

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

Bruno Daiki Fukuoka Keenan

**O PAPEL DE BMI-1 EM DIFERENTES FENÓTIPOS CELULARES DE  
NEUROBLASTOMA**

Porto Alegre

2023

Bruno Daiki Fukuoka Keenan

**O PAPEL DE BMI-1 EM DIFERENTES FENÓTIPOS CELULARES DE  
NEUROBLASTOMA**

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

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

Porto Alegre

2023

## CIP - Catalogação na Publicação

Keenan, Bruno Daiki Fukuoka  
O PAPEL DE BMI-1 EM DIFERENTES FENÓTIPOS CELULARES  
DE NEUROBLASTOMA / Bruno Daiki Fukuoka Keenan. --  
2023.  
38 f.  
Orientadora: Mariane da Cunha Jaeger.

Coorientadora: Natália Hogetop Freire.

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

1. Neuroblastoma. 2. BMI-1. 3. Células Tronco  
Tumorais. I. Jaeger, Mariane da Cunha, orient. II.  
Freire, Natália Hogetop, coorient. III. Título.

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

Bruno Daiki Fukuoka Keenan

**O PAPEL DE BMI-1 EM DIFERENTES FENÓTIPOS CELULARES DE  
NEUROBLASTOMA**

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

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Nome do professor - instituição

---

Nome do professor - instituição

---

Dra. Mariane da Cunha Jaeger – Instituto do Câncer Infantil

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Mariane da Cunha Jaeger, por ser uma guia pela pesquisa e pela vida e por todas as ideias para o projeto, além de ser minha referência como biomédica;

À minha coorientadora, Natália Hogetop Freire, por me ensinar na prática todas as técnicas que sei hoje e pelo entusiasmo para analisar os resultados;

Ao Instituto do Câncer do Infantil, por oportunizar a realização do projeto;

Às colegas de laboratório, por compartilharem das alegrias e das dores, e por estarem presentes durante todo o processo;

À minha namorada, Ingrid Xavier de Andrades, por ser meu temporizador para o prazo final, por sempre me ouvir quando levava trabalho para casa e pela presença em minha vida;

À minha mãe, Mika Fukuoka, por todo o apoio, carinho e dedicação que deu para eu chegar onde estou;

Ao meu irmão, Gabriel Atsuya Fukuoka Keenan, por me escutar reclamar das aulas e experimentos, mesmo não entendendo nada;

Aos meu colegas e amigos, de dentro e fora do curso, que me acompanharam durante essa jornada e me aguentaram durante todos estes anos;

À todos os artistas presentes em minhas playlists, que me propiciaram um escape momentâneo da realidade e uma companhia para todas as atividades durante a faculdade;

À todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigado!

## RESUMO

Neuroblastoma (NB) é o tumor mais diagnosticado no primeiro ano de vida, com aproximadamente 50% dos casos classificados como de alto risco. Essa doença é a causa de aproximadamente 15% de todas as mortes relacionadas a tumores infantis. BMI-1 é um componente chave do Complexo Repressivo Policombo 1 (PRC1) e apresenta alta expressão em NB. A expressão de BMI-1 está relacionada a um fenótipo tumoral maligno e indiferenciado, e também associada com um enriquecimento da população de células tronco tumorais (CTTs). Tendo em vista a heterogeneidade presente em NB, principalmente nos casos mais avançados da doença, foi examinado o efeito da inibição farmacológica de BMI-1 com o inibidor seletivo PTC-209. Neste trabalho, utilizamos duas linhagens celulares de neuroblastoma que apresentaram diferentes níveis de expressão de BMI-1, demonstrado pela técnica de imunofluorescência. As células foram submetidas a diferentes modelos *in vitro*, como modelo de esferas utilizado para enriquecimento de CTTs, um modelo com tratamento com ácido retinóico (ATRA) para modelo de diferenciação celular e um modelo de monocamada. Apesar de o modelo utilizado com o tratamento com ATRA não ser efetivo no aumento de marcadores de diferenciação, nosso modelo de esferas foi capaz de induzir o aumento do marcador de CTTs *PROM1* quando comparado com células cultivadas em monocamada. A inibição farmacológica de BMI-1 foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular, avaliada pelo método de exclusão de azul de tripan, tanto em monocamada quanto em CTTs. Também foi visto que o tratamento prolongado com PTC-209 pode estar associado à regulação da diferenciação celular, uma vez que causou um aumento dos níveis do marcador  $\beta$ 3-tubulina. Estes resultados sugerem que a inibição farmacológica do BMI-1 é capaz de reduzir a viabilidade de células de NB, possivelmente por induzir um fenótipo diferenciado, podendo ajudar na compreensão da biologia do tumor e no tratamento de pacientes mais graves.

Palavras-chave: Neuroblastoma; BMI1; Células Tronco Tumorais

## ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is the most commonly diagnosed tumor in the first year of life. With about 50% of cases being classified as high risk, this disease is the cause of approximately 15% of all childhood tumor-related deaths. BMI-1 is a key component of PRC1 and it is highly expressed in NB. The BMI-1 expression level is related to malignant and undifferentiated cancer phenotype and to an enrichment of the cancer stem cell (CSC) population. Considering the heterogeneity present in NB, especially in more advanced cases of the disease, the effect of pharmacological inhibition of BMI-1 with the inhibitor PTC-209 was examined. In this work, we used two neuroblastoma cell lines that showed different levels of BMI-1 expression, demonstrated by the immunofluorescence assay. Different *in vitro* models were used, with a sphere model used to enrich CSCs, a model with retinoic acid treatment (ATRA) used for a cell differentiation model and a monolayer model. Although the model used with ATRA treatment was not effective in increasing differentiation markers, our sphere model was able to induce an increase in the CSC marker *PROM1* when compared to cells cultured in a monolayer. Pharmacological inhibition of BMI-1 was able to significantly reduce cell viability, assessed by trypan blue exclusion assay, in monolayer and in CSCs. It was also seen that long term PTC-209 exposure could be related to induction of differentiation, due to immunofluorescence findings of decreased BMI-1 and apparent increase in the differentiation marker beta III tubulin. These results suggest that pharmacological inhibition of BMI-1 is able to reduce NB cell viability, possibly by inducing a differentiated phenotype, which may help in understanding tumor biology and treatment of more severe patients.

Keywords: Neuroblastoma; BMI1; Cancer Stem Cells

## **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA</b>	<b>8</b>
<b>1.1 NEUROBLASTOMA</b>	<b>8</b>
<b>1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS</b>	<b>9</b>
<b>1.3 BMI-1</b>	<b>10</b>
<b>1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b>	<b>11</b>
<b>1.5. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1 Objetivo geral</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos</b>	<b>11</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>12</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY</b>	<b>33</b>



# 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

## 1.1 NEUROBLASTOMA

Neuroblastoma (NB) é o tumor maligno mais comumente diagnosticado em crianças até o primeiro ano de vida, apresentando idade média de diagnóstico de 17 meses (London *et al.*, 2005). Essa neoplasia corresponde a 8-10% dos casos de câncer em crianças, além de ser a causa de 15% de mortes relacionadas a tumores infantis (Park; Eggert; Caron, 2008). A doença acomete principalmente crianças até 5 anos de idade, sendo rara em adolescentes e adultos jovens (Gurney *et al.*, 1995).

Estudos apontam que a célula de origem do NB são células da crista neural, ocorrendo em qualquer componente do sistema nervoso simpático, localizando-se principalmente no abdômen e nas glândulas adrenais, mas também no pescoço, peito e pelve (Maris *et al.*, 2007). Além da diversidade de localizações possíveis, NB apresenta uma grande heterogeneidade clínica e biológica, compreendendo desde casos de regressão completa até casos com doença disseminada (Qiu; Matthay, 2022). As altas taxas de regressão espontânea de NB, que podem chegar a até 47% em pacientes até 1º ano (Hero *et al.*, 2008) e que se destacam entre os tumores malignos (Everson; Cole, 1959), ocorrem tanto em pacientes com a forma mais branda da doença quanto em crianças com a doença disseminada, sendo a causa para tal fenômeno ainda não completamente esclarecida. Dentre as possíveis explicações sobre a regressão estão apoptose mediada por TrkA, encurtamento de telômeros, destruição mediada por resposta imune e modificações epigenéticas (Brodeur, 2019).

