S482N). Todas as mutações presentes neste estudo e encontradas nos membros da família FOX são consideradas deletérias e/ou patogênicas pelos algoritmos de predição de dano SIFT e Polyphen2).

Estes 3 membros da família FOX (*FOXM1*, *FOXK2* e *FOXO3*) estão associados a resistência ou sensibilidade a quimioterápicos, como doxorrubicina e carboplatina (Zona et al., 2014; Nestal de Moraes et al., 2015; Yao et al., 2018).

Nossas análises demonstraram ainda que as mutações encontradas no gene *FOXMI1B* estão localizadas em diferentes domínios na estrutura do *FOXM1*, aumentando a sua atividade de oncogene. A mutação P673L se encontra entre sítios importantes para a fosforilação localizados no domínio TAD. Enquanto que a mutação G142E está localizada no domínio de repressão NRD, e as mutações R350C e A402E encontram-se na região entre o domínio FOX de ligação ao DNA e entre os sítios importantes para o processo de SUMOilação. Todas essas mutações já haviam sido previamente identificadas em outros tipos de câncer e catalogadas no COSMIC, mas ainda não haviam sido descritas em neuroblastoma. Como resultado destas mutações, foi possível observar os aumentos das expressões das proteínas anti-apoptóticas BCL2 e BIRC5/Survivin, reforçando ainda a hipótese de resistência e progressão da doença nestes pacientes. Estas mutações podem ter levado ao pior prognóstico destes pacientes com estágio 1 e 4.

O *FOXK2* e *FOXO3* são genes supressores de tumor e estão associados ao aumento da sensibilidade a quimioterápicos (Nestal de Moraes et al., 2015) . Foi observado em estudos de câncer de mama, que o gene *FOXK2* liga se a região promotora de *FOXO3a* e induz sua transcrição , aumentando a sensibilidade das células tumorais a epirubicina e cisplatina (Nestal-Moraes et. al 2015).

Além disto, uma das mutações missense R58H encontrada na paciente 050 foi identificada no domínio *forkhead* associado (FHA) da proteína FOXK2. Esse domínio é característico de proteínas envolvidas na transdução de sinais associadas com transcrição, reparo de danos ao DNA e ciclo celular ( Reinhardt & Yaffe, 2013). O tamanho desse domínio pode variar entre as proteínas, porém inclui resíduos conservados de arginina e asparagina. Estes resíduos conferem a especificidade na ligação e direcionam os domínios aos resíduos fosfotreonina alvos (Huang & Elledge, 2000). O fator de transcrição FOXK2 é um dos principais ativadores do FOXO3 (Nestal de Moares et al., 2015). Mutações na região do domínio FHA podem prejudicar também a ligação de FOXK2 a BAP1, como observado por Ji et al., 2014. Em neuroblastoma, a atividade de BAP1 induz a morte celular via interação com 14-3-3 (Sime et al., 2018).

Outra mutação importante foi identificada nos tumores primário e recidivado da paciente 032, a mutação (R333W) encontra-se no domínio de *forkhead* de ligação ao DNA, onde ocorre a ligação de FOXK2 a seus alvos apoptóticos e o FOXO3. Alterações nessa região podem impedir a ligação e conseqüentemente a transcrição desses alvos, associados a sensibilidade a quimioterapia levando ao desenvolvimento de resistência ao tratamento, observada nesse caso.

A modelagem da estrutura 3D da proteína é essencial para o desenvolvimento de novas estruturas, associadas a estas mutações, que podem levar futuramente ao desenvolvimento de drogas e auxiliar no tratamento do neuroblastoma. A modelagem da estrutura de FOXK2 com as mutações R58H e R333W demonstraram que os domínios mutados (FHA e FKH), sofreram alterações estruturais que desestabilizaram com a perda de energia livre (Kcal/mol) e levaram a diminuição do alvo pró apoptótico FOXO3, explicando o desenvolvimento de resistência ao tratamento nesses pacientes.

