



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Mylla Menezes Dimas

**ANÁLISE *IN SILICO* DO SECRETOMA DO NEUROBLASTOMA E
CARACTERIZAÇÃO DA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR DENTRO DO
MICROAMBIENTE TUMORAL**

Florianópolis

2023

Mylla Menezes Dimas

**ANÁLISE *IN SILICO* DO SECRETOMA DO NEUROBLASTOMA E
CARACTERIZAÇÃO DA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR DENTRO DO
MICROAMBIENTE TUMORAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Dimas, Mylla Menezes

Análise in silico do secretoma do neuroblastoma e caracterização da comunicação intercelular dentro do microambiente tumoral / Mylla Menezes Dimas ; orientador, Edroaldo Lummertz da Rocha, 2023.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biologia de Sistemas . 3. Neuroblastoma. 4. Secretoma tumoral. 5. Comunicação celular. I. da Rocha, Edroaldo Lummertz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Mylla Menezes Dimas

Análise in silico do secretoma do neuroblastoma e caracterização da comunicação intercelular dentro do microambiente tumoral

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof. Glauber Wagner, Dr.

Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências

Prof. Aguinaldo R. Pinto, Dr.

Coordenador do PPG em Biotecnologia e Biociências

Prof.(a) Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2023

Este trabalho é dedicado aos meus pais, ao meu irmão e aos meus amigos que ouviram os meus surtos e falaram para eu não me cobrar tanto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer o meu orientador, Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha, pelo suporte e compreensão no meu processo de aprendizado. O senhor é uma inspiração e um template de como orientadores deveriam ser. Obrigada por compartilhar o seu conhecimento e o seu amor por uma ciência boa e bem feita. Espero ter colaborado, mesmo de forma pequena, no crescimento do laboratório. Muito obrigada!

Aos pós-doc Gabriela e Marcelo por serem o meu oráculo, quando a internet não tinha as respostas pros erros que apareciam ao longo dos códigos, pela paciência em me ensinar e por terem compartilhado o seu entusiasmo pela ciência comigo.

Aos membros da banca, Dr. Alfeu Zanotto, Dr. Glauber Wagner, Dr. Jonathan Paulo, e Dra. Patrícia Stoco, pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho e de contribuir para minha formação profissional.

À CAPES por todo o suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial, Mary Akylla, por aturarem os meus surtos acadêmicos e não acadêmicos.

Aos meus familiares por sempre torcerem e rezarem por mim.

Aos meus pais, Araci e Dimas por terem sido ótimos pais para mim e meu irmão, terem me dado tudo e um pouco mais pra eu estar onde estou e por nos amar incondicionalmente.

E em especial gostaria de agradecer ao meu irmão, Akell M. Dimas, por todo o suporte e parceria, não só nesses 2 anos de mestrado, mas em todos os meus anos de vida. Você sempre cuidou de mim, do seu jeito *blasé*, mas eu sempre enxerguei o que realmente importava e o que você estava realmente querendo dizer. Espero ter dado e sempre dar suporte quando você precisar de alguém. Você é uma das minhas maiores inspirações quando se trata de tenacidade acadêmica/profissional. Obrigada por tudo em todos esses anos de vida e por todos que virão.

Meus profundos agradecimentos a todos e todas que participaram direta ou indiretamente no meu amadurecimento pessoal e profissional.

"Promise me you'll always remember that you are braver than you believe, stronger than you seem and smarter than you think".

A. A. Milne

(Winnie The Pooh, 1926).

RESUMO

O microambiente tumoral (TME) é um complexo ecossistema, um nicho especializado, criado durante a progressão tumoral através da interação de proteínas secretadas (secretoma) pelas células cancerosas com o tecido circundante. As células tumorais controlam, através de redes de sinalização complexas, os componentes celulares e não celulares do microambiente tumoral, e desta forma, conseguem modular processos de angiogênese, evasão, metástase e entre outros. O neuroblastoma (NB) é um tumor sólido extracraniano, considerado um câncer pediátrico e a neoplasia maligna mais comum diagnosticada no primeiro ano de vida, representando 7% dos casos pediátricos e 15% de todas as mortes por câncer pediátrico. Suas características mais notáveis são sua heterogeneidade clínica, pois podem se desenvolver em qualquer parte do sistema nervoso simpático. O objetivo deste trabalho busca caracterizar o secretoma do neuroblastoma e identificar as interações e ligantes/genes relevantes à patogênese do neuroblastoma. A metodologia utilizou-se de dados de amostras disponibilizados em bancos de dados e artigos relacionados, priorizando aos dados de single-cell publicamente disponíveis. As análises foram conduzidas no RStudio utilizando os pacotes de programação ClusterProfiler, Seurat, DOSE e FUSCA, com os algoritmos do CellRouter e CellComm. Utilizando o CellRouter, foram identificados 16 genes comumente expressos dentre os grupos tumorais e interações ligante-receptor interessantes, como a RTN4/CD99 e MAPT/PRNP. Com o CellComm, identificou-se possíveis vias de sinalização relacionadas ao NB, muitas iniciadas pelo NTKR1. A análise de genes diferencialmente expressos revelou os genes STMN2, RTN4, TUBA1A e MAPT como uma das células com maior expressão no grupo tumoral, dentre o grupo controle, destaca-se a presença dos genes CD99 e APP. O enriquecimento funcional apresentou em sua maioria genes envolvidos na regulação do desenvolvimento neuronal, mitocondrial, resposta a ions metálicos, destacando-se o gene MAPT. Os genes MAPT e RTN4 mostraram-se promissores para um aprofundamento de estudos relacionados ao neuroblastoma. Esses resultados auxiliam a compreender o mecanismo molecular da patogênese do NB, investigando sobre as interações celulares e estabelecendo relações a serem exploradas em futuras pesquisas.

Palavras-chave: scRNA-seq; Biologia de sistemas; Neuroblastoma; Secretoma Tumoral; Comunicação celular

ABSTRACT

The tumor microenvironment (TME) is a complex ecosystem, a specialized niche, created during tumor progression through the interaction of secreted proteins (secretome) by cancer cells with the surrounding tissue. Tumor cells control, through complex signaling networks, the cellular and non-cellular components of the tumor microenvironment, and in this way, manage to modulate processes of angiogenesis, evasion, metastasis, among others. Neuroblastoma (NB) is an extracranial solid tumor, considered a pediatric cancer and the most common malignancy diagnosed in the first year of life, representing 7% of pediatric cases and 15% of all pediatric cancer deaths. Its most notable characteristics are its clinical heterogeneity, as it can develop in any part of the sympathetic nervous system. The objective of this work is to characterize the neuroblastoma secretome and identify the interactions and ligands/genes relevant to the pathogenesis of neuroblastoma. The methodology used sample data available in databases and related articles, prioritizing publicly available single-cell data. Analyses were conducted in RStudio using the ClusterProfiler, Seurat, DOSE and FUSCA programming packages, with CellRouter and CellComm algorithms. Using CellRouter, 16 genes commonly expressed among tumor groups and interesting ligand-receptor interactions were identified, such as RTN4/CD99 and MAPT/PRNP. With CellComm, possible NB-related signaling pathways were identified, many initiated by NTKR1. The analysis of differentially expressed genes revealed the STMN2, RTN4, TUBA1A and MAPT genes as one of the cells with the highest expression in the tumor group, among the control group, the presence of CD99 and APP genes stands out. The functional enrichment presented mostly genes involved in the regulation of neuronal and mitochondrial development, response to metallic ions, highlighting the MAPT gene. The MAPT and RTN4 genes showed promise for deepening studies related to neuroblastoma. These results help to understand the molecular mechanism of NB pathogenesis, investigating cellular interactions and establishing relationships to be explored in future research.

Keywords: scRNA-seq; Systems Biology; Neuroblastoma; Tumor Secretoma; Cellular Communication

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos celulares originados pela crista neural.....	21
Figura 2 - Processo de diferenciação celular e seus fatores até a formação do neuroblastoma	22
Figura 3 - Microambiente tumoral e seus componentes.....	26
Figura 4 - Estratégias de imunoterapia voltada para o neuroblastoma.....	27
Figura 5 – Mecanismos de evasão ao sistema imune do neuroblastoma.....	29
Figura 6 - Visualização dos dados com dimensão reduzida (UMAP).....	37
Figura 7 – Gráfico de dimensão reduzida com os genes expressos nos grupos celulares do dataset nb_PMC.....	38
Figura 8 - Gráfico de dimensão reduzida com os genes expressos nos grupos celulares do dataset nb_GOSH	38
Figura 9 - Heatmap com os genes assinatura dos grupos celulares de cada dataset.....	39
Figura 10 - Heatmaps de interação entre os grupos celulares	40
Figura 11 – Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores no grupo celular tumoral do dataset nb_GOSH.....	42
Figura 12 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores no grupo celular tumoral do dataset nb_PMC	43
Figura 13 - Expressão dos ligantes comuns tumorais dos datasets tumorais	45
Figura 14 - Análise de predição das vias de sinalização downstream.....	49
Figura 15 - Visualização dos dados integrados com dimensão reduzida (UMAP).....	50
Figura 16 - Heatmap com os genes assinatura dos dados integrados.....	50
Figura 17 - Heatmaps de interação entre os grupos celulares integrados.....	51
Figura 18 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores do dataset integrado com os grupos celulares tumorais como receptores	53
Figura 19 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores do dataset integrado com os grupos celulares tumorais como secretores.....	54
Figura 20 - Expressão dos genes comuns tumorais no dataset integrado	55
Figura 21 – Enriquecimento funcional (GO e DO) dos genes selecionados.....	58
Figura 22 – Enriquecimento funcional (GO) dos genes selecionados integrados.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Funções e doenças relacionadas aos genes tumorais selecionados	46
Quadro 2 – Vias de sinalização relacionadas ao gene MAPT	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação e diferenças dos sistemas de estratificação do neuroblastoma.....	18
Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos dos grupos tumorais (fc positivo)	57
Tabela 3 - Genes diferencialmente expressos dos grupos controle (fc negativo).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AGM	Aorta-gônada-mesonefro
ALK	Quinase de linfoma anaplásico
APP	Amyloid Precursor Protein
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
COG	Children's Oncology Group
CRC	Circuito Regulador Central
DO	Ontologia da Doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
FUSCA	Framework for Unified Single-Cell Analysis
GO	Ontologia do Gene
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
MAPT	Microtubule Associated Protein Tau
MDSCs	Células imaturas mieloides
MES	Células mesenquimais indiferenciadas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MKI	Índice de mitose-cariorrexe
MMPs	Metaloproteinase de matriz
NB	Neuroblastoma
NCCs	Células da crista neural
NGF	Fator de crescimento nervoso
NIH	National Institute of Health
NKs	Células Natural Killer
SCPs	Precursosores de células Schwann
scRNA-seq	Sequenciamento de célula única

SIOPEN	International Society of Pediatric Oncology European Neuroblastoma
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TF	Fatores de transcrição
TILS	Linfócitos infiltrantes de tumores
TME	Microambiente tumoral
Treg	Linfócitos T reguladores
TrkA	Receptor de tropomiosina quinase A
TrkB	Receptor de tropomiosina quinase B
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1. Aspectos gerais do neuroblastoma	17
1.2. Aspectos moleculares do neuroblastoma	22
1.3. Microambiente e secretoma tumoral	25
2. PERGUNTA E HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Obtenção dos datasets	32
4.2. Visualização dos clusters celulares nos datasets	32
4.3. Anotação e identificação dos genes assinatura dos grupos celulares	33
4.4. Interações ligantes-receptor	33
4.5. Caracterização individual do secretoma dos clusters	34
4.6. Identificação dos reguladores transcricionais downstream	34
4.7. Análise dos dados de controle e tumorais integrados	35
4.8. Análise de genes diferencialmente expressos	35
4.9. Análise de enriquecimento funcional	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO DOS GRUPOS CELULARES	37
5.1.1 Caracterização dos dados e identificação dos grupos celulares	37
5.1.2 Anotações assinatura gênica	38
5.1.3 Interação entre os grupos celulares	39
5.2 SECRETOMA DOS GRUPOS CELULARES TUMORAIS	40
5.2.1 Interação ligante-receptor entre os grupos celulares	40
5.2.2 Caracterização do secretoma	44
5.2.3 Predição dos fatores de transcrição	47
5.3 ANÁLISE DOS DADOS TUMORAIS E CONTROLE INTEGRADOS	50
5.3.1 Integração dos dados	50
5.3.2 Interação entre os grupos celulares	51
5.3.3 Interação ligante-receptor entre os grupos celulares	52
5.3.4 Expressão gênica do secretoma	55
5.3.5 Genes diferencialmente expressos	56
5.3.6 Enriquecimento funcional	57
6. CONCLUSÃO.....	63
7. PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma doença caracterizada pela produção acelerada e desenfreada de células anormais. A doença se origina como um processo multi-etapas e progride através de alterações genéticas/epigenéticas e das interações entre as células pré-malignas, malignas e não malignas, permitindo a proliferação descontrolada e a perda gradual de diferenciação (COLELLA *et al.*, 2008; SACHS; CLEVERS, 2014; ROZENBLATT-ROSEN *et al.*, 2020; WHO, 2020).