O espectro clínico do NB é refletido por várias características clínicas e biológicas que impactam no prognóstico e tratamento dos pacientes. Para avaliação desses riscos, uma classificação recente, o sistema INRGSS (do inglês *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), foi aprimorada de classificações anteriores. Essa classificação inclui fatores de risco definidos nas imagens, bem como idade dos diagnósticos, estadiamento da doença (localizada versus metastática), histologia tumoral (grau de diferenciação), ploidia, alterações cromossômicas e status de MYCN (não amplificado versus amplificado) (Sokol; Desai, 2019; Irwin *et al.*, 2021). Dentre os fatores de risco para NB, um dos mais utilizados é a amplificação de MYCN. Tendo em vista que MYCN está associado a auto-renovação e proliferação das células da crista neural (Kholodenko *et al.*, 2018), sua amplificação é um grande indicativo de crescimento tumoral. Além disso, estudos envolvendo silenciamento de MYCN relataram um atraso no ciclo celular em fase G0/G1 (Zhan, *et al.*, 2016), mostrando o papel proliferativo de MYCN em NB.

Apesar dos estudos recentes auxiliarem no melhor entendimento de NB, as taxas de sobrevida em 5 anos de pacientes apenas aumentaram para aqueles com a forma mais benigna da doença, enquanto indivíduos com NB de alto risco continuam recebendo maus prognósticos (Maris, 2010). O tratamento para pacientes com baixo risco consiste em monitoramento do crescimento tumoral e/ou cirurgia e os com risco intermediário realizam quimioterapia e ressecção cirúrgica; os pacientes de alto risco recebem intensa terapia multimodal que inclui quimioterapia, cirurgia, quimioterapia ablativa seguida de transplante de células tronco autólogas e imunoterapia e tratamento com ácido retinóico (Matthay *et al.*, 2016). Mesmo havendo tratamento multimodal agressivo, NB de alto risco continua apresentando taxas de sobrevida em 5 anos abaixo dos 50% (Whittle *et al.*, 2017). Apesar dos avanços no campo da terapia de NB, os pacientes com a forma mais maligna da doença, que correspondem a cerca de 50% dos afetados, ainda apresentam maus prognósticos (DuBois; Macy; Henders, 2022). No entanto, algumas terapias como transplante de medula óssea e terapia diferenciativa com ácido retinóico (Matthay *et al.*, 1999) já estão sendo usadas como uma alternativa para esses pacientes.

A terapia baseada em ácido retinóico tem demonstrado benefícios clínicos aos pacientes com NB alto risco devido a sua capacidade de suprimir o crescimento tumoral e promover diferenciação celular (Villablanca *et al.*, 1995). Atualmente, o ácido retinóico 13-cis (13-cis RA), também conhecido como isotretinoína, é utilizado como parte do regime de tratamento, durante a terapia de manutenção, para pacientes com NB de alto risco. Entretanto, a resposta a esse tratamento é variada, com pacientes apresentando melhora significativa enquanto outros apresentam nenhuma resposta à essa terapia diferenciativa (Reynolds *et al.*, 2003).

## 1.2 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Células tronco tumorais (CTTs) são uma subpopulação de células tumorais com capacidades similares às encontradas em tronco normais, como auto-renovação, diferenciação e tumorigênese quando transplantado em modelo *in vivo* (Yu *et al.*, 2012). CTTs apresentam plasticidade celular, permitindo uma conversão entre diferentes estados fenotípicos, como mais resistentes ou mais diferenciados, auxiliando na sobrevivência do tumor e dificultando o tratamento (Majumdar; Liu, 2020). Por conta disso, certos tratamentos convencionais, como quimioterapia e radioterapia, não conseguem eliminar o tumor por completo, possibilitando a

recidiva tumoral, normalmente mais resistente e agressiva que tumor inicial (Huang *et al.*, 2020). Desta forma, é de considerável importância que haja mais terapias que considerem essas células como alvos com o intuito de prevenir recaídas e recidivas tumorais.

Estudos já constataram que células de sítios metastáticos de NB possuem características tronco, como plasticidade e adaptação celular (Veschi; Verona; Thiele, 2019). A presença desses sítios com populações de CTTs pode determinar a heterogeneidade dos neuroblastoma de alto risco, levando a um mau prognóstico. Ademais, já foi demonstrado que a conversão entre dois fenótipos em NB influenciam em um tumor mais heterogêneo e maligno, tendo em vista que um fenótipo mais resistente é selecionado na presença de um tratamento quimioterápico (Chakrabarti *et al.*, 2012). Diversas moléculas e alterações genéticas estão envolvidas na formação e manutenção de CTTs em NB (Bahmad *et al.*, 2019).

Atualmente, existem alguns ensaios *in vitro* propostos para obtenção de populações enriquecidas de células tronco tumorais, sendo o modelo de esferas um dos mais conhecidos e utilizados (Weiswald; Bellet; Dangles-Marie, 2015). Neste ensaio é utilizado placas de baixa aderência onde as células são cultivadas na presença de diferentes fatores que auxiliam e induzem a formação de CTTs. Diversos estudos já foram feitos em NB utilizando este modelo (Coulon *et al.*, 2011; Craig *et al.*, 2016). Estudos já demonstraram que CTTs de NB normalmente apresentam alta expressão de determinados marcadores presentes na membrana como CD133 (auto-renovação, multipotência e resistência), CD44 (interações célula-célula e célula-matriz) e CD24 (diferenciação e neurogênese) (Farina *et al.*, 2021).

### 1.3 BMI-1

*BMI1*, também conhecido como *PCGF4* (Polycomb group RING finger protein 4), é um gene que codifica uma proteína ring finger, componente do PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*). PRC1 age como repressor transcricional através da deposição de uma ubiquitina na lisina 119 da histona H2A, que causa modulação da cromatina (Cohen *et al.*, 2020). Dessa forma, BMI-1 está relacionado com diversos processos biológicos como desenvolvimento, ciclo celular, resposta a danos no DNA, senescência, células tronco, auto-renovação e câncer (Bhattacharya *et al.*, 2015). Estudos reportaram altos níveis de BMI-1 em tumores primários de NB, além de apresentarem uma função essencial de BMI-1 na tumorigênese de neuroblastoma (Cui *et al.*, 2007), uma vez que o silenciamento cessou a habilidade de NB de formar tumores em camundongos imunodeprimidos. Outros estudos mostraram que BMI-1

possui papel protetor contra morte celular induzida por danos no DNA em NB (Akita *et al.*, 2023), indicando um possível alvo para tratamentos.

Por mais que a inibição farmacológica de BMI-1 ainda não tenha sido analisada em NB, os efeitos deste tratamento com compostos, como PTC-209 e QW24, já foram vistos em outros tumores como câncer colorretal (ação antitumoral pela redução da população de CTTs) (Wang *et al.*, 2019), câncer de cabeça e pescoço (redução do crescimento tumoral) (Wang *et al.*, 2017), câncer da vesícula biliar (parada do ciclo celular) (Mayr *et al.*, 2016) e glioblastoma (redução do crescimento) (Kong *et al.*, 2018).

## **1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

NB apresenta amplo espectro clínico, de tumores que regredem espontaneamente até doenças com taxas de sobrevida menores que 50%. A presença de heterogeneidade celular é uma característica de NB de alto risco e que pode estar associada a CTT. Terapias diferenciativas, como o uso de ácido 13-cis-retinoico, já são utilizadas em pacientes diagnosticados com NB de alto risco (Bayeva *et al.*, 2021). Modulação da diferenciação/indiferenciação de células de NB envolvem a modulação de BMI-1 (Cui *et al.*, 2006), mas o papel da inibição farmacológica dessa proteína nos diferentes contextos fenotípicos de células de NB não estão elucidados.

A hipótese desse trabalho é que o uso do inibidor de BMI-1, PTC-209, será capaz de induzir um fenótipo diferenciado em células de NB.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo geral**

Determinar o efeito da inibição farmacológica de BMI-1 em diferentes contextos celulares (fenótipos) de células de neuroblastoma.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar níveis transcricionais e protéicos de BMI-1 em linhagens de NB nos fenótipos de células tronco tumorais, células tratadas com ácido retinóico e células em monocamada;
- b) Estabelecer relação dose-efeito do inibidor de BMI-1 nos níveis de BMI-1 nos diferentes fenótipos de células de NB;
- c) Caracterizar o efeito da inibição de BMI-1 em células de NB, incluindo células tronco tumorais;
- d) Avaliar possíveis vias associadas aos efeitos da inibição farmacológica de BMI-1 nos diferentes fenótipos de NB.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Molecular and Cellular Biochemistry

ARTIGO EXPERIMENTAL

### **O papel de BMI-1 em diferentes fenótipos celulares de neuroblastoma**

•Bruno Daiki Fukuoka Keenan <sup>1,2</sup> • Natália Hogeteop Freire <sup>2</sup> • Mariane da Cunha Jaeger <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

<sup>2</sup> Instituto do Câncer Infantil, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor correspondente:

Mariane da Cunha Jaeger

labpesquisa1@ici.org

Instituto do Câncer Infantil, Porto Alegre, RS, Brazil

Reconhecimento

Este artigo foi apoiado pelo Instituto do Câncer Infantil (ICI).