As outras mutações identificadas no FOXK2 ( V480M, V582M, P627L e T648M) estão localizadas na região C-terminal, rica em regiões de fosforilações, onde ocorrem modificações pós transcricionais. A fosforilação de *FOXK2* é mediada por CDK1 e ciclina B, que afetam a estabilidade induzindo a sua degradação e prejudicando a sua atividade transcricional (Marais et al., 2010). Isto poderia justificar a permanência deste fator de transcrição no citoplasma, com degradação da proteína, e diminuição do seu gene alvo o *FOXO3A*, como observado pela análise de western blot. Como resultado da diminuição do FOXO3 no núcleo, haveria uma resistência maior aos quimioterápicos convencionais, como doxorrubicina e carboplatina (Lam et al., 2013).

*FOXO3a* ativa genes envolvidos na apoptose (Chen et al., 2017) e aumenta a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos etoposídeo, carboplatina e doxorrubicina (Sunters et al., 2003; Obexer et al., 2009). Além de controlar a proliferação celular, através da regulação de inibidores do ciclo celular P27<sup>kip1</sup> (Mayahi et al., 2019) e p21 (Hauck et al., 2007).

Os pacientes que apresentavam mutações patogênicas em *FOXO3A* (p. N213S, p.S482N e p.D380fs), apresentaram também resistência aos quimioterápicos etoposídeo, doxorrubicina e carboplatina.

A mutação patogênica p.N213S ainda não foi descrita em nenhum tipo de câncer. Esta mutação encontra-se na região do domínio *forkhead*. Todos os membros da família FOX possuem um domínio *forkhead* altamente conservado, onde se ligam as sequências conservadas de seus genes alvos (Lam et al., 2013). Alterações nessa região podem afetar a ligação de FOXO3 com seus alvos pró apoptóticos nos pacientes com MYCN não amplificado como demonstrado neste estudo, em que os alvos Bim, p21 e p27kip1 apresentam diminuição da expressão em relação aos controles.

A mutação p.S482N já foi descrita em carcinoma de tireóide e leucemia mieloide aguda (COSM5424494). Essa mutação encontra-se no domínio KIX de FOXO3, onde liga-se o co-fator ativador CBP/p300. Essa interação contribui para determinar o destino celular (Wang et al., 2012). Além disto, esta mutação provoca uma alteração conformacional e perda de estabilidade nessa região, sugerindo a perda da capacidade do FOXO3 de ligar-se a estes co-fatores e assim transcrever seus alvos apoptóticos (p21 e p27), como observado nos pacientes que apresentaram essa mutação.

A modelagem 3D das mutações missenses N213S e S482N, demonstrou que ambas causam alterações conformacionais que desestabilizam a região afetada, com perda de energia livre (kcal/mol), reforçando a hipótese de que a mutação N213S, presente no domínio *forkhead*, impede a ligação de FOXO3 a seus alvos transcricionais, e que a mutação S482N impede a ligação de FOXO3 a seus co-fatores, justificando a ausência de expressão de seus alvos pró apoptóticos nesses pacientes.

As mutações p.S482N e p.D380fs estão no sítio de ligação de FOXO3 ao domínio KIX de seus co-ativadores, mais precisamente na região conservada CR2, principal envolvido na ativação de alvos de FOXO3.

Greer et al., 2007, demonstraram que as alterações entre os aminoácidos na posição 399 até a posição 626, como observado na mutação p.S482N, diminuem a

fosforilação de FOXO3-AMPK, interferindo a sua entrada no núcleo e prejudicam a transativação de seus alvos pró apoptóticos. Isso poderia justificar em parte a presença do FOXO3 no citoplasma desses pacientes com a mutação de inserção em *frameshift* D380fs. A mutação em questão insere uma base G deslocando o quadro de leitura, resultando em uma sequência de aminoácidos diferente da original, ou seja, a proteína traduzida a partir do códon 380 não apresenta mais a sequência original de FOXO3 e todos os resíduos alvos da fosforilação por AMPK podem ter sido perdidos.