As células cancerosas são auto-estimulatórias, resistentes à sinais inibitórios que podem impedir seu crescimento, assim como são resistentes à apoptose. As células tumorais possuem vias metabólicas anormais e são capazes de evadir o sistema imunológico (WANG *et al.*, 2014). Sendo um componente importante do microambiente tumoral (TME), elas são as responsáveis por controlar, através de redes de sinalização complexas, os componentes celulares e não celulares que constituem o tumor (BAGHBAN *et al.*, 2020). Segundo Puram *et al.* (2017), a heterogeneidade intratumoral e a interação entre células malignas e não malignas são imprescindíveis para diversos mecanismos da biologia tumoral.

Os tumores são ecossistemas complexos compostos por células tumorais proliferativas, células estromais, células endoteliais, componentes da matriz extracelular (ECM) e células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos (WHITESIDE, 2008; BALKWILL *et al.*, 2012; PISTOIA *et al.*, 2013; LAMBRECHTS *et al.*, 2018; BAGHBAN *et al.*, 2020).

Estudos recentes sobre a biologia do câncer vêm mostrando que, para se entender os diferentes mecanismos de crescimento tumoral e metástase, é necessária uma melhor compreensão de como a interação com o TME afeta a progressão do câncer (BAGHBAN *et al.*, 2020). E com tecnologias novas, como a análise de células únicas (*single-cell analysis*) e aplicação da biologia de sistemas, tem-se possibilitado meios de se caracterizar uma gama de tipos celulares e a definição de programas de expressão de genes associados a doenças (MA *et al.*, 2020).

As abordagens da biologia dos sistemas aplicadas ao câncer são baseadas em métodos computacionais e matemáticos para decifrar a complexidade e heterogeneidade do câncer (WERNER *et al.*, 2014). Tais abordagens podem melhorar nosso entendimento atual sobre a heterogeneidade tumoral e suas relações com o TME, resposta imune natural ou induzida (imunoterapia), neovascularização e desenvolvimento de metástases.

Compreender a heterogeneidade das células dentro do microambiente tumoral de diferentes cânceres é imprescindível, uma vez que os sinais produzidos pelas células possuem influência na progressão do câncer e sua compressão pode auxiliar no desenvolvimento de terapias aprimoradas (DA ROCHA *et al.*, 2018; LAUGHNEY *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2014; BROWAEYS *et al.*, 2019;).

1.1. Aspectos gerais do neuroblastoma

O neuroblastoma (NB) é um tumor sólido extracraniano; considerado um câncer pediátrico, é a neoplasia maligna mais comum diagnosticada no primeiro ano de vida, representando 7% dos casos pediátricos e ~15% de todas as mortes por câncer pediátrico. Sua incidência é de 25 a 50 casos para cada 100 milhões de pessoas. No Brasil, tem ocorrência de 1 caso para cada 7 mil nascidos. (NIH, 2017; BARR; APPLEBAUM, 2018; QIU; MATTHAY, 2022; KAMENEVA *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2021; BORBA *et al.*, 2022).

Segundo Matthay *et al.* (2016), o fenótipo da doença está altamente associado a raça e idade e uma certa propensão ao sexo, pois foi observado que indivíduos com ascendência africana são mais propensos a ter um fenótipo mais maligno do que indivíduos de ascendência europeia e, que o NB é mais comum em meninos do que em meninas, mas a base genética e epigenética para essa preponderância permanece obscura.

O neuroblastoma se origina de células-tronco imaturas provenientes da crista neural (NCCs), que dão origem, durante a embriogênese, a uma gama diversificada de células, como cartilagem, osso, neurônios periféricos, melanócitos e células de Schwann. O neuroblastoma, normalmente, se localiza nas glândulas adrenais e nos gânglios do sistema nervoso simpático, podendo também ocorrer no pescoço, tórax e pelve, estando inserido no grupo conhecido como tumores neuroblásticos periféricos, composto pelo ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma e ganglioneuroblastoma nodular misturados (COLON; CHUNG, 2011; CHEUNG; DYER, 2013; BOEVA *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2021; ASHOK *et al.*, 2021; MARTINEZ-MONLEON *et al.*, 2022; ROHRER, 2021; VERHOEVEN *et al.*, 2022).

Os pacientes com NB podem ser estratificados em 3 grupos de risco: baixo, moderado e alto. Pacientes nos grupos de risco baixo e moderado possuem uma taxa de sobrevivência de mais de 90%, enquanto os de alto risco tem uma taxa entre 40% e 50% (CHEN *et al.*, 2020; VERHOEVEN *et al.*, 2022). Seus sintomas são inespecíficos, mas geralmente se tem um quadro de perda de peso, letargia, hiporexia, febre, alta concentração de catecolaminas na urina e diarreia intratável, em casos de secreção tumoral de vaso peptídeo.

Deve-se ressaltar que desde sua descoberta e definição, vários grupos, como o COG e o SIOPEN criaram/utilizam um tipo de estadiamento e, até hoje não existem um modelo padrão internacional e sim uma junção de sistemas de estadiamento, o que, conseqüentemente, dificulta estudos padronizados. Os três sistemas mais importantes criados são o INSS (International Neuroblastoma Staging System), INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification) e o INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) e INRG (International Neuroblastoma Risk Group) (Tabela 1).

Tabela 1 - Aplicação e diferenças dos sistemas de estratificação do neuroblastoma

	Sistemas de estratificação			
	INSS	INPC	INRGSS	INRG
Implementação	1986	1999	2004	2009
Aplicação	Pós-cirúrgico	Indicador de prognóstico independente	Pré-tratamento	Pré-tratamento
Base	Cirúrgica	Características morfológicas	Exames de imagem	Exames de imagem e marcadores moleculares
Quantidade de estágios	5	2*	4	4
Revisado	1993	2003	-	-

*existem subgrupos dentro das classificações

Fonte: Dimas, M.M. (2023)

Atualmente, o mais utilizado para estratificação de pacientes pré-tratamento, é o sistema INRG. Fatores como idade, amplificação do oncogene MYCN, manifestações histopatológicas, deleção de cromossomos e entre outros, são os parâmetros utilizados para designar o grupo de risco e conseqüentemente o tratamento (CHEN *et al.*, 2020; LALCHUNGUNGA *et al.*, 2022). Além disso, pode-se estratificar o neuroblastoma baseando-se em grau de diferenciação neuroblástica (indiferenciado, pouco diferenciado e em diferenciação) e no índice de mitose-cariorexe (MKI) (baixo, intermediário ou alto) (COLON; CHUNG, 2011).

O tratamento aplicado é multimodal, aplicando-se desde abordagens mais intensas como quimioterapia, radioterapia pré e pós cirúrgica, cirurgia, transplante de medula óssea à utilização de imunoterapias como prescrição de ácido retinóides (isotretinoin) e utilização de anticorpos anti-GD2 (dinutuximab) (BAYEVA *et al.*, 2021; BORBA *et al.*, 2022; QIU; MATTHAY, 2022).

Deve-se salientar que mesmo com uma abordagem multimodal e os sistemas de estratificação, devido a heterogeneidade clínica e biológica do NB, questões como infraestrutura, capacitação médica e a falta de terapias personalizadas, são fatores que corroboram para o NB ser responsável por 15% das mortes pediátricas.

Ademais, o NB possui 2 tipos de associação, sendo elas: neuroblastoma esporádico e familiar/hereditário. Sua heterogeneidade biológica e clínica é uma das característica-chave, que pode ir desde a progressão independente de terapia agressiva à regressão espontânea; de tumor localizado à grande disseminação. Com metástase ocorrendo em 50% dos casos, normalmente nos linfonodos (31%), medula óssea (70%), ossos (56%), fígado (30%), pulmão (3%) e no sistema nervoso central (0,6%) (TANG *et al.*, 2021; BRADY *et al.*, 2020; SOKOL; DESAI, 2019; QIU; MATTHAY, 2022; BAYEVA *et al.*, 2021; MARTINEZ-MONLEON *et al.*, 2022).

Essa porcentagem de metástase, se dá, tanto por fatores genéticos intrínsecos do NB, como também pelo fato de que o diagnóstico é muita das vezes tardio, ao ponto de quando confirmado, o tumor já ter se disseminado. Por outro lado, Matthay e colaboradores (2016) observaram que, em uma triagem com lactentes de 3 meses, quando medido as catecolaminas urinárias, percebeu-se que o número de indivíduos com neuroblastoma no momento da triagem é muito maior do que aqueles que irão manifestar o tumor no futuro, ou seja, metade de todos os neuroblastomas que surgem no primeiro ano de vida nunca são detectados devido à regressão espontânea completa.

Não é de hoje que a tumorigênese é relacionada à embriogênese, já que desde 1908 se sugeria que os tumores são uma continuação anormal da formação de células embrionárias. Com o tempo várias patologias congênitas e relacionadas ao câncer tiveram sua origem associada a regiões simpatoadrenal e aorta-gônada-mesonefro (AGM) de embriões em desenvolvimento, onde vários processos celulares e teciduais se desenvolvem a partir da crista neural (SHARMA *et al.*, 2022; KAMENEVA *et al.*, 2021).

Os tumores pediátricos, como o neuroblastoma, tem uma relação clara com a embriogênese. Evidências de estudos clínicos e experimentos apontam que o NB ocorre devido a uma desregulação no processo celular; ocasionada por mutação e/ou amplificação de genes (ex: MYCN), desregulação das vias de transdução de sinal e alterações epigenéticas durante o desenvolvimento da crista neural, podendo gerar lesões pré-neoplásicas e evoluir para um neuroblastoma (SHARMA *et al.*, 2022; JOHNSEN *et al.*, 2019; AMAR *et al.*, 2022).

Utilizando perfis epigenéticos e transcriptômica conseguiu-se identificar dois subtipos de neuroblastoma, os provenientes de células mesenquimais indiferenciadas (MES) e os noradrenérgico. Estudos de bulk-DNA e scRNA-seq apontam que a maioria dos neuroblastomas, tem um caráter noradrenérgico (ROHRER, 2021; BOEVA *et al.*, 2017; JANSKY *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2022; AMAR *et al.*, 2022).

Esse fenótipo noradrenérgico é um resultado de um loop autorregulador estabelecido pelos fatores de transcrição (TFs), ISL1, HAND2, GATA3, PHOX2B, TBX2 e ASCL1, que juntos com outros elementos compõe um circuito regulador central (CRC) no NB, que reforça esse fenótipo maligno (LIU *et al.*, 2022).

O PHOX2B (paired-like homeobox 2B gene), localizado no cromossomo 4p12, é um TF necessário para a diferenciação da crista neural em neurônios noradrenérgico (RITENOUR *et al.*, 2018). Suas mutações são encontradas em 80% dos NB hereditários/familiar (ZHANG *et al.*, 2019).

Se desconhece as células de origem específicas do NB, contudo, estudos recentes, como o de Kameneva *et al.* (2021) apontam que neuroblastos simpáticos intra-adrenais surgem de SCPs (precursores de células Schwann), e que esses simpatoblastos imaturos podem transicionar para células cromafins locais. E essa conexão entre as linhagens tem implicações importantes para a origem do neuroblastoma.