**Abstract**

Neuroblastoma (NB) é um tumor que acomete principalmente crianças até 4 anos de idade, sendo a neoplasia mais diagnosticada até o primeiro ano de vida. NB possui idade média de diagnóstico de 17 meses, sendo que cerca de metade dos acometidos apresentam a doença com alto grau, das quais mais da metade resulta em óbito. BMI-1 é uma proteína chave do complexo PRC1 e está envolvido em mecanismos de indiferenciação e auto-renovação em NB. Tendo em vista a grande heterogeneidade presente em NB, é de grande importância que os efeitos da inibição farmacológica dessa proteína sejam elucidados. Neste trabalho, os diferentes fenótipos de neuroblastoma foram obtidos e caracterizados através da morfologia e análise por RT-qPCR. Nossos achados indicam que o tratamento farmacológico de BMI-1 reduz significativamente a viabilidade em monocamada e CTT de NB. Essa diminuição pode estar associada à regulação da diferenciação celular, uma vez que o tratamento prolongado com PTC-209 aumentou os níveis do marcador  $\beta$ 3-tubulina. Juntos, os resultados suportam o conhecimento atual do papel de BMI-1 na diferenciação de NB.

Palavras-chave: Neuroblastoma; BMI1; Células Tronco Tumorais

## **Introdução**

Neuroblastoma (NB) é um câncer maligno de origem embrionária e acomete principalmente crianças até 4 anos de idade, sendo rara em adolescentes e adultos jovens [1]. Por ser tratar de um câncer originário das células da crista neural, esse tumor pode ocorrer em qualquer componente do sistema nervoso simpático, havendo crescimento principalmente nas glândulas adrenais e gânglios paravertebrais, podendo causar lesões no pescoço, peito, abdômen e pelve. NB é a neoplasia mais comumente encontrada no primeiro ano de vida, apresentando média de idade para os diagnósticos de 17 meses. Com a introdução de novas formas terapêuticas, houve um aumento significativo nas taxas de sobrevivência em 5 anos de pacientes com a forma mais benigna da doença, enquanto crianças com NB de alto risco continuam a sofrer com maus prognósticos [2].

Doença metastática e baixo grau de diferenciação do tumor são fatores associados a NB de alto risco. Essas características podem estar associadas a presença de uma subpopulação específica conhecida como células tronco tumorais (CTT). Estudos já mostraram que NB com piores prognósticos apresentam uma população de CTTs, sendo essas responsáveis por um perfil mais maligno. CTTs, em geral, expressam genes de *stemness*, (marcadores associados à manutenção do estado tronco), que não são normalmente expressos em células do restante do tumor, sendo esses responsáveis por esse fenótipo tronco [3].

Terapias que induzem diferenciação celular, como o uso de ácido retinóico no tratamento de manutenção de NB, são alternativas para atingir as CTTs e evitar metástases e recidivas. BMI-1, é um regulador transcricional com importante função na repressão de proteínas envolvidas na morte celular e progressão do ciclo celular, além de ser essencial no desenvolvimento embrionário [3-5]. Tendo em vista a origem de NB, estudos já demonstraram a presença de altos níveis de BMI-1 nesses tumores [5]. BMI-1 também apresenta uma importância na formação de CTTs em neuroblastoma, prevenindo diferenciação e, conseqüentemente, dificultando o tratamento [6].

## **Materiais e métodos**

Células e condição de cultura



Foram utilizadas três linhagens de neuroblastoma obtidas originalmente do American Tissue Type Collection (ATCC). Linhagens: SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; não MYCN amplificado), SK-N-BE(2) (ATCC CRL-2271; MYCN amplificado). As células de NB foram cultivadas com Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12) (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) e 0,1% anfotericina B (0,25µg/mL). Todas as células foram mantidas a 37°C em ambiente umidificado e na presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Tratamentos

Para este projeto foi utilizado o inibidor seletivo para BMI-1 PTC-209 (Sigma-Aldrich). Para o ensaio de diferenciação celular, foi utilizado *All Trans Retinoic Acid* (ATRA) (Sigma-Aldrich) como agente indutor de diferenciação. PTC-209 e ATRA foram diluídos em DMSO em uma concentração final de 10 mM e 17,5 mM, respectivamente. Para os experimentos deste trabalho foi utilizado os tempos de tratamento de 48 horas, para visualizar reduções significativas de PTC-209, ou 7 dias, para comparação entre os efeitos de PTC-209 e ATRA.

### Viabilidade celular

As células de NB foram plaqueadas e tratadas com PTC-209 em diferentes concentrações (0,1 uM - 2,0 uM). Após 48 horas ou 7 dias de tratamento, as células foram quantificadas em hemocítmetro com azul de Tripán e a viabilidade celular foi verificada nas diferentes doses.

### Ensaio de formação de esferas

As células foram plaqueadas em placas de baixa adesão (ultra-low attachment; Corning®) e cultivadas com meio de indução de esferas DMEM/F12 suplementado com 20 ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (Sigma-Aldrich), 2% suplemento B-27 (Gibco, Life Technologies), 0,5% suplemento N-2 (Gibco, Life Technologies) e antibióticos. No quarto dia de indução foi adicionado meio de indução e nas condições para análise do efeito de PTC-209, junto com o meio indutor foi adicionado PTC-209 em uma concentração final de 1 uM para SH-SY5Y, e 0,5 uM para SK-N-BE(2) Após 48 horas de inibição de BMI-1, foram obtidas imagens utilizando microscópio Leica em amplificação de 5X para avaliar o

número de esferas formadas nas diferentes condições, também foi realizada a digestão enzimática das esferas com Tripsina-EDTA (Thermo Fisher) e as células foram quantificadas em hemocitômetro com azul de Tripán para verificar o número de células viáveis nas diferentes condições. Além disso, foi coletado pellet das esferas de NB para análise do nível transcricional de genes alvo.

#### Ensaio de indução de diferenciação celular

Nesse ensaio as células de NB foram expostas a três condições: controle, inibição de BMI-1 (PTC-209 nas concentrações 1  $\mu$ M para SH-SY5Y, e 0,5  $\mu$ M para SK-N-BE(2)) e controle positivo para diferenciação celular (ATRA na concentração 500 nM) por um período de 7 dias. As células foram plaqueadas e, após 24 horas, tratadas com doses citadas acima. No 4º dia de exposição, o meio de tratamento foi repostado nas diferentes condições avaliadas. Após 7 dias de tratamento, foram obtidas imagens utilizando microscópio Leica em amplificação de 10X e coletado pellet para análise do nível transcricional de genes alvo.

#### RT-qPCR

Para verificar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos genes de *BMII*, *Prominina 1* (PROM1; marcador de indiferenciação), *Enolase 2* (ENO2; marcador de diferenciação) em células de NB em diferentes condições experimentais, foi realizada a técnica de RT-qPCR (reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase). Para isso, foram obtidos pellets de células controle e tratadas por 7 dias com PTC-209 (1  $\mu$ M para SH-SY5Y; 0,5  $\mu$ M para SK-N-BE(2)) ou ATRA (500 nM) e esferas de NB. A extração de RNA foi realizada com kit de extração ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Promega Corporation) e quantificadas por espectrofotometria NanoDrop em 260 nm de comprimento de onda. Para síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit de conversão GoScript Reverse System (Promega Corporation) e o nível transcricional dos genes *BMII*, *PROM1* e *ENO2* foram quantificados usando PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) no equipamento QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). O nível transcricional de  *$\beta$ -actina* (ACTB) foi utilizado como controle interno da técnica. Esse método foi realizado em triplicata biológica e o nível transcricional foi avaliado pela técnica de delta delta CT. As seqüências de primers utilizadas estão disponíveis na tabela 1.

Tabela 1: Sequencia de Primers.

Gene	Primer Foward (5'-3')	Primer Reserve (5'-3')
<i>BMI1</i>	TGCTTTGTGGAGGGTACTTC	GTCTGGTCTTGTGAACTTGGA
<i>PROM1</i>	AGTCGGAAACTGGCAGATAGC	GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT
<i>ENO2</i>	AGCCTCTACGGGCATCTATGA	TTCTCAGTCCCATCCAATCC
<i>ACTB</i>	AAACTGGAACGGTGAAGGTG	AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT

### Western Blotting

Para avaliar os níveis proteicos de BMI-1 foi realizada a técnica de Western Blotting. Foram obtidos pellets de células não tratadas e tratadas com suas respectivas doses de PTC-209 (SK-N-BE(2): 0,5 e 1,0 $\mu$ M; SH-SY5Y: 1,0 e 2,0 $\mu$ M) As proteínas foram extraídas por meio do reagente Cell Lyses Buffer (Cell Signaling Technology), com a adição de PMSF e inibidores de protease (Sigma-Aldrich). A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bio-Rad Technologies) e foi estipulado um input de 20 ug de proteínas por amostra, que foram resolvidas por SDS-PAGE 12% à 90V por 30 minutos e 120V por 90 minutos em cuba vertical eletroforética (BioRad), em tampão Tris-glicina-SDS. Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto polivinilideno (PVDF) em sistema úmido com tampão Tris-Glicina-Metanol à 90 V por 180 minutos. Como agente de bloqueio foi utilizado MTTBS (5% leite em solução de TBS contendo 0,01% Triton X) durante 1h em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti- BMI-1 (1:1000; D20B7, Cell Signaling Technology) e anti-  $\beta$ -actina (1:1000; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) overnight (~16h). O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse IgG (1:10000; A4416, Sigma-Aldrich) ou anti-rabbit IgG (1:2000; 7074, Cell signaling Technologies) conjugado à peroxidase durante 1h. As membranas foram reveladas com o reagente de detecção ECL (Millipore), e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem iBright™ (Thermo Fisher Scientific).