As mutações identificadas nos genes supressores tumorais FOXK2 (R58H e R333W) e FOXO3a (N213S e S482N) estão presentes em regiões conservadas. Essas mutações induziram a mudança da conformação espacial e conseqüentemente a desestabilização dessas proteínas. A perda e ganho de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas devido a presença de SNPs deletérias afetam a função e estrutura da proteína (George et al., 1993). Estima-se que 80% das doenças são causadas pela desestabilização conformacional da proteína (George et al., 1993).

Além disto, alguns estudos demonstraram que as mutações nos resíduos de serina e arginina são as mais frequentes nas substituições, que causam alterações na estabilidade de proteínas codificadoras de genes (Prosdocimi et al., 2007; Schwartz et al., 2019), como foi observado neste estudo. Estas modificações proteicas podem estar relacionadas a resistência ao tratamento nos pacientes com câncer, como o neuroblastoma (Obexer et al., 2009).

## 8.0 CONCLUSÃO

A identificação destes novos alvos terapêuticos *FOXM1*, *FOXK2* e *FOXO3* entre os pacientes com neuroblastoma *MYCN* não amplificado, cuja as mutações levaram as alterações na apoptose e promoveram a perda de estabilidade em regiões de regulação pós traducionais e regiões de ligação aos co-ativadores, poderão contribuir para o desenvolvimento de novas drogas.

## 9.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013; 7(7):20

Almawi AW, Mattheus LA, Guarné A. FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond. *Prog Biophys Mol Biol*. 2017; 127:105-110.

Bagatell, R. and Cohn, SL. Genetic Discoveries and Treatment Advances in Neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr*. 2016; 28(1): 19-25.

Bettermann K, Benesch M, Weis S, Haybaeck J. SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2012; 316(2): 113-25.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993; 11(8):1466-77.

Brodeur, GM, Marris J. *Neuroblastoma*, in *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, DP Philip Pizzo, Editor. 2006, Lippincott Williams & Wilkins. p. 933 - 970.

Calissi G, Lam EWF, Link W. Therapeutic strategies targeting FOXO transcription factors. *Nat Rev Drug Discov*. 2021; 20(1): 21-38.

Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK.. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 27:289–297.

Davidoff AM. Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg*. 2012; 21(1):2-14.

Contessoto VG, Oliveira Junior AB, Chanine J, Oliveira RJ. Introduction to the protein folding problem: An approach using simplified computational models. *Rev Bras Ensino Fis*. 2018; 40(4).

Dorn M, Silva MBE, Buriol LS, Lamb LC. Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Comput Biol Chem*. 2014; 53PB:251-276.

Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffey PJ, Demoulin JB. The transcription of FOXO genes stimulates by FOXO3 and repressed by growth factors. *J Biol Chem*. 2009; 284(16):10334-42.

Giannakis M, Hodis E, Mu XJ, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, Saksena G, Lawrence MS, Qian ZR, Nichihara R, Van Allen EM, Gabriel SB, Lander ES, Getz G, Ogino S, Fuchs CS, Garraway LA. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet*. 2014; 46(12): 1264-6.



Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005; 24(50): 7410-25.

Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*. 2007; 282(41): 30107-19.

Haeussler M, Zweig AS, Tyner C, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, Raney BJ, Lee CM, Lee BT, Hinrichs AS, Gonzalez JN, Gibson D, Diekhans M, Clawson H, Casper J, Barber GP, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D853-D858.

Halasi M, Gartel AL. Suppression of FOXM1 sensitizes human cancer cells to cell death induced by DNA-damage. *Plos One*. 2012; 7(2):e31761.

Han JZ, Hastings JF, Phimmachanh M, Fey D, Kolch W, Croucher DR. Personalized Medicine of Neuroblastoma: Moving from Static Genotypes to Dynamic Simulations of Drug Response. *J Pers Med*. 2021; 11(5): 395.