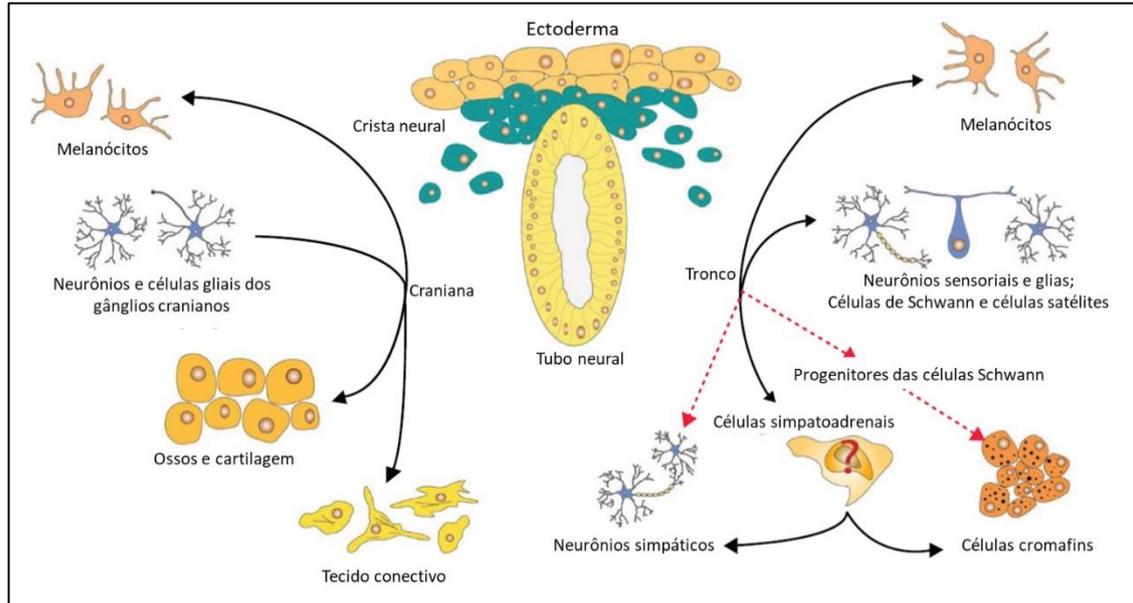
Ademais, Kildisiute e colaboradores (2021), apontam os simpatoblastos como um possíveis células de origem do NB, pois observaram que o estado simpatoblástico permaneceu em todo espectro da neoplasia.

A crista neural é uma população celular embriônica transiente, que surge durante a gastrulação e neurulação e que se diferencia em vários tecidos, como o esqueleto craniofacial, sistema nervoso simpático e periférico, células cromafins adrenais e melanócitos (TOMOLONIS *et al.*, 2017). Elas dão origem às células estromais de Schwann e neuroblásticas presentes, em vários graus de diferenciação, no tecido do NB (Figura 01) (BAYEVA *et al.*, 2021).

As células simpatoadrenais podem se diferenciar em células neuronais e cromafins. Essa diferenciação é dependente das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que induzem um conjunto de fatores de transcrição (TFs), como o SOX10 e MASH1, que irão agir na regulação da diferenciação celular. (KHOLODENKO *et al.*, 2018; MARSHALL *et al.*, 2014). Outros

fatores que são conhecidos por agirem no desenvolvimento, diferenciação e maturação, é a expressão de MYCN, ALK e NGF (MARSHALL *et al.*, 2014).

Figura 1 - Tipos celulares originados pela crista neural



Legenda: A crista neural surge do ectoderma embrionário e se desenvolve a partir do tubo neural após seu fechamento. As NCCs migram ao longo de caminhos estereotipados e alcançam numerosas partes, muitas vezes remotas, do embrião, onde eventualmente se diferenciam contribuindo para o surgimento diversificado de tipos celulares, incluindo melanócitos, células e ossos da cartilagem craniofacial, células musculares lisas, neurônios periféricos e células gliais. Fonte: Kholodenko *et al.*, 2018 (Adaptado).

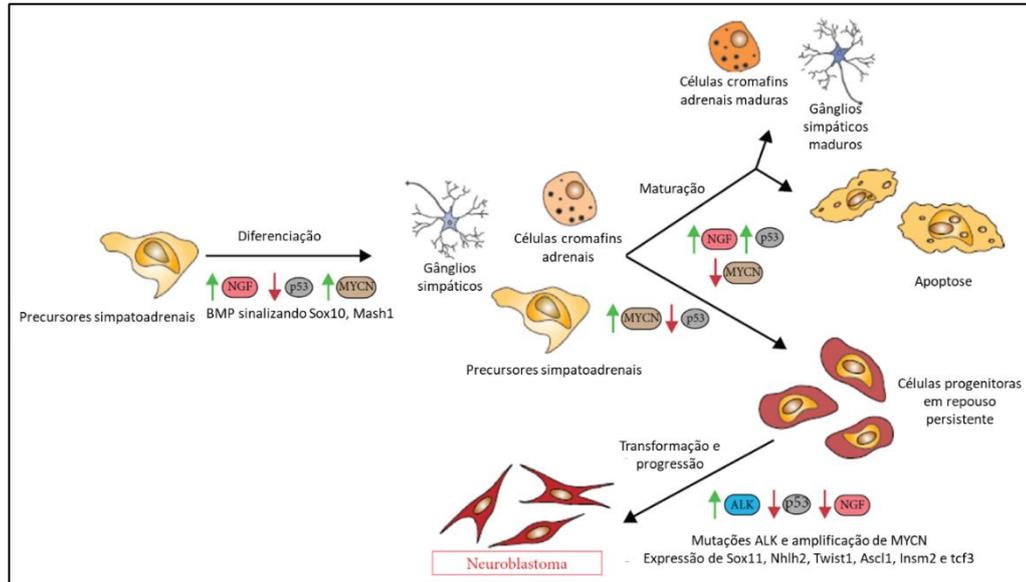
O oncogene MYCN é um conhecido regulador de reprogramação metabólica e mediador de crescimento celular, sua principal função é preservar a regeneração e proliferação das NCCs. A expressão ou supressão de NGF determina se a célula ganglionar simpática normal se torna uma célula ganglionar terminal ou sofre morte celular apoptótica. Já o ALK age contra depleção de nutrientes durante o desenvolvimento no útero (MORENO-SMITH *et al.*, 2021; MARSHALL *et al.*, 2014).

Em conjunto, esses programas epigenéticos e transcricionais irão influenciar na diferenciação celular, culminando na formação do neuroblastoma (Figura 02). Devido a essa multipotencialidade das NCCs e a miríade de fatores que influenciam nesse processo de diferenciação celular, os tumores provenientes de sua linhagem constituem um grupo diverso e expansivo, ou seja, podem se alocar e metastizar sítios distintos.

Um fato pertinente de se levantar, em relação a origem do NB, é que os tumores geralmente se localizam no córtex adrenal, nos gânglios paraespinhais ou na cavidade abdominal adjacente à aorta na região do rim, que são locais de localização das células progenitoras simpatoadrenais da crista neural. Contudo, mesmo tendo uma noção estabelecida

acerca do seu local de origem e alguns mecanismos moleculares, devido à heterogeneidade clínica e intratumoral do NB, e as lacunas referente a mecanismos específicos de progressão e regressão da neoplasia, o NB ainda é considerado um enigma oncogênico.

Figura 2 - Processo de diferenciação celular e seus fatores até a formação do neuroblastoma



Legenda: A linhagem simpatoadrenal é derivada das NCCs que se agregam na aorta dorsal após a migração pela via ventral. As BMPs serão as responsáveis na diferenciação celular em célula cromafin catecolaminérgica/adrenal ou em um neurônio simpático. SOX1 e Mash1 são fatores de transcrição, induzidos pelas BMPs, que regula a diferenciação de células migratórias da crista neural em células simpatoadrenais. A expressão de MYCN em neurônios simpáticos maduros induz a progressão do ciclo celular e bloqueia a apoptose. A presença das NGFs, quando ligadas ao receptor TrkA, auxilia na sobrevivência das células diferenciadas. Durante o processo de organogênese, os níveis de p53 diminuem, sendo dificilmente detectado em tecidos diferenciados terminalmente, mas sua expressão está diretamente relacionada à transformação maligna. A sinalização do ALK regula o equilíbrio e diferenciação celular. Fatores de transcrição das famílias Snail, Twist, SoxE e FoxD tem sua expressão aumentada em vários tipos de cânceres e são críticos no desenvolvimento da crista neural. Fonte: Kholodenko *et al.*, 2018 (Adaptado).

1.2. Aspectos moleculares do neuroblastoma

O neuroblastoma pode ser dividido em 2 tipos de associação: esporádico, familiar/hereditário. O NB esporádico, em que não se tem histórico familiar associado, é o mais comum. Já o neuroblastoma familiar/hereditário é considerado raro, representando menos de 2% de todos os casos de neuroblastoma (ASHOK *et al.*, 2021; HANEMAAIJER *et al.*, 2021). Em torno de 2% dos casos são herdados de forma autossômica e são considerados familiares, enquanto o resto dos casos surgem de forma esporádica (RITENOUR *et al.*, 2018).

Os cânceres pediátricos, normalmente, apresentam menos mutações, quando comparados às neoplasias adultas. O NB, em seu caráter de baixo risco, apresenta ganhos cromossômicos completos e a composição cromossômica dos tumores usualmente são

hiperploides. Já em casos de alto risco, o NB apresenta composição cromossômica segmentada (JOHNSEN *et al.*, 2019). Geralmente, os tumores de NB são caracterizados por ganho segmentar de 17q, deleção hemizigótica de 1p e 11q e amplificação de MYCN (BELL *et al.*, 2020; JOHNSEN *et al.*, 2019).

O ganho do cromossomo 17q acontece em torno de 80% dos casos de NB, seu ganho comumente está relacionado a um bom prognóstico, contudo as translocações irregulares dele com 1p e 11q foram observadas como um fator de mau prognóstico. A deleção do 1p36 acontece em 70% dos tumores e está relacionado ao risco de reincidência (COLON; CHUNG, 2011).

A amplificação do MYCN, presente no cromossomo 2p24, acontece em até 25% dos casos gerais de NB, quase 50% nos casos de alto risco de NB e 5% no estágio 4S, além de fazer a distinção de casos com baixa sobrevivência e alta probabilidade de recidiva (COLON; CHUNG, 2011; MORENO-SMITH *et al.*, 2021; BRADY *et al.*, 2020). Suas amplificações são clonais, ou seja, presente em todos ou substancialmente em todos os clones (QIU; MATTHAY, 2022).

Os genes MYC, MYCN e MYCL, são todos pertencentes à mesma família oncogênica, e conhecidos por serem “super fatores de transcrição”, estando envolvidos em vários processos da tumorigênese. O MYC está presente, de forma desregulada, em vários tumores malignos, como gliomas, câncer de próstata, fígado e entre outros. O MYCL, também conhecido como c-MYC, teve sua presença relatada apenas em carcinoma de pulmão, até o momento (WANG *et al.*, 2022; MORENO-SMITH *et al.*, 2021).

O MYCN foi descoberto em 1983 e desde sua descoberta, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados, em camundongos e *zebrafish*, e observou-se envolvimento no ciclo celular, apoptose, diferenciação e metabolismo, além de estar relacionado aos processos de replicação, transcrição e *splicing* (SPELEMAN *et al.*, 2016). Seu efeito oncogênico foi observado em cânceres neuronais, não neuronais e neoplasias hematológicas (LIU *et al.*, 2021).

O TWIST, que é um regulador de transição EMT e desempenha um papel importante na mobilidade celular e metástase, é expresso junto ao MYCN na crista neural e também se apresenta nas formas agressivas de neuroblastoma. Em um estado de superexpressão, o TWIST provê uma vantagem ao tumor quando presente num TME hipóxico ou quando introduzido drogas pró-apoptóticas (ARA; DECLERK, 2006).