### Imunofluorescência

Para verificar a distribuição e os níveis de BMI-1 e  $\beta$ III-tubulina nas células de NB, foi realizada a técnica de imunofluorescência. Foram utilizadas lamínulas de vidro de 13 mm (Olen, Kasvi) tratadas com solução de Poli-L-Lisina 0,01 % (Sigma-Aldrich). As células

foram plaqueadas e tratadas com PTC-209 e/ ou ATRA por um período de 48 horas ou 7 dias. Após o tempo de exposição estipulado, as lamínulas foram fixadas utilizando metanol 100% e mantidas em PBS. O bloqueio das lamínulas foi feito utilizando 1% BSA em solução de PBS contendo 0,3% Triton X durante 30 minutos. As lamínulas foram incubadas com anticorpos primários: anti- BMI1 (1:600 D20B7, Cell Signaling Technology) e anti-TUBB3 (1:1000; ab18207, Abcam) overnight (~16h) à 4° C. Foram utilizados anticorpos secundários fluorescentes Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1:1000; ab150077 Abcam) ou e Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit (1:2000; A11012 Invitrogen) por 1 hora em temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas com Flourished com DAPI (Sigma Aldrich) para marcação do núcleo e a fluorescência foi detectada usando o microscópio de fluorescência Leica na amplificação de 10 ou 20X.

#### Análise Estatística

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

## Resultados

### Expressão de BMI-1 em linhagens celulares de Neuroblastoma

Para este projeto foram utilizadas as linhagens de NB: SK-N-Be(2) e SH-SY5Y (Figura 1A). Para avaliar a expressão de BMI-1 nas linhagens de NB, foi realizada a técnica de imunofluorescência. O resultado obtido sugere que a linhagem SH-SY5Y têm níveis mais elevados de BMI-1 em comparação com SK-N-BE(2) (Figura 1B).

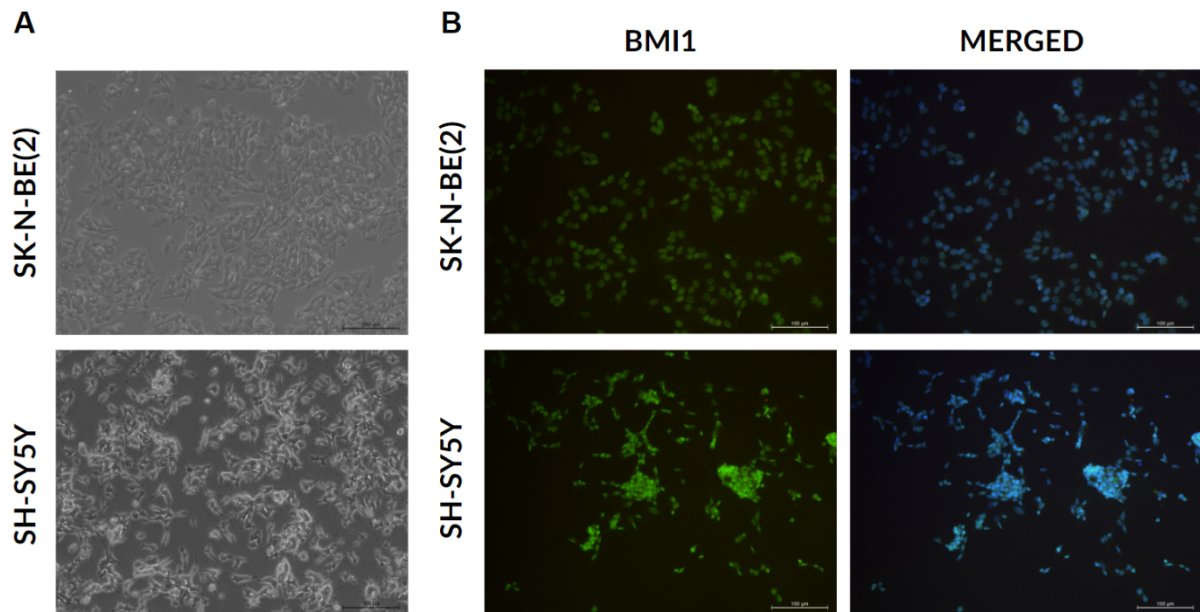


Figura 1: Expressão de BMI-1 em linhagens de neuroblastoma. (A) Imagem representativa das linhagens de NB. (B) Imagem representativa da técnica de imunofluorescência para BMI-1 nas linhagens SK-N-Be(2) e SH-SY5Y. DAPI foi utilizado como marcador nuclear e imagens foram capturadas em microscópio invertido com aumento de 10 ou 20 X.

### Avaliação da expressão de BMI1 nos fenótipos de Neuroblastoma

Para melhor compreender o papel de BMI-1 nos diferentes fenótipos celulares de NB foram estabelecidas três condições de análise: células em monocamada, modelo de células enriquecidas com CTT (esferas) e células diferenciadas com ATRA (Figura 2A-B). Com o intuito de caracterizar os modelos utilizados foi avaliado os níveis transcricionais do marcador de *stemness* *PROM1* (gene que codifica a proteína CD133) e de diferenciação neuronal *ENO2* por RT-qPCR. Os resultados obtidos indicam que os níveis de *PROM1* estão elevados nas esferas de SK-N-Be(2) e SH-SY5Y, respectivamente (1.39-fold; 0.41-fold,  $p < 0.01$ ) (Figura 2C). No modelo de diferenciação com ATRA, foi encontrado uma redução nos níveis de *ENO2* na linhagem SK-N-Be(2) (0.34-fold,  $p < 0.001$ ) enquanto na linhagem SH-SY5Y foi visto um aumento significativo (0.92-fold,  $p < 0.0001$ ) (Figura 2C). Para melhor entender o papel de BMI-1 nos fenótipos de NB, foi avaliado os níveis transcricionais de *BMI1* por RT-qPCR. Os resultados indicam que os níveis de *BMI1* não sofre alteração nas esferas de NB, enquanto em modelo de células tratadas com ATRA foi encontrada uma redução de *BMI1* (0.38-fold,  $p < 0.001$ , SK-N-BE(2); 0.48-fold,  $p < 0.0001$ , SH-SY5Y) (Figura 2C).