Hauck L, Harms C, Grothe D, An J, Gertz K, Kronenberg G, Dietz R, Endres M, von Harsdorf R. Critical role for FOXO3a-dependent regulation of p21CIP1/WAF1 in response to statin signaling in cardiac myocytes. *Cir Res*. 2007; 100(1): 50-60.

Ho AS, Kannan K, Roy, DM, Morris LGT, Ganly I, Katabi N, Ramaswami D, Walsh LA, Eng S, Huse JT, Zhanf J, Dolgalev I, Huberman K, Heguy A, Viale A, Drobnjak M, Leversha MA, Rice CE, Singh B, Gopalakrishna I, Leemans CR, Bloemena E, Ferris RL, Seethala RR, Gross BE, Liang Y, Sinha R, Peng L, Raphael BJ, Turcan S, Gong Y, Schultz N, Kim S, Chiosea S, Shah JP, Sander C, lee W, Chan T. The mutational landscape of the adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet*. 2013; 45(7): 791-8.

Holohan C, Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(10): 714-726.

Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Kashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 2000; 19(5):617-23.

INCA (<http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017>)

Ji Z, Mohammed H, Webber A, Ridsdale J, Han N, Carroll Js et al. The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factors for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(10): 6232-6242.

Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H, Katoh M. Cancer genetics and genomics of human FOX Family genes. *Cancer Lett*. 2013; 328(2):198-206.

Kobayashi Y, Yang S, Nykamp K, Garcia J, Lincoln SE, Topper SE. Pathogenic variant burden in the ExAC database: an empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. *Genome Med.* 2017; 9(1):13.

Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 1986; 46 :1972-9.

Klinhom-On N, Seubwai W, Sawanyawisuth K, Lert-Itthiporn W, Waraasawapati S, Detarya M, Wongkhan S. FOXM1c is the predominant FOXM1 isoform expressed in cholangiocarcinoma that associated with metastatic potential and poor prognosis of patients. *Heliyon.* 2021; 7(4):e06846.

Kumar R, Kumar R, Tanwar P, Deo SVS, Mathur S, Agarwal U, Hussain S. Structural and conformational changes induced by missense variants in the zinc finger domains of GATA3 involved in breast cancer. *RSC Advances.* 2020; 10, 39640-39653.

L'abbate A, Macchia G, D'Addabbo P, Lonoce A, Tolomeo D, Trombetta D, Kok K, Bartenhagen C, Whelan CE, Palumbo O, Severgnini M, Cifola I, Dugas M, Carella M, Bellis G, Rocchi M, Carbone L, Storlazzi CT. Genomic organization and evolution of double minutes/homogeneously staining regions with MYC amplification in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(14):9131-45.

Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:6944-9.

Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13:482-95.

Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1775(1):92-102.

Littler DR, Alvarez-Fernández MA, Stein A, Hibbert RG, Heidebrecht T, Aloy P, Medema RH, Perrakis A. Structure of the FoxM1 DNA-recognition domain bound to a promoter sequence. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(13):4527-38.

Longley DB and Johnston. Molecular mechanisms of drug resistance. *The journal of pathology.* 2005; 102(2) :275-292.

Marais A, Ji Z, Child ES, Krause E, Mann D, Sharrocks AD. Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK – cyclin complexes. *J Biol Chem.* 2010; 285(46):35728-39.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007; 369(9579):2106-20

Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010; 362(23):2202-11.

Marceau AH, Brison CM, Nerli S, Arsenault HE, McShan AC, Chen E, Lee HW, Benanti JA, Sgourakis NG, Rubin SM. An order-to-disorder structural switch activates the FOXM1 transcription factor. *Elife*. 2019; 8:e46131.

Mayahi S, Golalipour M, Yamchi A, Jhingan GD, Shahbazi M. New insights into the roles of the FOXO3 and p27Kip1 genes in signaling pathways. *Ups J med Sci*. 2019; 124(3):149-157.