Outras aberrações genéticas relacionadas ao NB e que possuem uma relação direta com MYCN, são os rearranjos TERT (transcriptase reversa da telomerase) e mutações ATRX, cujo surgimento são mutuamente exclusivas, provavelmente devido ao fato que ambos têm funções sobrepostas dentro mecanismos de manutenção dos telômeros (BELL *et al.*, 2020; BRADY *et al.*, 2020).

Além do MYCN, outros genes foram relacionados ao NB ao longo do tempo, sendo eles TERT, PHOX2N, HAND2, GATA3, ALK, LIN28B, LMO1, BARD1, INSM1, ISL1, L1CAM e entre outros (BOEVA *et al.*, 2017; SPELEMAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019; KHOLODENKO *et al.*, 2018).

Diferentes identidades tumorais estão relacionadas à diferentes networks/sistemas de fatores de transcrição, e os genes TERT, PHOX2N, HAND2, GATA3 e ISL1 constituem um CRC que é essencial para a expressão de MYCN e, conseqüentemente, as células de NB (BOEVA *et al.*, 2017; SPELEMAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2021).

O ALK (quinase do linfoma anaplásico), condutor predominante do NB familiar, é um receptor de tirosina quinase, cuja expressão é importante na diferenciação neural, proliferação e sobrevivência celular, e, quando ativado, promove a expressão de MYCN através de ERK5 e inibe a morte das células progenitoras simpatoadrenais, desta forma, colaborando com a patogênese do NB (SPELEMAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019; RITENOUR *et al.*, 2018; COLON; CHUNG, 2011). Vale ressaltar que as mutações no ALK têm penetrância fenotípica incompleta, ou seja, nem todo mundo que é afetado, vai necessariamente desenvolver neuroblastoma (BARR; APPLEBAUM, 2018).

Segundo Qiu e Matthay (2022), *RNA-seq* de linhagens celulares de neuroblastoma e tumores primário revelaram uma heterogeneidade intratumoral, relacionado aos programas de expressão gênica, status de diferenciação, epigenéticos e de desenvolvimento recapitulados pelas células tumorais.

Tendo em vista o exposto, podemos estabelecer o panorama de que o neuroblastoma, possui mecanismos de evasão intrínsecos e que ele é capaz de construir um microambiente imunossupressor sofisticado que auxilia no seu estabelecimento e progressão (CHEUNG; DYER, 2013). Desta forma, ao se descobrir os fatores-chave secretados pelo neuroblastoma que possibilitam sua instauração pode-se aprofundar em estudos de interação celular e modulação da patologia.

1.3. Microambiente e secretoma tumoral

O termo secretoma foi utilizado pela primeira vez por Tjalsma *et al.*, em 2000, ao estudar o transporte de proteínas dependente de peptídeo de sinal em *Bacillus subtilis*. Neste estudo, o termo foi utilizado para denotar todos os fatores secretados por uma célula, um tecido ou organismo através dos diferentes mecanismos de secreção (KARAGIANNIS *et al.*, 2010; SCHAAIJ-VISSER *et al.*, 2013; CAPECE *et al.*, 2018; DA CUNHA *et al.*, 2019). Em 2006, se utilizou pela primeira vez o termo “secretoma do câncer”, por Gronborg e colaboradores.

O termo secretoma do câncer ou secretoma tumoral é utilizado para denotar toda a coleção de proteínas secretadas, incluindo os componentes da matriz extracelular (MEC), pelas células cancerosas. Correspondendo a uma importante classe de proteínas que podem ser secretadas por vias clássicas ou não clássicas e atuar tanto local quanto sistemicamente. Entretanto, o “câncer” não é um tipo de entidade autônoma, e sim um complexo ecossistema, deste modo, os estudos sobre o secretoma do câncer deve também levar em consideração o microambiente tumoral (KARAGIANNIS *et al.*, 2010; SCHAAIJ-VISSER *et al.*, 2013; CAPECE *et al.*, 2018).

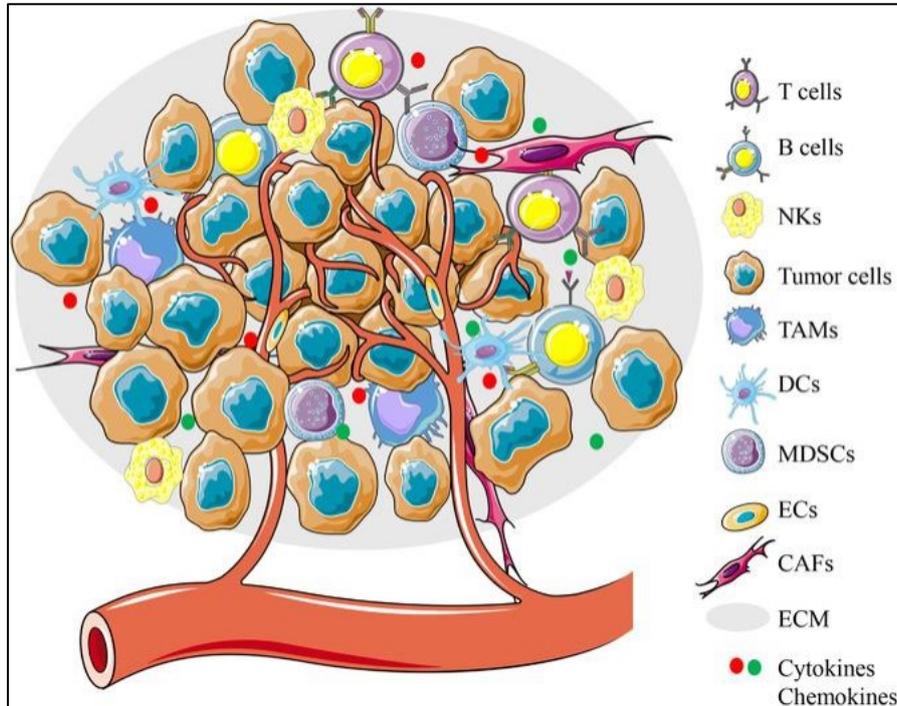
O TME começou a ter uma evidência maior, quando Stephen Paget apresentou a teoria *seed and soil*, em 1889, para explicar metastização. A teoria propõe que as células tumorais (semente) não se estabelecem e não se expandem para locais em que o ambiente (solo) não seja propício para o crescimento delas. E desde então, o TME se estabeleceu como atuante fundamental na colonização, crescimento e progressão dos tumores, e o foco de muitos estudos tem se voltado aos componentes e acontecimentos no “solo” que propiciam o câncer. Com o advento de análises de célula única, análises com uma visão granular do TME vêm sendo realizadas com mais precisão (SHARMA *et al.*, 2022).

O TME é reconhecido como um ambiente complexo formado por células tumorais proliferativas, vasos sanguíneos, células imunes, fibroblastos, moléculas sinalizadoras e matriz extracelular, que interagem com as células cancerosas através de sinais bioquímicos e físicos (Figura 3) (WHITESIDE, 2008; LAMBRECHTS *et al.*, 2018; BALKWILL *et al.*, 2012; PISTOIA *et al.*, 2013; BAGHBAN *et al.*, 2020; DA CUNHA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs), por exemplo, são os componentes celulares em maior abundância no TME (CHEN *et al.*, 2008; PALTRIDGE *et al.*, 2013). Ademais, o TME possui a matriz extracelular, que é rica em colágeno, proteoglicanos, ácido

hialurônico, lamininas e fibronectina que irão fornecer uma estrutura de suporte que facilitará a proliferação e disseminação tumoral (PALTRIDGE *et al.*, 2013; DA CUNHA *et al.*, 2019).

Figura 3 - Microambiente tumoral e seus componentes



Legenda: Componentes celulares do TME são em sua maioria células imunes hematopoiéticas, TAMs, DCs, MDSCs, células T, B e NK, e células estromas residentes, CAFs, ECs. Os componentes extracelulares são as citocinas e quimiocinas. A interação entre as células tumorais e os componentes compõe o microambiente tumoral. Fonte: Shi *et al.*, 2020.

No microambiente tumoral, as proteínas secretadas (secretoma) são as responsáveis pelo *crosstalk* celular. Essa interação celular é crítica para a progressão da neoplasia, estando envolvido em vários processos fisiológicos, como defesa imunológica, remodelação da matriz, sinalização celular, angiogênese e metástase. Logo, entender esse *crosstalk* celular poderá fomentar o conhecimento sobre os mecanismos de progressão da doença (XUE *et al.*, 2008; MAKRIDAKIS; VLAHOU, 2010; ZENG *et al.*, 2013; PALTRIDGE *et al.*, 2013; CAPECE *et al.*, 2018).

Alterações nos componentes do secretoma tumoral, de acordo com Da Cunha e colaboradores (2019), depende de mutações genéticas e mudanças não genéticas que afetam a expressão dos genes. Chow *et al.* (2014) demonstrou tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que exossomos secretados por células de câncer de mama eram internalizados por macrófagos, e esses macrófagos se tornavam capazes de induzir a suprarregulação de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF, G-CSF e CCL2, através da indução da ativação de NF- κ B, e essa inflamação crônica associada ao tumor auxilia na construção de um TME pró-tumoral

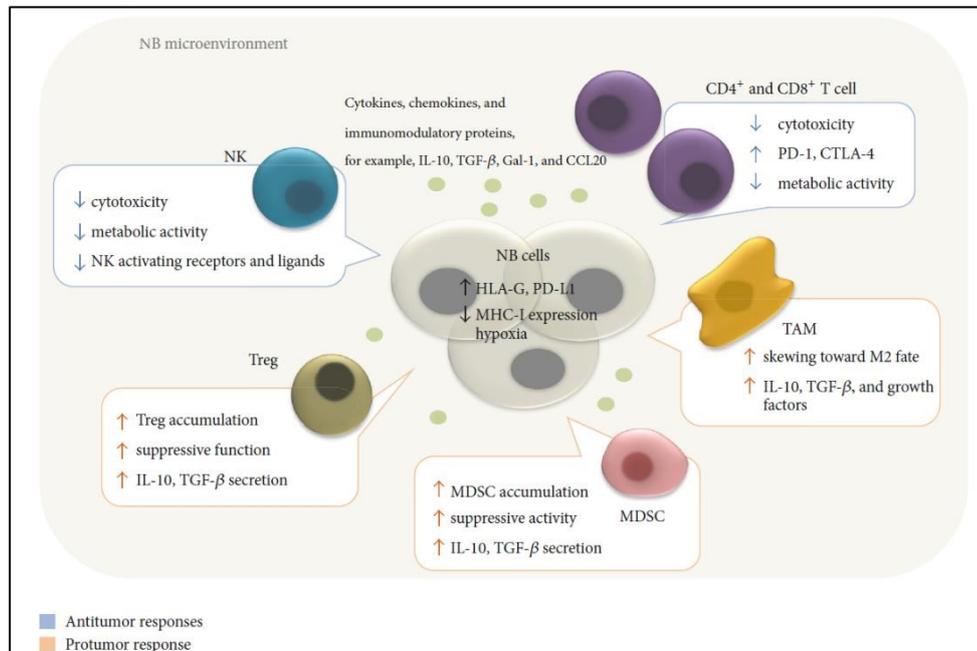
(CAPECE *et al.*, 2018). Esse experimento é um exemplo de como o secretoma tem influência na progressão da doença.

Ademais, deve-se pontuar que análises ômicas multidimensionais observaram semelhanças entre o desenvolvimento tumoral e reprogramação semelhante à fetal no TME, o que indica uma extraordinária plasticidade celular e traz uma camada adicional de heterogeneidade celular (SHARMA *et al.*, 2022).

Os tumores sólidos, como o neuroblastoma, estão instalados em microambientes com as seguintes características: (i) ausência da arquitetura tecidual normal; (ii) longa permanência de resíduos metabólicos tóxicos; (iii) hipóxia; (iv) inflamação e (v) células aberrantes associadas ao câncer (PALTRIDGE *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos e células que o neuroblastoma modula para sua sobrevivência (Figura 4), podemos citar as NKs, TAMS, MDSCs, células T CD4⁺ e TCD8⁺, apresentação de antígenos, secreção de proteínas imunossupressivas e Tregs, mas seu papel no NB ainda é controverso (VANICHAPOL *et al.*, 2018). Devido à baixa imunogenicidade e o mecanismo de apresentação de epítomos do NB serem abaixo do necessário, o neuroblastoma torna-se praticamente invisível para as células T CD8⁺ (WIENKE *et al.*, 2021).