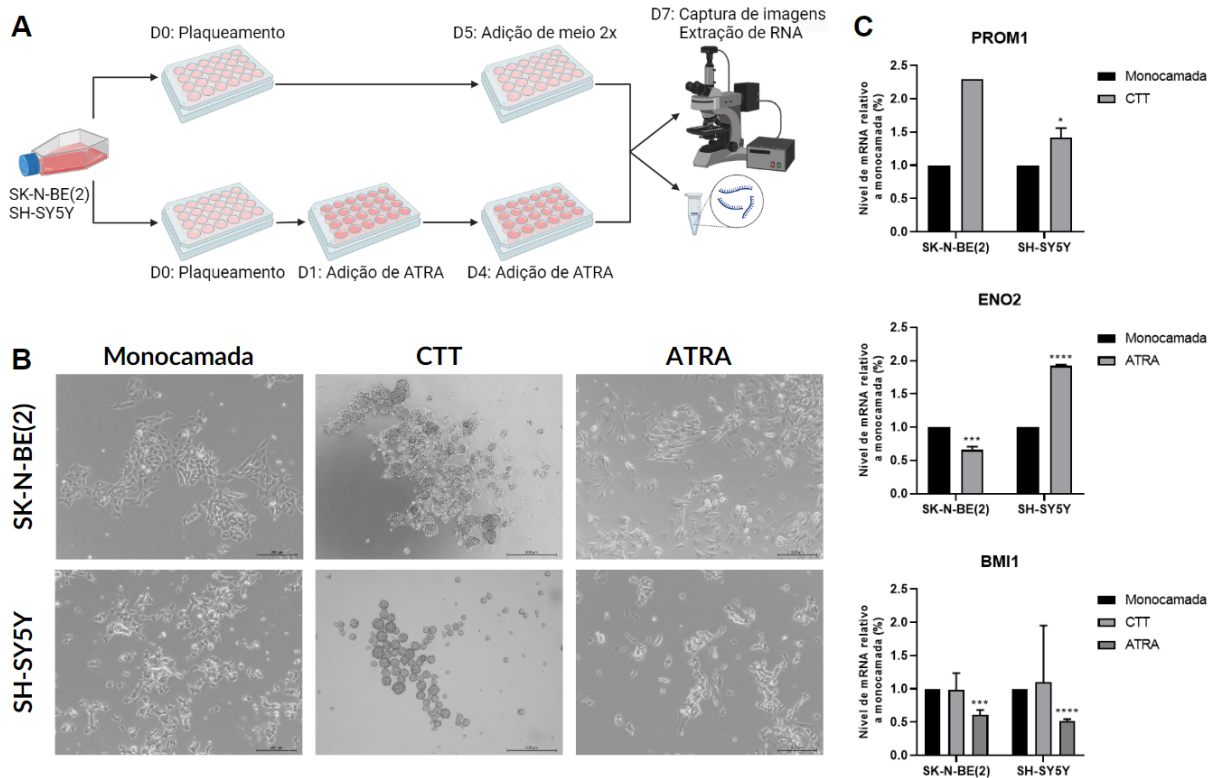


Figura 2: Avaliação da expressão de BMI1 nos fenótipos celulares de NB. (A) Esquema representativo dos ensaios para obtenção dos diferentes fenótipos celulares: células em monocamada, esferas (CTT) e células diferenciadas (ATRA). (B) Imagens representativas dos fenótipos nas linhagens de NB. (C) Nível relativo de mRNA de *PROM1* (N=1 na linhagem SK-N-Be(2)), *ENO2* e *BMI1* nos fenótipos de NB por RT-qPCR. Os dados foram analisados por Teste T e estão apresentados como médias  $\pm$  DP. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### Inibição farmacológica de BMI1 reduz viabilidade celular em neuroblastoma

Para avaliar o efeito da inibição de BMI-1 nas linhagens de NB foi realizada a inibição farmacológica de BMI-1 com PTC-209 (Figura 3A). Os resultados encontrados indicam que o tratamento com PTC-209 apresenta um desfecho dose-dependente para ambas as linhagens. As doses de PTC-209 apresentaram uma redução significativa na viabilidade das linhagens de NB (Figura 3A). Foi realizado os ensaios de Western blot e imunofluorescência para detecção dos níveis proteicos de BMI-1 após tratamento com PTC-209. Os resultados destes ensaios indicam aparentes reduções nos níveis de BMI-1 após tratamento nas linhagens de NBs (Figura 3B-C).

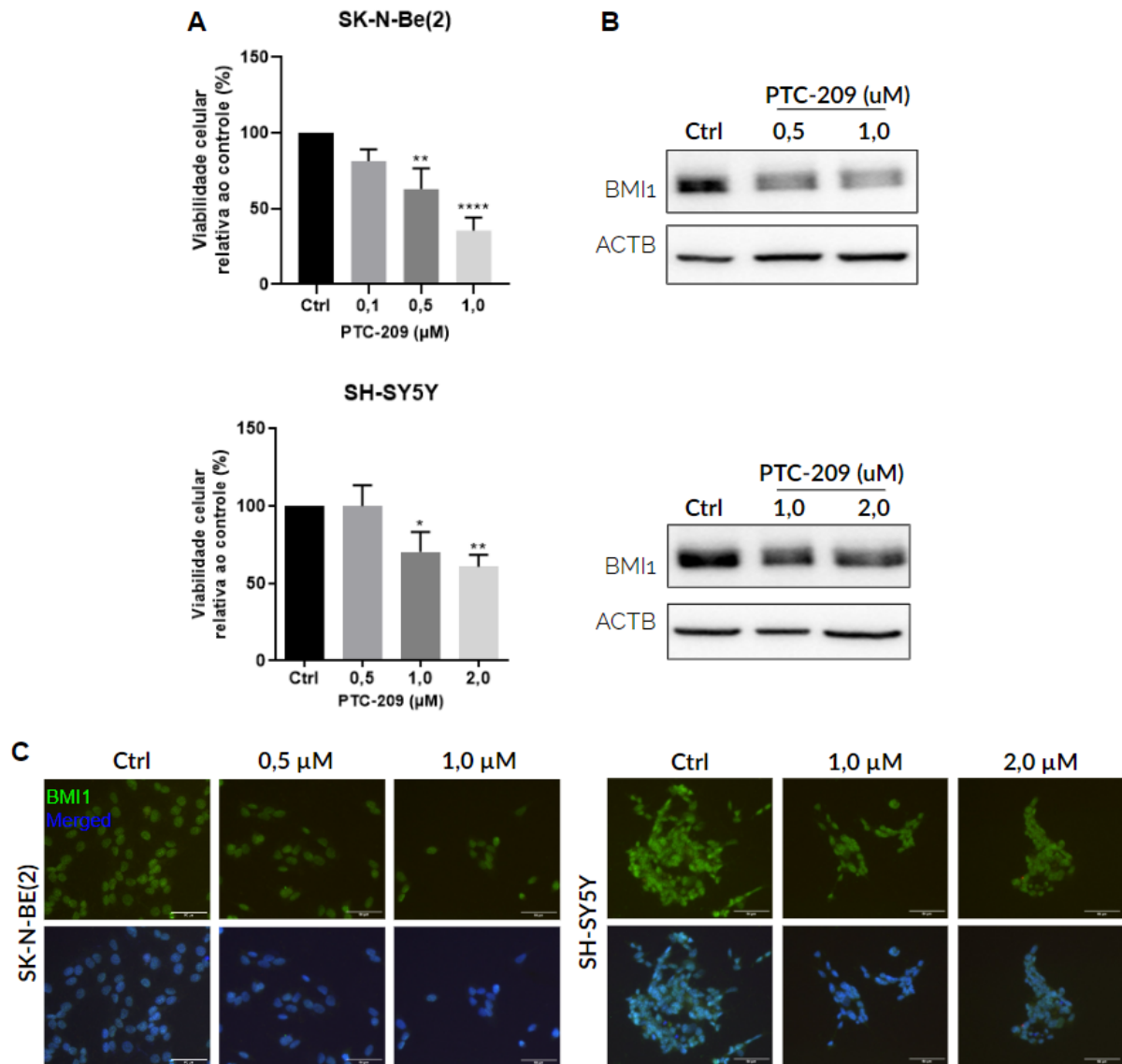


Figura 3: Inibição farmacológica de BMI-1 reduz viabilidade celular em NB. (A) Células de NB foram tratadas com PTC-209 (0,1 - 2,0  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de exclusão de azul de tripan. (B) Avaliação do nível de BMI-1 por Western blot em células controle tratadas com PTC-209 (N=1). (C) Imagens representativas de do ensaio de imunofluorescência para BMI-1 em células controle e tratadas com PTC-209. Para ensaios de Western blot e imunofluorescência células de NB foram tratadas por 48 horas nas seguintes doses: 0,5 $\mu\text{M}$  e 1,0 $\mu\text{M}$  para SK-N-Be(2); 1,0 $\mu\text{M}$  e 2,0 $\mu\text{M}$  para SH-SY5Y. DAPI foi utilizado como marcador nuclear. Os dados apresentados são médias  $\pm$  DP, sendo cada grupo comparado com o grupo controle, ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ . Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### Inibição farmacológica de BMI-1 reduz a viabilidade de esferas em Neuroblastoma

Para avaliar o papel da inibição de BMI-1 em células com fenótipo de CTTs, foi realizado um ensaio de formação de esferas, o qual após 5 dias de enriquecimento de CTT foi adicionado PTC-209 por 48 horas (Figura 4A). Os resultados encontrados sugerem que a inibição de BMI-1 é capaz de reduzir o número de esferas formadas em SK-N-Be(2) e

SH-SY5Y, respectivamente (42,2%,  $p < 0.05$ ; 61,8%  $p < 0.01$ ) (Figura 4A-B) e a viabilidade das esferas de SH-SY5Y (45,6%,  $p < 0.01$ ) (Figura 4C).