McMillan EA, Ryu MJ, Diep CH, Mendiratta S, Clemenceau JR, Vaden RM, Kin JH, Motoyaji T, Covington KR, Peyton M, Huffman K, Wu X, Girard L, Sung Y, Chen PH, Mallipeddi PL, Lee JY, Hanson J, Voruganti S, Yu Y, Park S, Sudderth J, DeSevo C, Muzny DM, Doddapaneni H, Gazdar Am Gibbs RA, Hwang TH, Heymach JV, Wistuba I, Coombes KR, Williams NS, Wheeler DA, MacMillan JB, Deberardinis RJ, Roth MG, Posner BA, Minna JD, Kim HSm White MA. Chemistry-First approach for nomination of personalized treatment in lung cancer. *Cell*. 2018; 173(4):864-878.

Nakashio A, Fujita N, Tsuruo T. Topotecan inhibits VEGF- and bFGF-induced vascular endothelial cell migration via downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Cancer*. 2002; 98(1):36-41.

Natarajan G, Malathi R, Holler E. Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited. *Biochemical Pharmacology*. 1999; 58: 1625–29.

Nestal de Moraes G, Bella L, Zona S, Burton MJ, Lam EW. Insights into a critical role of the FOXO3a-FOXM1 axis in DNA damage response and genotoxic drug resistance. *Curr Drug Targets*. 2016; 17(2):164-77.

Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, Robaina MC, Khongkow P, Gomes AR, Zona S, Crocamo S, Mencialha AL, Magalhães LM, Lam EWF, Maia RC. FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell Signal*. 2015; 27(12): 2496-505.

Nestal de Moraes, G., Khongkow, P.; Gong, C.; Yao, S.; Gomes, A.R.; Ji, Z.; Kandola, N.; Delbue, D., Man, E.P.; Khoo, U.S.; et al. Forkhead box K2 modulates epirubicin and paclitaxel sensitivity through FOXO3a in breast cancer. *Oncogenesis*. 2015; 4(9): e167.

Obexer P, Geiger K, Ambros PF, Meister B, Ausserlechner MJ. FKHRL1-mediated expression. Of Noxa and Bim induces apoptosis via mitochondria in neuroblastoma cells. *Cell Death Differ*. 2007; 14(3):534-47.

Obexer P, Hagenbuchner J, Unterkircher T, Sachsenmaier N, Seifarth C, Böck G, Porto V, Geiger K, Ausserlechner M. Repression of BIRC5/Survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(7):2041-8.

Odone V, Maluf Jr, Sanna MC, Eustaqui MS. Dois tumores sólidos freqüentes na infância: Neuroblastoma e Tumor de Wilms - Revisão e Atualização. *Pediatr*. 1983; 5:155-161.

Park HJ, Wang Zm Costa RH, Tyner A, Lau LF, Raychaudhuri P. An N-terminal inhibitory domain modulates activity of FOXM1 during cell cycle. *Oncogene*. 2008; 27(12): 1696-704.

Ptashne M and Gann A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. 1997; 386(6625):569-77.

Reinhardt CH, Yaffe MB. Phospho-Ser/Thr- binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14(9): 563-80.

Santo EE, Stroeken P, Sluis PV, Koster J, Versteeg R, Westerhout EM. Scheijen B, Ngo HT, Kang H, Griffin JD. FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene*. 2004;23(19):3338–49.

Siva N. 1000 Genomes project. *Nat Biotechnol*. 2008; 26(3):256.

Sime W, Niu Q, Abassi Y, Masoumi KC, Zarrizi R, Kohler JB, Kjellström S, Lasorsa VA, Capasso M, Fu H, Massoumi R. BAP1 induces cell death via interaction with 14-3-3 in neuroblastoma. *Cell Death Dis*. 2018; 9(5):458.