Figura 4 - Interações entre o neuroblastoma e o sistema imune no TME.



Legenda: As células secretadas pelo neuroblastoma são as peças principais no desenvolvimento do microambiente imunossupressor. Proteínas como a IL-10, TGF-β, Gal-1 e CCL20 são algumas das secretadas que tem ação imunossupressora, além disso, elas recrutam as Tregs, TAMs e MDSCs que estão envolvidas em respostas pró-tumorais. A hipóxia é um desafio metabólico para a infiltração das células imunes, como as células T, B e NKs. Fonte: Vanichapol *et al.*, 2018

Altas concentrações de TAMs, Tregs e MDSCs contribui para a construção de um TME imunossupressivo. O fato de ser um ambiente em hipóxia, faz com que o estresse recrute essas células e, dessa forma, criando um ambiente imunossupressivo retroativo. Ademais, NKGD2 e DNAM-1 são receptores ativadores que atuam no reconhecimento e morte mediada pelas NKs, e a amplificação de MYCN atua como um regulador negativo desses receptores (BRANDETTI *et al.*, 2017).

Tumores com amplificação MYCN são capazes de evadir a resposta imune ao regular negativamente as moléculas de MHC de classe 1 e 2. Entretanto, mesmo tumores que não apresentam amplificação do MYCN conseguem escapar da morte celular, o que reforça o fato de não se saber os mecanismos de resposta imunológica específica. Como o NB possui uma baixa expressão de MHC, a apresentação de antígeno e, conseqüentemente, a eficácia da imunidade antitumoral é prejudicada. (RAFFAGHELLO *et al.*, 2005; VANICHAPOL *et al.*, 2018; WIENKE *et al.*, 2021).

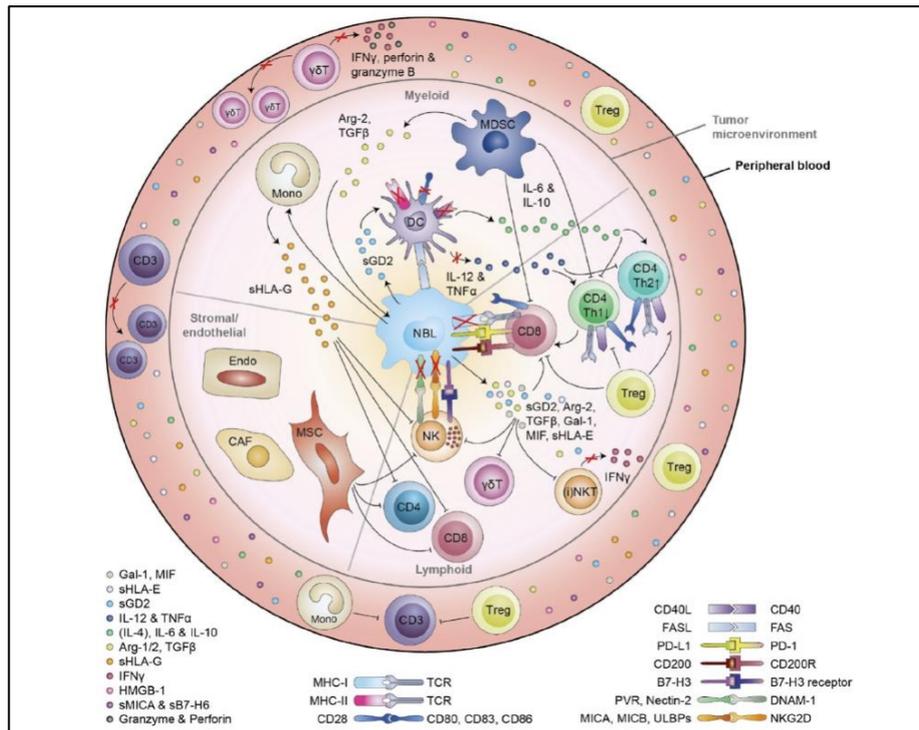
As células imaturas mieloides (MDSCs) possuem características imunossupressivas através de alguns mecanismos, como: ativação de ARG-1 que inibe ativação de células T antígeno-específicas e inespecíficas e induz iNOS; geração de ROS; depleção de cisteína; indução de Tregs via IL-10 e TGF- β (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009; VANICHAPOL *et al.*, 2018).

As TAMs também agem no processo de produção de citocinas imunossupressivas, além de estarem envolvidas com fatores de secreção como MMPs (metaloproteinase de matriz), EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) e VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), que auxiliam na angiogênese e invasão tumoral (MANGANI *et al.*, 2017).

Todas essas características auxiliam o NB a escapar dos mecanismos de proteção do sistema imune. Em conjunto, com esses mecanismos de evasão intrínsecos do tumor (Figura 5), o fato de não se ter um conhecimento completo dos preditores de resposta, e o microambiente tumoral imunossupressor, dificulta a aplicação de técnicas imunoterápicas (SENGUPTA *et al.*, 2022; QIU; MATTHAY, 2022).

De acordo com Qiu e Matthay (2022), casos de NB de alto risco, em comparativo com os de baixo e intermediário risco, frequentemente demonstram uma imunidade antitumoral adaptativa prejudicada. Já em casos de pacientes sem tratamento, foi observado que há uma circulação aumentada de interleucinas, como a IL-10, IL-4, IL-6 e depressão de IL-12 e IFN- γ , sugerindo dominância Th2 com citotoxicidade mediada por Th1 reduzida.

Figura 5 - Mecanismos de evasão ao sistema imune do neuroblastoma



Legenda: O neuroblastoma secreta moléculas como MIF, sGD2, sHLA-E, TGF β , sMICA, sB7-H6 e arginase-2, que são conhecidas por serem imunossupressivas, e consequentemente impede que o funcionamento das TILs (linfócitos infiltradores de tumores) e Natural Killers (NKs) ocorram de forma eficaz. Ademais, o gangliosídeo GD2, em sua forma solúvel, possui caráter imunossupressivo e consegue retardar o funcionamento das células dendríticas. Além disso, para reforçar a supressão das TILs, o NB utiliza de mecanismos imunorreguladores indiretos, fretando células mielóides e estromais no microambiente tumoral. De forma sumarizada, o NB aplica de vários mecanismos diretos e indiretos, e muitos ainda desconhecidos, para evadir o sistema imunológico. Fonte: Wienke *et al.*, 2021.

Portanto, tem-se uma percepção sobre o funcionamento do mecanismo de modulação do neuroblastoma. O progresso feito na melhoria das terapias de neuroblastoma serve como um exemplo de como uma compreensão básica do desenvolvimento simpatoadrenal interrompido e da tumorigênese pode ser traduzida em novas terapias dirigidas à doença (QIU; MATTHAY, 2022). Contudo, mesmo com os avanços das tecnologias moleculares e de cultivo *in vitro*, compreender a complexidade dos eventos moleculares que levam à diferente biologia do desenvolvimento do NB permanece um desafio, e, até o momento, não existe nenhuma análise comparativa de comunicação celular das células precursoras de neuroblastoma células de neuroblastoma “terminalmente diferenciadas”.

A utilização da bioinformática é uma ferramenta valiosa para analisar interação celular, identificar pontos-chave da regulação, expressão e atividade gênica. Ao se investigar as vias de sinalização envolvida entre o TME e o neuroblastoma se poderá prover pistas acerca da sua heterogeneidade e possivelmente permitir novas estratégias de identificação e tratamento (ROHRER, 2021; RAMOS, 2021).

2. PERGUNTA E HIPÓTESE

A natureza exploratória deste trabalho, buscando responder a seguinte pergunta: quais fatores produzidos pelas células do neuroblastoma influenciam o microambiente tumoral? impossibilita a elaboração de uma hipótese imediatamente testável durante a execução deste trabalho. Porém, após responder a esta pergunta, hipóteses experimentalmente testadas podem ser levantadas e investigadas em trabalhos subsequentes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar o secretoma do neuroblastoma e identificar processos células-extrínsecos relevantes à patogênese do neuroblastoma.

3.2. Objetivos específicos

- Reanalisar os dados públicos de single-cell referente a neuroblastoma;
- Identificar os grupos celulares e secretoma do neuroblastoma utilizando biologia computacional;
- Analisar as interações realizadas entre as células imunes e o secretoma identificado;
- Predizer redes de interação (genes reguladores);
- Obter os reguladores transcricionais downstream;
- Inferir funcionalidade das interações.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos datasets

Os datasets de *single-cell* de neuroblastoma foram procurados em bancos de dados e artigos relacionados, priorizando aos dados de single-cell publicamente disponíveis e em formatos de fácil inserção no RStudio e aplicação do FUSCA (versão 1.3.1; *Framework for Unified Single-Cell Analysis*). O FUSCA é um software composto de dois módulos: o CellRouter (DA ROCHA *et al.*, 2018), capaz de reconstruir trajetórias de single-cell complexas, e o CellComm (DA ROCHA *et al.*, 2022), que infere comunicação intercelular em redes utilizando dados scRNA-seq.

Os dados utilizados nesse projeto foram provenientes do artigo produzido por Kildisute *et al.*, (2021), no qual depositaram os datasets em formato RDS e H5AD no site: www.neuroblastomacellatlas.org.

Para visualização dos dados e todas as outras etapas subsequentes, utilizou-se o RStudio (versão 4.2.2; *The R foundation for Statistical Computing*, Topeka, KS, USA) sendo executado no servidor do Laboratório de Biologia de Sistemas da UFSC, rodando sob o sistema operacional Ubuntu 18.04.6 LTS.

Os datasets obtidos, em formato RDS, provenientes do Great Ormond Street Hospital, Princess Maxima Center e o dataset de glândulas adrenais, foram respectivamente nomeados como “nb_GOSH”, “nb_PMC” e “adrenal_glands”.

4.2. Visualização dos clusters celulares nos datasets

Os datasets encontrava-se como objeto Seurat, e, portanto, utilizou-se o pacote Seurat (versão 4.3.0) para visualizar os dados e se iniciar as análises. Como os datasets obtidos já possuíam uma curadoria, as etapas de filtragem, normalização, identificação de variabilidade de genes, escalonamento e redução de dimensões não foram necessárias, desta forma reproduzindo-se diretamente os parâmetros dos autores do artigo.

Utilizando o comando DimPlot do Seurat, obteve-se os gráficos de dimensão reduzida (UMAP) de todos os datasets. E com o comando de criação de objetos do CellRouter, *CreateCellRouter*, se converteu o objeto Seurat em um objeto aplicável ao FUSCA (Versão 1.3.1) para que se pudesse realizar as etapas subsequentes.

Para visualizar a representação dos clusters dentro do objeto `cellrouter`, utilizou-se a função `PlotReducedDimension`, definindo alguns parâmetros como: o objeto de análise, o tipo de método de redução aplicado (UMAP), o tipo de anotação (`annotation = "celltype"`), as cores e o tamanho a serem utilizados.

4.3. Anotação e identificação de genes assinatura dos grupos celulares

Por motivos de validação da população tumoral, utilizou-se o comando `plotDRExpression` do FUSCA e criou-se uma lista de genes com genes marcadores fornecidos no material complementar do artigo e outros genes marcadores conhecidos na literatura. Sendo cada lista de genes utilizada para a identificação de cada cluster. Desta forma, para neuroblastoma temos os marcadores *PHOX2B*, *PHOX2A*, *MYCN*; Precusores de célula Schwann: *CDH19*, *SOX10*, *PLP1* e *ERBB3*; Mesênquima: *TCF21*, *PDGFRB*, *NT5E*, *THY1*, Endotélio: *CDH5*, *VWF*, *CLDN5*, *KDR* e para Leucócitos: *PTPRC*, *GPLY*, *NKG7*, *LYZ*.