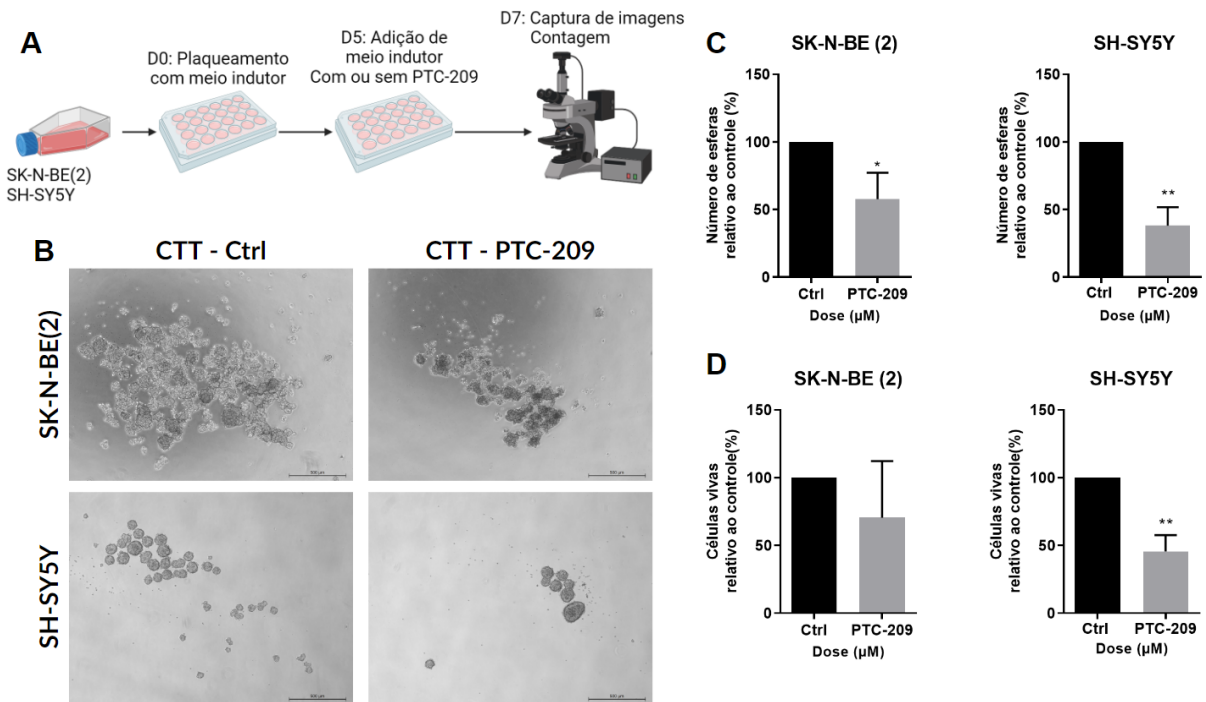


Figura 4: Efeito de PTC-209 em esferas de NB. (A) Imagens representativas esferas controle e tratadas com PTC-209 (0,5 $\mu\text{M}$  para SK-N-Be(2); 1,0 $\mu\text{M}$  para SH-SY5Y) por 48 horas. (B) Efeito de PTC-209 no número de esferas formadas em relação ao controle. (C) Análise do número de células vivas foi verificada por exclusão de azul de tripan em esferas controle e tratadas com PTC-209. Imagens de microscopia foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 5X. Os dados foram analisados por Teste T e estão apresentados como médias  $\pm$  DP. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

### Inibição farmacológica de BMI-1 induz expressão do marcador de diferenciação $\beta$ 3-tubulina

Os resultados anteriores indicam que células expostas a ATRA têm redução nos níveis de *BMI1*, dessa forma, buscamos avaliar se longas exposições a PTC-209 poderiam induzir um estado de maior diferenciação das células de NB. Para isso, células de NB foram tratadas com PTC-209 ou ATRA por 7 dias e foi avaliado a viabilidade celular por exclusão de azul de tripan e os níveis de BMI-1 e  $\beta$ 3-tubulina (TUBB3) por ensaio de imunofluorescência (Figura 5A). Os resultados obtidos indicam que após 7 dias de tratamento com PTC-209 ou ATRA, células de NB adquiriram mudanças morfológicas similares a prolongamento (Figura 5B). Além disso, foi observado que a inibição de BMI-1 causou uma redução na viabilidade de SK-N-Be(2) e SH-SY5Y, respectivamente (76,3%,  $p < 0.01$ ; 65,1%  $p < 0.05$ ) (Figura 5C). Ensaio de imunofluorescência sugere que PTC-209 e ATRA reduzem os níveis de BMI-1 (Figura 5D) e aumentam os níveis de  $\beta$ 3-tubulina em células de NB (Figura 5E).



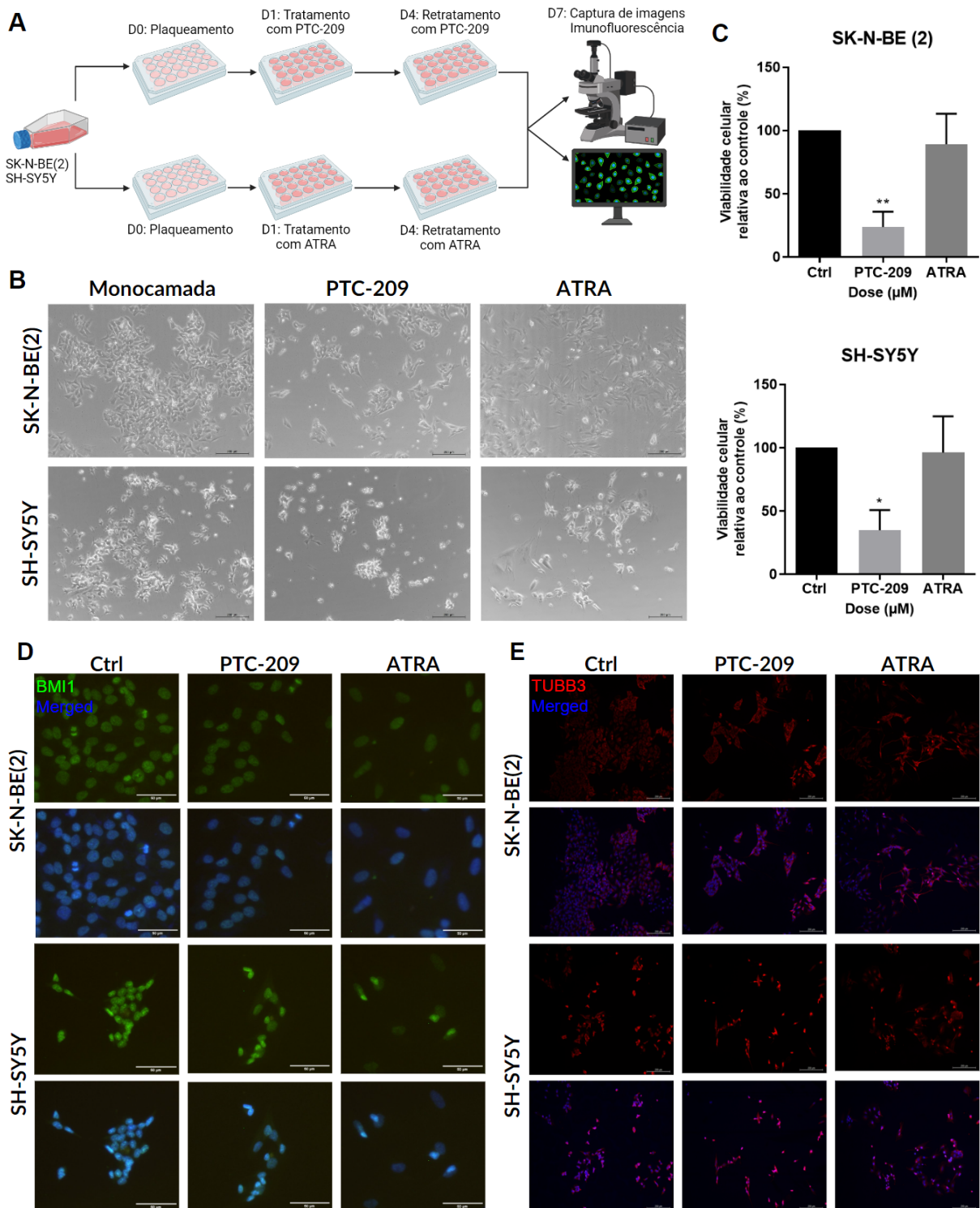


Figura 5: Inibição farmacológica de BMI-1 induz diferenciação em células de NB. (A) Esquema representativo do modelo de tratamento a longo prazo de PTC-209 e ATRA. (B) Imagens representativas das células de NB expostas a PTC-209 ou ATRA. (C) Viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de exclusão de azul de tripan. (D) Avaliação do nível de BMI-1 em células controle tratadas com PTC-209 ou ATRA. Células de NB foram tratadas com PTC-209 (0,5 $\mu\text{M}$  em SK-N-Be(2); 1,0 $\mu\text{M}$  em SH-SY5Y) ou ATRA (500 nM) por 7 dias. (E)  $\beta$ 3-tubulina (TUBB3). DAPI foi utilizado como marcador nuclear. Os dados apresentados são médias  $\pm$  DP, sendo cada grupo comparado com o grupo controle, ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

## Discussão

Ao longo dos anos, muitos estudos vêm sendo publicados quanto ao papel de BMI-1 na tumorigênese, auto-renovação e proliferação de células em NB [5, 7, 8]. Neste estudo mostramos que a inibição farmacológica de BMI-1 foi capaz de reduzir a viabilidade celular nos diferentes fenótipos de neuroblastoma provavelmente pela indução de diferenciação.