Sunters A, Fernández de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EWF. FOXO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis un paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2003; 278(50): 49795-805.

Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ, Forbes AS. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D941-D947.

Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis:apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*. 1998; 3(11):697-707.

Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missence predictions for genomes. *Nat Protoc*. 2016; 11(1):1-9.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993; 366(6456):701-4.

Yao S, Fan LY, Lam EW. The FOXO3-FOXM1 axis: a key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance. *Seminar in Cancer Biology*. 2018; 50: 77-69

Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, Roebuck KA, Costa RH. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(3): 1626-41.

Wang F, Marshall CB, Yamamoto K, Li GY, Gasmi-Seabrook GMC, Okada H, Mak TW, Ikura M. Structures of KIX domain of CBP in complex with two FOXO3a transactivation domains reveal promiscuity and plasticity in coactivator recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(16):6078-83.

Wang Z, Yu T, Huang P. Post-translational modifications of FOXO family proteins. *Mol Med Rep.* 2016; 14(6): 4931-4941.

Westfall SD and Skinner MK. Inhibition of phosphorylation 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(11):1764-71.

Wijchers PJ, Burbach JP, Smidt MP. In control of biology: of mice, men and Foxes. *Biochem J.* 2006; 397:233-46.

Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EWF. FOXM1: na emerging máster regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1839 (11):1316-22.

Zou Y, Tsai WB, Cheng CJ, Hsu C, Chung YM, Li PC, Lin SH, Hu MC. Forkhead box transcription fator FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast câncer cell proliferation and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(1):R21.

Zhu G, Spellman PT, Volpe T, Brown PO, Botstein D, Futcher B. Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature.* 2000; 406(6791):90-4.

## ANEXO I



1242

**Hospital das Clínicas da FMUSP**  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** EFEITO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO FOX (FORKHEAD-BOX) NA RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICOS NOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