Ademais, para identificar os genes marcadores de todos os grupos celulares, utilizou-se a função `findSignatures` do CellRouter, onde se estabeleceu os seguintes parâmetros: o tipo de teste (`test.use = wilcox`), o mínimo percentual para ser detectado (`min.pct = 0.25`), o limite de mudança de dobra (`fc.threshold = 0.25`) e utilizar apenas os genes regulados positivamente (`pos.only = TRUE`), para criar um data frame contendo as informações que a função `plotSignatureHeatmap` utilizou para gerar um heatmap contendo os top 5 genes marcadores de cada cluster.

4.4. Interações ligantes-receptor

O FUSCA é capaz de usar qualquer lista de ligantes e receptores como entrada, para este estudo utilizou-se os ligantes e receptores disponibilizados pelo NicheNet (BROWAEYS *et al.*, 2020) que é um dos mais completos atualmente. Durante o processo de análise de comunicação intercelular, alguns objetos com informações são criados.

Tendo as interações e aplicando $p < 0.01$, criou-se uma matriz de interação (`tmp`), a qual se aplicou o comando `plotInteractionMatrix2` e obteve-se um heatmap apresentando a força de interação entre os clusters.

Esse heatmap foi então usado como base para se criar, de forma manual, uma lista de interação, que ao ser aplicada o comando `plotPairDotplot` do pacote `ggplot2` (versão 3.4.1),

gerou um gráfico de ligantes e receptores priorizados dentre os clusters, ou seja, teve-se um *overview* de como a comunicação intercelular está ocorrendo dentro daquele dataset.

4.5. Caracterização individual do secretoma dos clusters

Uma lista com todos os ligantes presentes no clusters de neuroblastoma, células mesenquimais, simpatoblastos, endotélio, entre outros, foi criada através da construção de um dataframe isolando as informações de tipo celular e ligantes presentes dentro do *interaction.p*. A função *table* do R, foi usada para quantificar a frequência da presença dos genes ligantes. Utilizando o pacote *writexl* (Versão 1.4.2) essas informações foram escritas em um documento excel, para facilitar à análise e seleção manual dos ligantes de interesse.

Através do documento, verificou-se quais ligantes estavam presentes em cada cluster de cada dataset e suas frequências, por conseguinte, observou-se quais genes eram comuns para todos os grupos celulares tumorais do dataset nb_GOSH e nb_PMC e utilizando a função *dotplot*, do FUSCA, pôde-se visualizar a expressão desses genes em todos os grupos.

4.6. Identificação dos reguladores transcricionais downstream

Para identificar os fatores de transcrição downstream dos pares ligantes-receptor identificados na etapa de análise anterior, aplicou-se a função *buildGRN*, em conjunto com os dados de interação proteína-proteína do banco de dados iRefIndex (<https://irefindex.vib.be/wiki/index.php/iRefIndex>) e, posteriormente, a função *CreatePPI*, pôde-se criar uma rede interação ponderada (métrica de correlação de Pearson) com base nas anotações gênicas de cada célula.

Desta forma, aplicando a função *FindPaths.SimpleRJava* definiu-se as definiu as vias traçadas de uma proteína receptora até o principal regulador de transcrição determinante para a identidade celular. O algoritmo do CellComm prevê as vias de sinalização e redes de transcrição sem conhecimento prévio da estrutura da via, e tem como base um cálculo da pontuação de atividade para cada caminho possível favorecendo aqueles cujos regulons – o conjunto de genes preditos como controlados por um determinado fator de transcrição - são enriquecidos para assinaturas celulares específicas.

A função *Summarize.Flow* processa os dados para que se possa, com as funções *activeSignaling* e *rankpaths*, visualizar graficamente. Ademais, para visualização das vias completas, com seus intermediários, exportou-se um excel contendo as informações sobre os caminhos ativos de cada cluster apresentando interações em potencial.

4.7. Análise dos dados de controle e tumorais integrados

Para que se tivesse um comparativo entre um microambiente sadio e doente, realizou-se a integração dos datasets `adrenal_glands` e `nb_GOSH`, ambos do mesmo tipo de sequenciamento, utilizando como programas principais o Harmony (versão 0.1.1) e o Seurat (Versão 4.3.0). Ambos os datasets possuíam os grupos celulares, endotélio, mesenquimal e leucócitos em comum.

Utilizou-se então a função *merge* e em seguida aplicou-se funções de normalização (*NormalizeData*), escalonamento (*ScaleData*), procura de caracteres discrepantes (*FindVariableFeatures*) e cálculo da correlação entre as células usando a análise de componentes principais de análises (*RunPCA*) e aproximação e projeção de variedade uniforme (*RunUMAP*). Com a função *SetIdent* definiu-se que o parâmetro de configuração de identidade de classe, que foi a própria anotação feita pelos autores do dataset.

Uma vez integrado realizou-se as etapas citadas em 4.2, 4.3, 4.4, e 4.5, ademais, o dataset integrado foi utilizado para a realização de análise de enriquecimento funcional e genes diferencialmente expressos.

4.8. Análise de genes diferencialmente expressos

A função *compareTwoGroups* do FUSCA, calculou a expressão média de cada gene em duas populações e as comparou usando mudanças na magnitude de expressão (*fold change*), valor-p; do teste de Wilcox, e o valor-p ajustado usando o método de Bonferroni.

O *fold change* (fc), foi utilizado para seleção dos genes a serem analisados com mais profundidade. Quando o fc se apresentava positivo, então o gene estava mais expresso no grupo 1 (clusters tumorais), e quando negativo, estava mais expresso no grupo 2 (simpatoblastos, mesenquimais e SCPs, de forma individual).

4.9. Análise de enriquecimento funcional

Os genes selecionados na seção anterior foram então convertidos para a identificação proveniente do banco de dados do Ensembl. E a análise de enriquecimento funcional, aplicando a ontologia de gene (GO), fez uso da função *enrichGO* do clusterProfiler (versão 4.6.2; WU *et al.*, 2021) e a anotação do `org.Hs.eg.db` (Carlson, M. 2022; *org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human*. versão 3.16.0).

Ademais, utilizando a função *enrichDGN* do DOSE (versão 3.24.2; YU *et al.*, 2015) realizou-se uma análise de enriquecimento funcional voltado para ontologia da doença, desta forma, visualizando quais doenças estão relacionadas aos genes selecionados. Para visualização e plotagem dos gráficos de barra, rede e heatmap, fez-se uso do pacote *enrichplot* (versão 1.18.4).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO DOS GRUPOS CELULARES

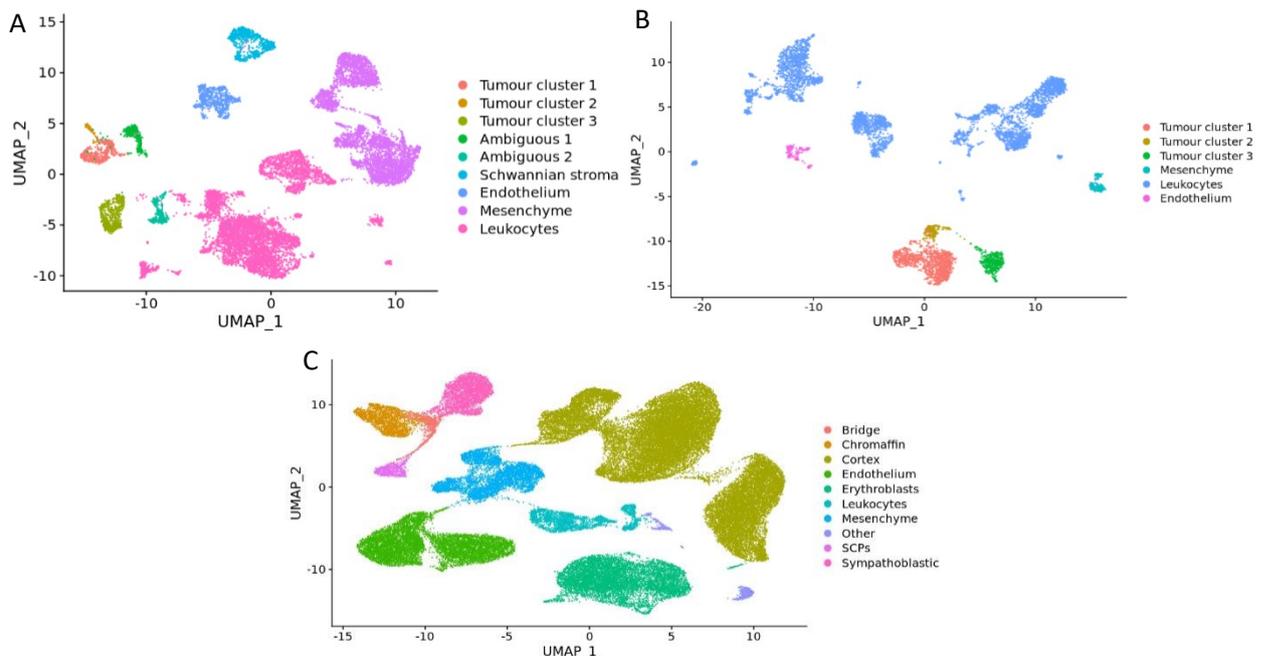
5.1.1 Caracterização dos dados e identificação dos grupos celulares

O sequenciamento do nb_PMC, contendo 16 amostras dos pacientes, resultou em um dataset comportando 13.281 células e 9 grupos, representados na Figura 6.A, sendo eles: Três tumorais; Dois ambíguos, ou seja, apresentaram marcadores tumorais, mas não em sua totalidade; Estroma Schwanniano; Endotélio; Mesênquima e Leucócitos.

O nb_GOSH, com 5 amostras, consiste em um dataset com 6.442 células e 6 clusters (Figura 6.B), sendo eles: três tumorais; Endotélio; Mesênquima e Leucócitos. Os dados de controle, adrenal_glands, apresentou um total de 57,972 células e 10 clusters (Figura 6.C), sendo eles: células ponte (bridge); Cromafins, Córtex; Endotélio; Eritoblastos; Leucócitos; Mesênquima; SCPs (células precursoras de Schwann); Simpato blastos e Outros.

O sequenciamento utilizado para a geração do dataset nb_PMC foi o CEL-Seq2, que é um melhoramento do CEL-Seq, um sequenciamento de expressão celular por amplificação linear, com sensibilidade 3x maior. Enquanto os dataset nb_GOSH e adrenal_glands foram sequenciados utilizando a tecnologia 10x Genomics, que analisa transcriptomas de células únicas através do uso de particionamento microfluídico.

Figura 6 - Visualização dos dados com dimensão reduzida (UMAP).

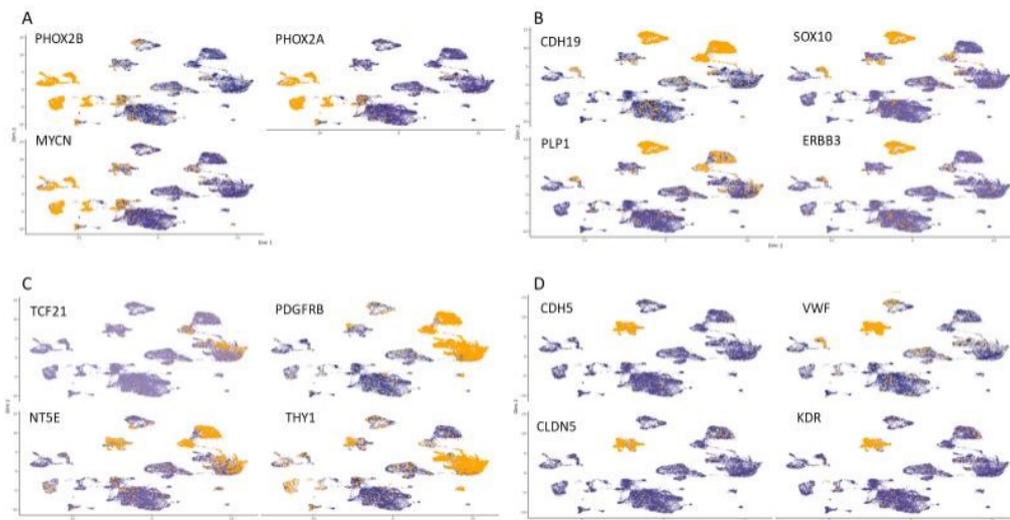


Legenda: A) Distribuição dos grupos celulares presentes no dataset nb_PMC; B) Distribuição dos grupos celulares presentes no dataset nb_GOSH; C) Distribuição dos grupos presentes no dataset adrenal_glands.