Neste trabalho utilizamos duas linhagens de neuroblastoma que apresentam diferentes níveis de BMI-1 e analisamos o efeito da inibição desta proteína em diferentes contextos celulares. Para analisar células com fenótipos mais indiferenciados realizamos o modelo de esferas, com enriquecimento de CTTs. Através dos ensaios de qPCR, foram vistos aumentos dos níveis de *PROM1* (CD133) em ambas as linhagens após indução da formação de esferas, indicando um enriquecimento da população de CTTs (Figura 2C), podendo ser visualizado os efeitos na morfologia das células induzidas (Figura 2B). *PROM1*, também conhecido como CD133, é um marcador bem estabelecido de CTTs, podendo indicar um tumor mais agressivo. Em NB, já foi visto uma relação entre a alta expressão de CD133 e maior capacidade tumorigênica, progressão do tumor e a manutenção de um estado indiferenciado. Ademais, estudos apontam que pacientes que apresentam maiores expressões desse marcador tendem a apresentar doenças em estágios mais avançados [3]. Para a análise de um fenótipo mais diferenciado empregamos o tratamento com ATRA. Neste modelo foi constatado aumento significativo nos níveis de ENO2 apenas na linhagem SH-SY5Y, enquanto a linhagem SK-N-BE(2) mostrou reduções significativas do marcador. Foi suposto que a dose e tempo escolhidos para o tratamento com ATRA não foram capazes de induzir diferenciação. Estudos com ATRA em linhagens de NB já mostraram seus efeitos na diferenciação celular, inclusive nas mesmas linhagens trabalhadas no presente estudo, indicando aumento tanto na quantidade como no comprimento de neuritos formados e redução da proliferação celular [9]. Mendieta et al apresentou o  $IC_{50}$  de ATRA, em 72h de tratamento, para as duas linhagens trabalhadas, indicando maior sensibilidade na linhagem SH-SY5Y ao tratamento diferenciativo, correspondendo com nossos achados. Por mais que os demais estudos que utilizem ATRA em NB tendam a utilizar o mesmo tempo de tratamento (7 dias), os mesmos utilizam doses muito maiores (1-10  $\mu$ M) em comparação com nosso estudo [10-12], o que pode explicar a diferença dos resultados encontrados.

ENO2 é um marcador utilizado para diversos tumores, indicando um maior grau de diferenciação e maturação celular. Apesar de neste trabalho o marcador ENO2 ter sido

escolhido como um indicativo de diferenciação, estudos mostram que níveis elevados de ENO2 estão presentes em todos os estágios de NB, especialmente em pacientes metastáticos [13], mostrando sua possível utilização na confirmação de diagnósticos, monitoramento do tratamento e recidiva do câncer [14]. Assim, a dose e tempo escolhido para o tratamento de ATRA foram inefetivas para induzir diferenciação e podem ter contribuído para a seleção de células mais resistentes. Quanto aos níveis de BMI-1, houveram reduções em ambas as linhagens quando tratadas com ATRA, ressaltando o papel de BMI-1 na atribuição de características tronco e na inibição da diferenciação.

A inibição farmacológica de BMI-1 diminui a viabilidade celular de NB, incluindo culturas enriquecidas de CTT. Como esperado, a inibição do crescimento celular foi dependente do nível basal de BMI-1 das linhagens utilizadas, com a célula com maior conteúdo de BMI-1 necessitando de maiores doses do inibidor PTC-209 para atingir o efeito na viabilidade celular. Utilizando silenciamento de BMI1, Akita *et al* demonstrou o papel protetor de BMI-1 em NB contra apoptose induzida por danos ao DNA pela indução de indiferenciação e inativação de P53 e P73, além de demonstrar que o *knockdown* de BMI1 resulta em mais mortes por apoptose que o tratamento diferenciativo com ATRA [15], podendo indicar um desfecho similar para a inibição farmacológica de BMI-1. Cui *et al* observou que o silenciamento de BMI1 resulta em aumento da diferenciação, além de uma perda da capacidade tumorigênica e clonogênica auto-renovadora [5, 6], indicando sua função na formação de CTTs e tumores com características mais tronco.

Outra abordagem utilizada neste estudo foi o tratamento por 7 dias com o inibidor de BMI-1, uma tentativa de mimetizar os tratamentos *in vitro* com ATRA sugeridos para indução de diferenciação de NB. Apesar de nosso modelo com ATRA não apresentar aumento no marcador de diferenciação escolhido (ENO2), o tratamento por 7 dias utilizando o inibidor de BMI-1, PTC-209, intensificou o efeito antiproliferativo visualizado em 48h e induziu um aparente aumento do marcador de diferenciação  $\beta$ 3-tubulina (TUBB3). Assim como utilizado neste estudo, mudança na morfologia e aumento da presença de  $\beta$ 3-tubulina em ensaios de imunofluorescência em células de NB foram utilizados por Chaudhari *et al* para identificar a diferenciação induzida por tratamento com ATRA e um agonista de PPAR $\gamma$  [16].

## **Conclusão**

O presente estudo caracterizou os diferentes fenótipos encontrados em NB, assim como apresentou evidências que sugerem um efeito diferenciativo para a inibição de BMI-1. Tratamento farmacológico de BMI-1 demonstrou redução significativa da viabilidade em monocamada e CTT. Essa diminuição pode estar associada à regulação da diferenciação celular, uma vez que o tratamento prolongado com PTC-209 aumentou os níveis do marcador  $\beta$ 3-tubulina. Mais estudos são necessários para confirmar o uso de inibição de BMI-1 como alternativa terapêutica para NB, entretanto o presente estudo mostrou uma suposta diferenciação induzida pela inibição de BMI-1, indicando sua possível utilização como tratamento diferenciativo para facilitar a cura de pacientes, principalmente aqueles com a doença de alto risco.

## Referências

1. Gurney, J. G., Severson, R. K., Davis, S., & Robison, L. L. (1995). Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*, 75(8), 2186–2195.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950415\)75:8<2186::aid-cncr2820750825>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950415)75:8<2186::aid-cncr2820750825>3.0.co;2-f)
2. Maris J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*, 362(23), 2202–2211. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804577>
3. Bahmad, H. F., Chamaa, F., Assi, S., Chalhoub, R. M., Abou-Antoun, T., & Abou-Kheir, W. (2019). Cancer Stem Cells in Neuroblastoma: Expanding the Therapeutic Frontier. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 131. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00131>
4. Zhao, J., Pan, C., Xu, M., Zhou, M., Gao, Y. J., Hu, W. T., & Tang, J. Y. (2017). *Zhonghua er ke za zhi = Chinese journal of pediatrics*, 55(10), 754–759.  
<https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2017.10.008>
5. Cui, H., Hu, B., Li, T., Ma, J., Alam, G., Gunning, W. T., & Ding, H. F. (2007). Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *The American journal of pathology*, 170(4), 1370–1378. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060754>
6. Cui, H., Ma, J., Ding, J., Li, T., Alam, G., & Ding, H. F. (2006). Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of I-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), 34696–34704.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M604009200>

7. Huang, R., Cheung, N. K., Vider, J., Cheung, I. Y., Gerald, W. L., Tickoo, S. K., Holland, E. C., & Blasberg, R. G. (2011). MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(12), 4138–4149. <https://doi.org/10.1096/fj.11-185033>
8. Mao, L., Ding, J., Perdue, A., Yang, L., Zha, Y., Ren, M., Huang, S., Cui, H., & Ding, H. F. (2012). Cyclin E1 is a common target of BMI1 and MYCN and a prognostic marker for neuroblastoma progression. *Oncogene*, 31(33), 3785–3795. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.536>
9. Mendieta, I., Rodríguez-Gómez, G., Rueda-Zarazúa, B., Rodríguez-Castelán, J., Álvarez-León, W., Delgado-González, E., Anguiano, B., Vázquez-Martínez, O., Díaz-Muñoz, M., & Aceves, C. (2020). Molecular iodine synergized and sensitized neuroblastoma cells to the antineoplastic effect of ATRA. *Endocrine-related cancer*, 27(12), 699–710. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0354>
10. Cheung, Y. T., Lau, W. K., Yu, M. S., Lai, C. S., Yeung, S. C., So, K. F., & Chang, R. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.11.001>
11. Redova, M., Chlapek, P., Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., & Veselska, R. (2010). Influence of LOX/COX inhibitors on cell differentiation induced by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cell lines. *International journal of molecular medicine*, 25(2), 271–280.
12. Khazeem, M. M., Casement, J. W., Schlossmacher, G., Kenneth, N. S., Sumbung, N. K., Chan, J. Y. T., McGow, J. F., Cowell, I. G., & Austin, C. A. (2022). TOP2B Is Required to Maintain the Adrenergic Neural Phenotype and for ATRA-Induced Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Molecular neurobiology*, 59(10), 5987–6008. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02949-6>
13. Isgrò, M. A., Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in experimental medicine and biology*, 867, 125–143. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9)
14. Massaron, S., Seregini, E., Luksch, R., Casanova, M., Botti, C., Ferrari, L., Martinetti, A., Molteni, S. N., Bellani, F. F., & Bombardieri, E. (1998). Neuron-specific enolase evaluation in patients with neuroblastoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for*

Oncodevelopmental Biology and Medicine, 19(4), 261–268.