**Pesquisador Responsável:** Vicente Odone Filho

**Versão:** 1

**Pesquisador Executante:** Estela Maria Novak

**CAAE:** 49821215.0.0000.0068

**Co-autores:** Thamiris Magalhães Gimenez

**Instituição:** HCFMUSP – Instituto da Criança

**Departamento:** PEDIATRIA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Registro on-line:** 14021

**Número do Parecer:** 1.291.120

**Data da Relatoria:** 21/10/2015

**Apresentação do Projeto:** O neuroblastoma é o tumor extra craniano mais comum da faixa etária pediátrica. Este tumor ocorre quase exclusivamente em recém-nascidos e crianças muito novas. Entre os lactentes, corresponde a mais de 50% das neoplasias malignas e é raro após os 15 anos. Dois terços das crianças com neuroblastoma são diagnosticadas quando têm menos de 5 Este tumor pode se desenvolverem qualquer local do sistema nervoso simpático, mas cerca de metade de todos os neuroblastomas tem origem intra-abdominal com aproximadamente 1/3 ( 65%) dos casos primários de adrenalanas de idade. Outros sítios comuns onde estes tumores podem se desenvolver são: região cervical, tórax ou pélvis. Quando a doença é localizada, independentemente da idade do paciente, a cura pode ser atingida em quase 90% dos casos, nas situações de doença disseminada o prognóstico é invariavelmente sombrio, sendo a idade um dos fatores críticos para o prognóstico. Crianças menores de um ano e meio de vida com doença metastática podem ser curadas com protocolos menos intenso de quimioterapia, enquanto crianças mais velhas não apresentam resposta semelhante, mesmo quando tratadas com esquemas terapêuticos de maior agressividade. Estudos cooperativos demonstraram que elementos clínicos aliados a dados de patologia e marcadores biológicos auxiliam na estratificação dos pacientes com neuroblastomas em diferentes categorias de risco ou prognóstico. A classificação de Shimada foi pioneira a enfatizar a importância das características histopatológicas do tumor no prognóstico. A incidência anual do NB no Brasil varia entre 7 a 12 casos por milhão de crianças até 15 anos, alcançando um taxa estimada de 7.3 casos casos/milhão. Alguns estudos demonstram diferenças genéticas entre os tumores que tendem a responder ao tratamento e aqueles com pior prognóstico. Entre estes fatores de transcrição estão os membros da família dos fatores de transcrição FOX. Os membros da família FOX estão envolvidos em uma variedade de processos, incluindo metabolismo, proliferação celular, apoptoses, angiogêneses, migração, invasão celular, bem como na reparação do DNA através da ativação dos genes alvo. A resistência ou quimiosensibilidade ao tratamento com quimioterápicos convencionais como vincristina, doxorubicina, melfalan, imidazol-carboxamida, peptichemio, teniposide, lapatinib, gefitinib, imatinib, cisplatina e uma variedade de fármacos anti-neoplásicos também depende da ativação FOXO, particularmente FOXO3a e FOXM1. Tratamento e Quimioterapia- No neuroblastoma, as opções terapêuticas residem, basicamente, na possibilidade da remoção cirúrgica completa, no uso de combinações quimioterapia (QT) e na radioterapia (RT) ou transplante de medula. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO - Pacientes com neuroblastoma entre zero e cinco anos de idade;- Estágio 4, alto risco, tumores metastáticos. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - Tratamento prévio com outros esquemas quimioterápicos;- Pacientes com neuroblastomas com estágios 1,2A, 2B, 3 e 4S. CASUÍSTICA - Neste estudo serão estudados 60 tumores de pacientes com neuroblastoma admitidos na unidade de Oncologia do ITACI entre 2015 a 2017. As amostras do tecido tumoral (região tumoral acima de 80%, avaliadas por patologistas) serão provenientes da ressecção cirúrgica ou biópsia do pacientes durante exame de rotina para auxiliar o diagnóstico. Análise estatística - .A análise estatística será

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar  
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)



## Hospital das Clínicas da FMUSP

### Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

realizada por métodos paramétricos e não paramétricos, conforme a natureza das variáveis envolvidas, incluindo testes de análise de variância com comparações pareadas de Tukey, teste de Kruskal-Wallis, teste exato de Fisher, teste t de Student, teste de Mann-Whitney e regressão multivariada. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade será  $P < 0,05$ . Para a análise estatística será utilizada o programa Prism 6.01 GraphPad.

**Objetivo da Pesquisa:** Avaliar a relevância das alterações gênicas dos membros da família FOX encontradas nos pacientes com neuroblastoma de forma a estabelecer uma possível correlação entre resistência ou sensibilidade à quimioterapia. Detectar alterações cromossômicas Identificar os genes membros da família FOX através do sequenciamento do exoma. Verificar a reativação da apoptose e a inibição da proliferação celular nas linhagens de neuroblastoma.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** Os riscos são considerados baixos- os procedimentos são os de rotinas(coleta de sangue e biópsia), não existem benefícios para os participantes da pesquisas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** Este estudo recrutará crianças com neuroblastoma entre 2015 e 2017. É um estudo de coorte prospectivo, com isolamento de DNA genômico dos tumores, a concentração do DNA será determinada por meio de espectrofotômetro, os resultados serão considerados alterados quando no histograma, o tamanho do pico da amostra analisada for menor do que 0,75 (deleção) ou maior do que 1,25 (duplicação) quando comparados aos de amostras normais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Apresentação: TCLE para o responsável; TCLE - termo de assentimento para as diversas idades Cadastros Brochura

**Recomendações:** No projeto nos critérios de inclusão só a parece direcionado a crianças de zero a cinco anos os termos de assentimento são para diversas idades - solicitamos a adequação do projeto para as várias idades ou retirada dos termos das idades que não estão contempladas no critério de inclusão.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Ver lista na recomendação

**Situação do Parecer:** Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não

**Considerações Finais a critério do CEP:** Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 23 de Outubro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur

Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