5.1.2 Anotações e assinatura gênica

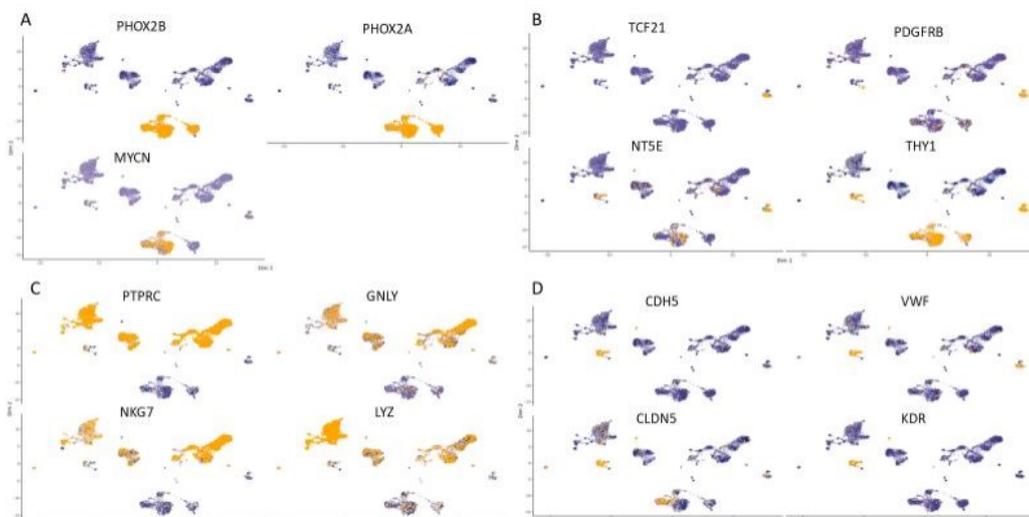
Utilizando o cellrouter e uma lista de genes marcadores, fornecidas pela literatura e os autores do dataset, criou-se um gráfico de dimensão reduzida com os genes expressos nos datasets tumorais, nb_PMC (Figura 7) e nb_GOSH (Figura 8), desta forma confirmando a identidade dos clusters de interesse, sendo eles, os tumorais. Não obstante, utilizando o comando de procura de assinaturas do CellRouter, visualizou-se graficamente através de um heatmap, os 5 genes marcadores mais expressos de cada cluster dos dois datasets (Figura 9).

Figura 7 – Gráfico de dimensão reduzida com os genes expressos nos grupos celulares do dataset nb_PMC.



Legenda: A) Marcação do grupo celular do neuroblastoma com os genes PHOX2B, PHOX2A e MYCN; B) Marcação das SCPs com os genes CDH19, SOX10, PLP1 e ERBB3; C) Marcação do grupo Mesenquimal com os genes TCF21, PDGFRB, NT5E, THY1 e D) Marcação do de endotélio com os genes CDH5, VWF, CLDN5, KDR.

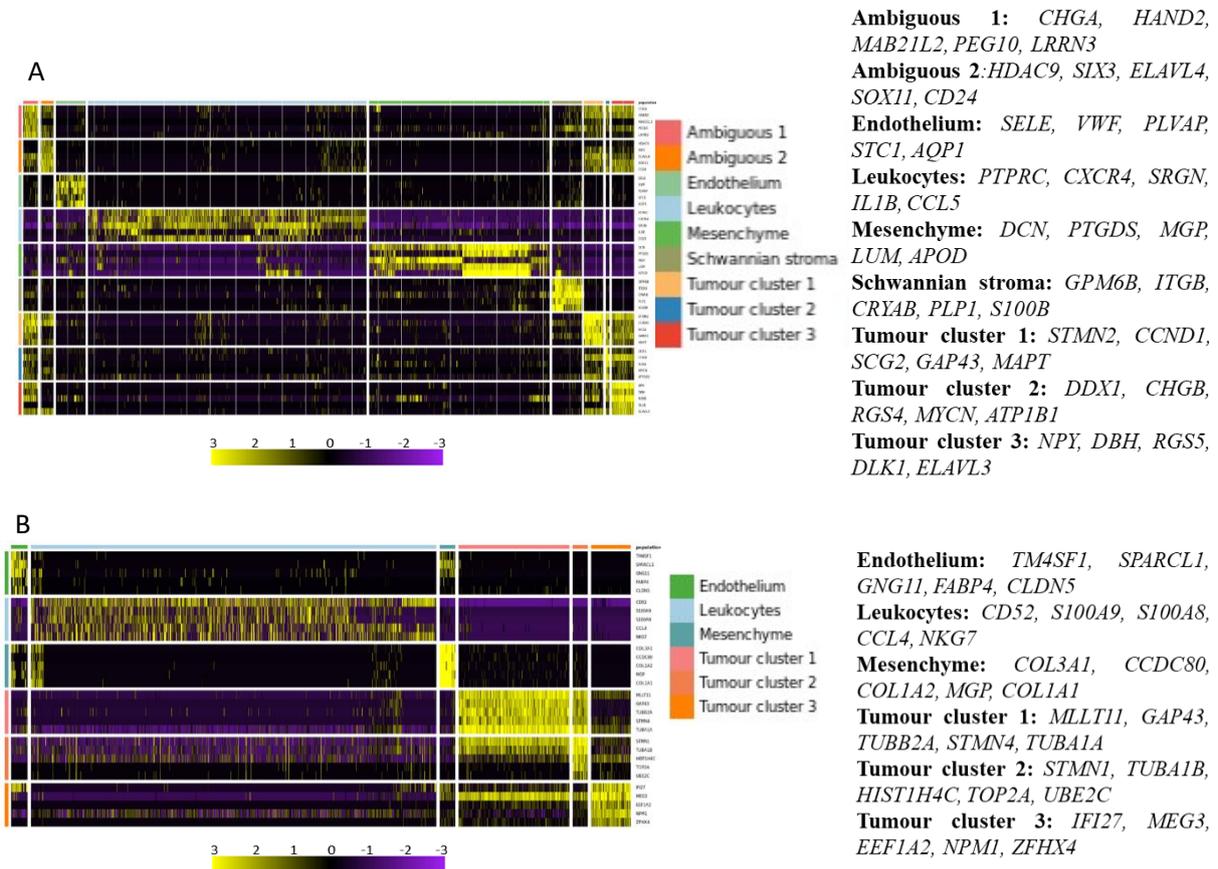
Figura 8 - Gráfico de dimensão reduzida com os genes expressos nos grupos celulares do dataset nb_GOSH.



Legenda: A) Marcação do grupo celular de neuroblastoma com os genes PHOX2B, PHOX2A e MYCN; B) Marcação do grupo mesenquimal com os genes TCF21, PDGFRB, NT5E, THY1; C) Marcação do grupo de leucócitos com os genes PTPRC, GNLY, NKG7, LYZ; D) Marcação do grupo endotelial com os genes CDH5, VWF, CLDN5, KDR.

O fato de que os marcadores tumorais, exceto o MYCN, presente na Figura 9.A, não terem aparecido no heatmap significa que eles podem ser usados como marcadores, como visto na Figura 7.A e 8.A, mas não são, necessariamente, os mais expressos.

Figura 9 - Heatmap com os genes assinatura dos grupos celulares de cada dataset.



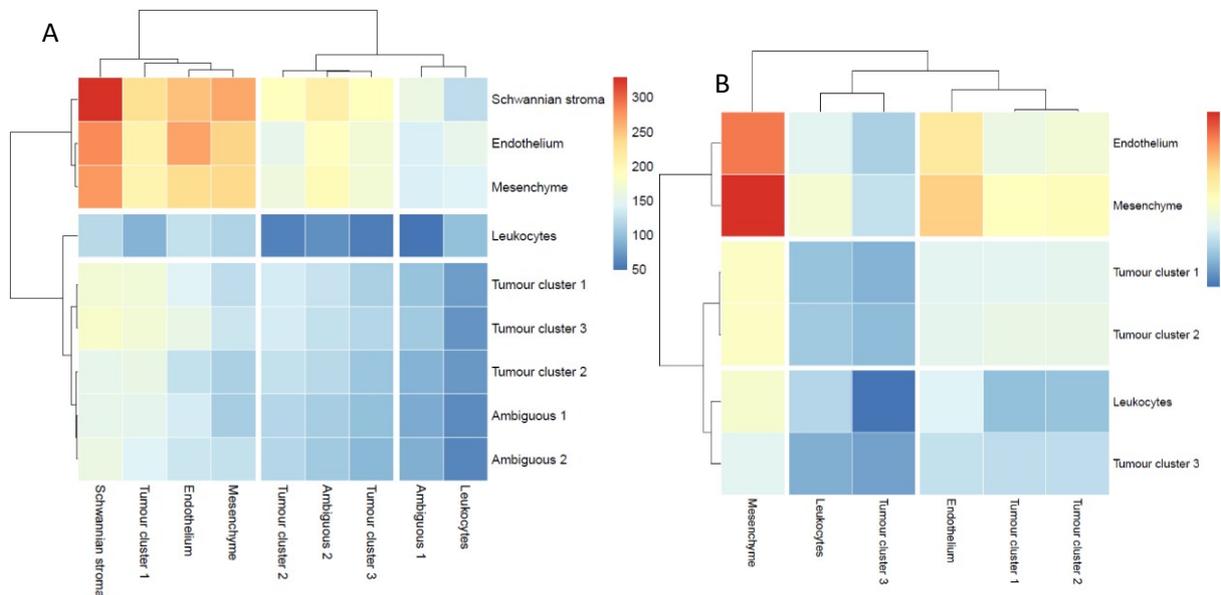
Legenda: A) Os top 5 genes assinatura do dataset nb_PMC. B) Os top 5 genes assinatura do dataset nb_GOSH. O eixo X representa as assinaturas e o eixo y, as populações.

5.1.3 Interação entre os grupos celulares

A identificação dos grupos, dentre os datasets tumorais, que mais interagem entre si, foram observados através do heatmap de força de interação, o qual baseia-se na matrix gerada pela permutação dos ligantes e receptores dentro dos grupos celulares (Figura 10).

Apesar do dataset nb_PMC ter mais grupos celulares, pôde-se observar que ambos os datasets apresentaram interações fortes com os grupos endotelial e mesenquimal. No caso do nb_PMC (Figura 10.A), temos também uma interação forte entre o grupo tumoral e o de estroma schwanniano, o que era de se esperar, uma vez que o estroma schwanniano está diretamente ligado ao neuroblastoma, sendo utilizado na classificação Shimada para diferenciação tumoral e prognóstico.

Figura 10 - Heatmaps de interação entre os grupos celulares.



A) Interações presente entre os clusters do nb_PMC. B) Interações presente entre os clusters do nb_GOSH. A escala de cores representa o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores, sendo azul (menor grau) e vermelho (maior grau).

5.2 SECRETOMA DOS GRUPOS TUMORAIS

5.2.1 Interação ligante-receptor entre os grupos celulares

O algoritmo CellComm foi utilizado para inferir interações célula-célula no microambiente do neuroblastoma. Utilizando o número de pares ligante-receptor co-expressos (Figura 10) entre combinações possíveis de interações célula-célula, o algoritmo identifica possíveis redes de comunicação intercelular para os datasets nb_GOSH e nb_PMC.

Com base neste heatmap (Figura 10), é possível priorizar/selecionar interações célula-célula para análises mais aprofundadas, com interações em vermelho ou azul implicando um maior ou menor número de pares ligante-receptores co-expressos entre os respectivos tipos celulares, as quais podem ser selecionadas, também, com base em uma pergunta biológica.

Por exemplo, embora as interações entre leucócitos e células tumorais não seja tão evidente pelos heatmaps, interações entre células tumorais e imunológicas são importantes para a imunologia do tumor. Portanto, interações no espectro azul do heatmap podem também ser selecionadas para análises detalhadas.