<https://doi.org/10.1159/000030016>

15. Akita, N., Okada, R., Mukae, K., Sugino, R. P., Takenobu, H., Chikaraishi, K., Ochiai, H., Yamaguchi, Y., Ohira, M., Koseki, H., & Kamijo, T. (2023). Polycomb group protein BMI1 protects neuroblastoma cells against DNA damage-induced apoptotic cell death. *Experimental cell research*, 422(1), 113412. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113412>

16. Chaudhari, N., Talwar, P., Lefebvre D'hellencourt, C., & Ramanan, P. (2017). CDDO and ATRA Instigate Differentiation of IMR32 Human Neuroblastoma Cells. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 310. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00310>

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo caracterizou a expressão de BMI-1 em três modelos in vitro de NB e o efeito da inibição farmacológica desta proteína nas células de NB, incluindo CTTs. O inibidor PTC-209 conseguiu reduzir a viabilidade celular nos fenótipos de monocamada e em CTTs, possivelmente pela diferenciação causada pela inibição de BMI1. Isso é suportado pelos efeitos semelhantes vistos nos tratamentos com PTC-209 e os efeitos já observados em estudos anteriores com ATRA, onde houve na indução de diferenciação e redução dos níveis de BMI-1, sugerindo um mecanismo similar para os dois compostos.

Como perspectivas para o trabalho atual, pretendemos finalizar as replicatas biológicas para os experimentos de Western Blotting e RT-qPCR para BMI-1 e marcador de indiferenciação. Além disso, seria interessante realizar a técnica de Western Blotting para diferentes alvos proteicos, como MYCN e CD133, para associar possíveis mecanismos de manutenção de um estado indiferenciado por BMI-1. Adicionalmente, a execução de imunofluorescência de dupla marcação para ambos BMI-1 e  $\beta$ 3-tubulina auxiliaria na compreensão dos efeitos da inibição de BMI-1 ou tratamento com ATRA, podendo associar em cada célula nível de BMI-1 e grau de diferenciação.

## REFERÊNCIAS

AKITA, N. *et al.* Polycomb group protein BMI1 protects neuroblastoma cells against DNA damage-induced apoptotic cell death. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 422, n. 1, p. 113412, 2023.

BAHMAD, H. F. *et al.* Cancer Stem Cells in Neuroblastoma: Expanding the Therapeutic Frontier. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, p. 131, 2019.

BHATTACHARYA, R. *et al.* Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. **Genes & Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 225–239, 2015.

BRODEUR, G. M. Spontaneous regression of neuroblastoma. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 372, n. 2, p. 277–286, 2018.

CHAKRABARTI, L. *et al.* Reversible adaptive plasticity: a mechanism for neuroblastoma cell heterogeneity and chemo-resistance. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 2, 2012.  
Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00082/abstract>. Acesso em: 11 set. 2023.

COHEN, I.; BAR, C.; EZHKOVA, E. Activity of PRC1 and Histone H2AK119 Monoubiquitination: Revising Popular Misconceptions. **BioEssays**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1900192, 2020.

COULON, A. *et al.* Functional Sphere Profiling Reveals the Complexity of Neuroblastoma Tumor-Initiating Cell Model. **Neoplasia**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 991-IN30, 2011.

CRAIG, B. T. *et al.* Induced differentiation inhibits sphere formation in neuroblastoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 477, n. 2, p. 255–259, 2016.

CUI, H. *et al.* Bmi-1 Is Essential for the Tumorigenicity of Neuroblastoma Cells. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 170, n. 4, p. 1370–1378, 2007.

DUBOIS, S. G.; MACY, M. E.; HENDERSON, T. O. High-Risk and Relapsed Neuroblastoma: Toward More Cures and Better Outcomes. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, [s. l.], n. 42, p. 768–780, 2022.



EVERSON, T. C.; COLE, W. H. SPONTANEOUS REGRESSION OF MALIGNANT DISEASE: GUEST EDITORIAL. **Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 169, n. 15, p. 1758, 1959.

FARINA, A. R. *et al.* Mechanisms involved in selecting and maintaining neuroblastoma cancer stem cell populations, and perspectives for therapeutic targeting. **World Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 685–736, 2021.

GURNEY, J. G. *et al.* Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer**, [s. l.], v. 75, n. 8, p. 2186–2195, 1995.

HERO, B. *et al.* Localized Infant Neuroblastomas Often Show Spontaneous Regression: Results of the Prospective Trials NB95-S and NB97. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 1504–1510, 2008.

HUANG, T. *et al.* Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. **Theranostics**, [s. l.], v. 10, n. 19, p. 8721–8743, 2020.

IRWIN, M. S. *et al.* Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 39, n. 29, p. 3229–3241, 2021.

KHOLODENKO, I. V. *et al.* Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2018, p. 1–25, 2018.

KONG, Y. *et al.* Targeting of BMI-1 with PTC-209 inhibits glioblastoma development. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1199–1211, 2018.

LONDON, W. B. *et al.* Evidence for an Age Cutoff Greater Than 365 Days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 27, p. 6459–6465, 2005.

MAJUMDAR, S.; LIU, S.-T.; DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF TOLEDO, TOLEDO, OH 43606, USA. Cell division symmetry control and cancer stem cells. **AIMS Molecular Science**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 82–101, 2020.

MARIS, J. M. *et al.* Neuroblastoma. **The Lancet**, [s. l.], v. 369, n. 9579, p. 2106–2120, 2007.

MARIS, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 362, n. 23, p. 2202–2211, 2010.

MATTHAY, K. K. *et al.* Neuroblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16078, 2016.

MATTHAY, K. K. *et al.* Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13- cis -Retinoic Acid. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 341, n. 16, p. 1165–1173, 1999.

MAYR, C. *et al.* The BMI1 inhibitor PTC-209 is a potential compound to halt cellular growth in biliary tract cancer cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 745–758, 2016.

PARK, J. R.; EGGERT, A.; CARON, H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. **Pediatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 97–120, 2008.

QIU, B.; MATTHAY, K. K. Advancing therapy for neuroblastoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 515–533, 2022.

REYNOLDS, C. P. *et al.* Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 197, n. 1–2, p. 185–192, 2003.

SOKOL, E.; DESAI, A. The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. **Children**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 27, 2019.

VESCHI, V.; VERONA, F.; THIELE, C. J. Cancer Stem Cells and Neuroblastoma: Characteristics and Therapeutic Targeting Options. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 10, p. 782, 2019.

VILLABLANCA, J. G. *et al.* Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 894–901, 1995.

WANG, J. *et al.* A novel BMI-1 inhibitor QW24 for the treatment of stem-like colorectal cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 422, 2019.

WANG, Q. *et al.* Pharmacological inhibition of Bmi1 by PTC-209 impaired tumor growth in head neck squamous cell carcinoma. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 107, 2017.

WEISWALD, L.-B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WHITTLE, S. B. *et al.* Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 369–386, 2017.

YU, Z. *et al.* Cancer stem cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 2144–2151, 2012.

ZHANG, J. T. *et al.* MycN Is Critical for the Maintenance of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Crest Stem Cells. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e0148062, 2016.

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

Normas de publicação: <<https://www.springer.com/journal/11010/submission-guidelines>>.

### Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

### Title

The title should be concise and informative.

### Author information

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

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

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

### **Abstract**

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

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials

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

### **Keywords**

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

### **Text**

#### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

#### **Headings**

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### **Abbreviations**

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

### **Footnotes**

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

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

### **Acknowledgments**

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

## **References**

### **Citation**

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

[...]

### **Reference list**

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

The entries in the list should be numbered consecutively.

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

[...]

### **Statements & Declarations**

[...]

### **Funding**

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

[...]

**Competing Interests**

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

[...]

**Author Contributions**

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

[...]