Na Figura 11, observa-se uma repetição de alguns ligantes, como: GAL, APP, RTN4, MIF, MDK, SPP1, MAPT, GSTP1 e outros, tanto dentro do mesmo grupo celular, com diferentes receptores, como nos outros grupos celulares tumorais. Todos esses genes já foram relacionados ao câncer de forma geral (SOLDATI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2019; FILIPPOU *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2020; LEE; JEONG; JANG, 2021), e ao neuroblastoma em específico.

No NB, foi apontado na literatura, que as galectinas (GAL) tem vias de sinalização complexas envolvidas na interação tumor-hospedeiro, limitando a sobrevivência de células T e atrapalhando a função das células dendríticas (BEROIS; OSINAGA, 2014).

Algumas das interações da GAL, observadas na Figura 11, são com os receptores CXCR4, S1PR1, CCR7 e LPAR1, que estão relacionados à regulação da quimiotaxia, angiogênese, migração/invasão, maturação de células dendríticas e reorganização do citoesqueleto de actina, respectivamente

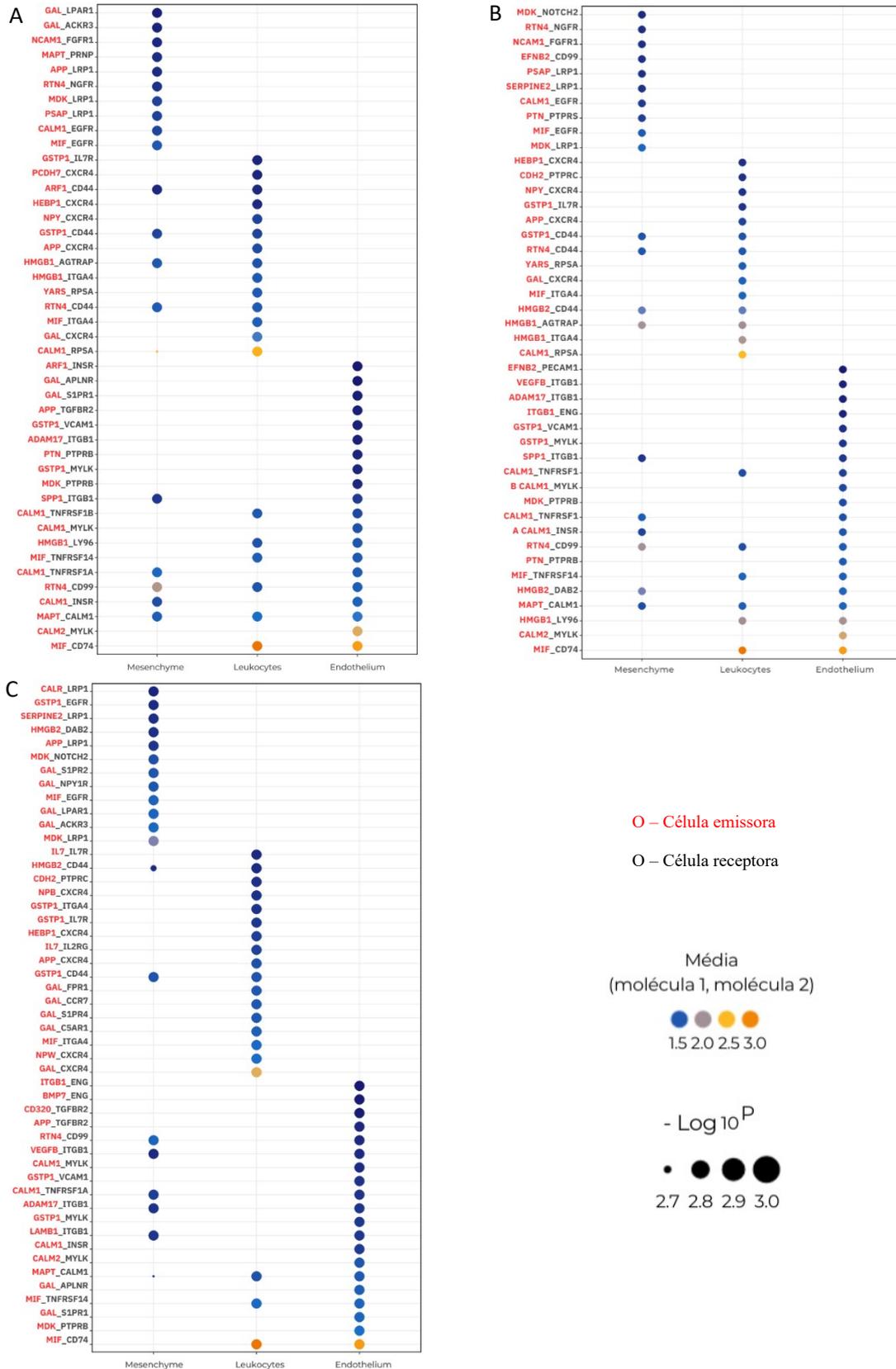
Em relação as MDKs (*midkine*), Kishida e Kadomatsu (2014), observaram que elas são expressas por todas as linhas celulares de neuroblastoma e o seu desligamento (knockdown) sozinho consegue suprimir seu crescimento, e também observaram que os níveis de MDK no plasma sanguíneo está significativamente relacionado à fatores de prognóstico de NB conhecidos.

Os receptores que interagem com as MDKs na Figura 11, são o LRP1, conhecido por estar envolvido na tumorigênese e possivelmente agir como supressor tumoral; O PTPRB possui função importante na angiogênese e na remodelagem de vasos sanguíneos; assim como o receptor NOTCH2, que faz parte da família de receptores atuantes nas decisões de destino celular, tanto as de desenvolvimento embrionário quanto na homeostase do tecido adulto.

A MIF foi reportada por Wienke *et al.* (2021) como secretada pelo neuroblastoma, sendo imunossupressora, conseqüentemente, impede que o funcionamento dos TILs e NKs ocorram de forma eficaz. Na Figura 11A-C, na interação dos grupos tumorais com o endotélio e leucócito, podemos ver que o MIF apresenta alta co-expressão ao CD74, gene que desempenha um papel crítico na apresentação de antígenos.

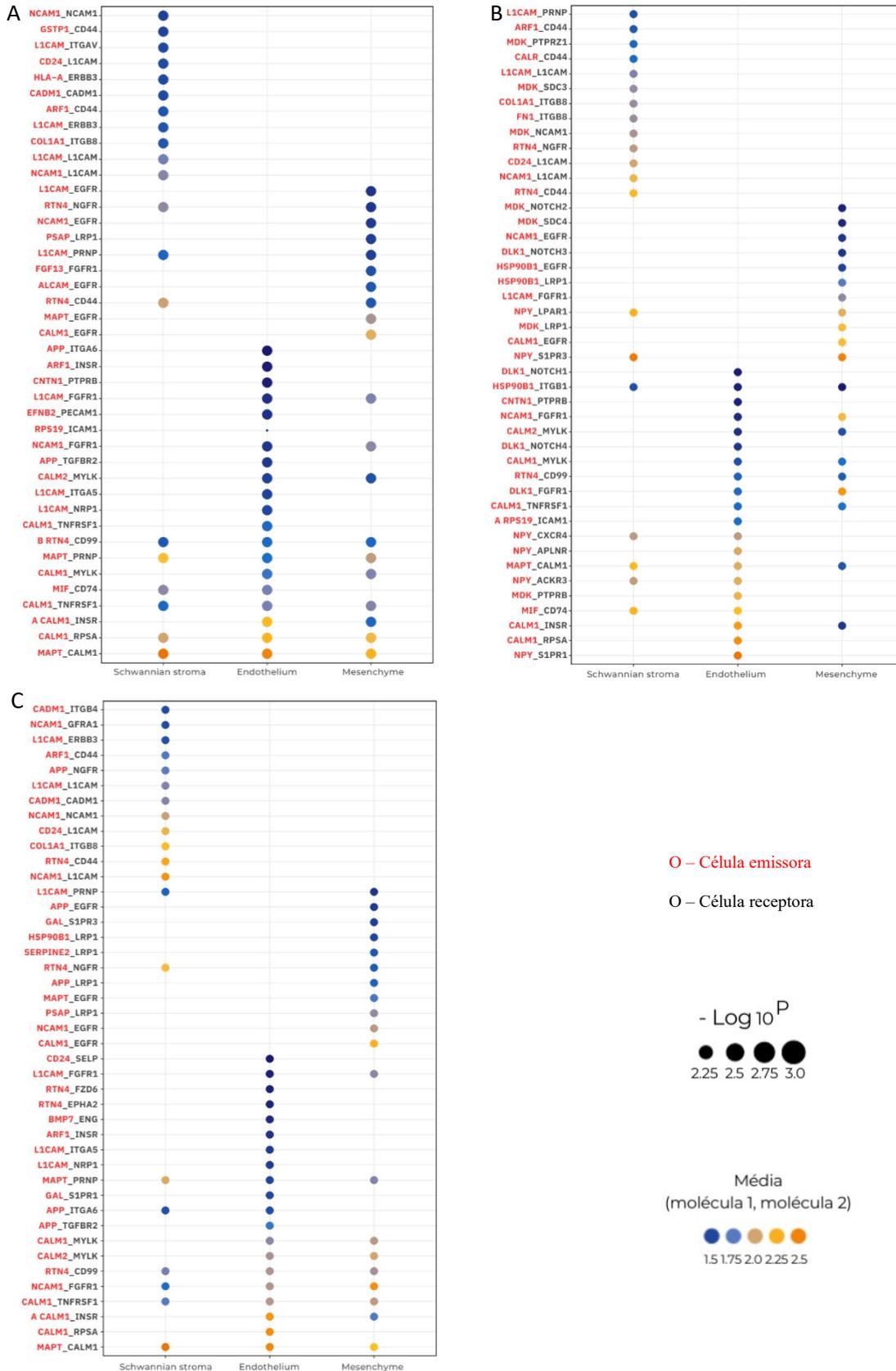
No dataset nb_PMC, diferente do nb_GOSH, no lugar dos leucócitos, temos o grupo celular de estroma schwanniano (Figura 12).

Figura 11 – Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores nos clusters tumorais do dataset nb_GOSH.



Legenda: Interação do cluster tumoral 1 (A), cluster tumoral 2 (B) e cluster tumoral 3 (C), como secretores, com os clusters de mesênquima, leucócitos e endotélio, como receptores.

Figura 12 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores nos clusters tumorais do dataset nb_PMC.



Legenda: Interação do cluster tumoral 1 (A), cluster tumoral 2 (B) e cluster tumoral 3 (C), como secretoras, com os clusters de estroma schwanniano, endotélio e mesênquima, como receptoras.

Ligantes como GAL, APP, RTN4, MIF, MDK e MAPT, presentes na Figura 12, permaneceram presentes na Figura 12, porém com alguns receptores diferentes. Células emissoras como o L1CAM e o NPY se mostraram mais presentes no nb_PMC.

As L1CAMs (*L1 cell adhesion molecule*) podem promover adesão celular, motilidade, e são importantes na migração celular durante o desenvolvimento neural, o que, na maioria dos cânceres contribuir com a metástase (RACHED *et al.*, 2016).

Em casos de NB, já foi observado por autores como Rached *et al.* (2016), que há uma super expressão de L1CAM, e essa expressão está atrelada à melhora do prognóstico, entretanto, não se sabe com detalhes o mecanismo de ação. Já outros autores apontam que o L1CAM estimula a proliferação tumoral (SUZUKI *et al.*, 2018).

As NPYs são marcadores neuronais que estimulam motilidade, invasão, angiogênese, atuam como um fator quimiotático para células do NB e são um conhecido regulador da homeostase óssea (ABUALSAUD *et al.*, 2021). Em conjunto com o receptor Y5R, o NPY promove a sobrevivência de células de neuroblastoma e resistência à quimioterapia via ativação da via p44/42 MAPK (TILAN; KITLINSKA, 2016).

Desta forma, se estabeleceu as principais proteínas de superfície celular envolvidas na interação entre os grupos celulares das amostras. Posteriormente, foi realizado o isolamento dos ligantes (secretoma) e a identificação dos reguladores transcricionais downstream, através da predição da cascata das vias de sinalização do CellComm.

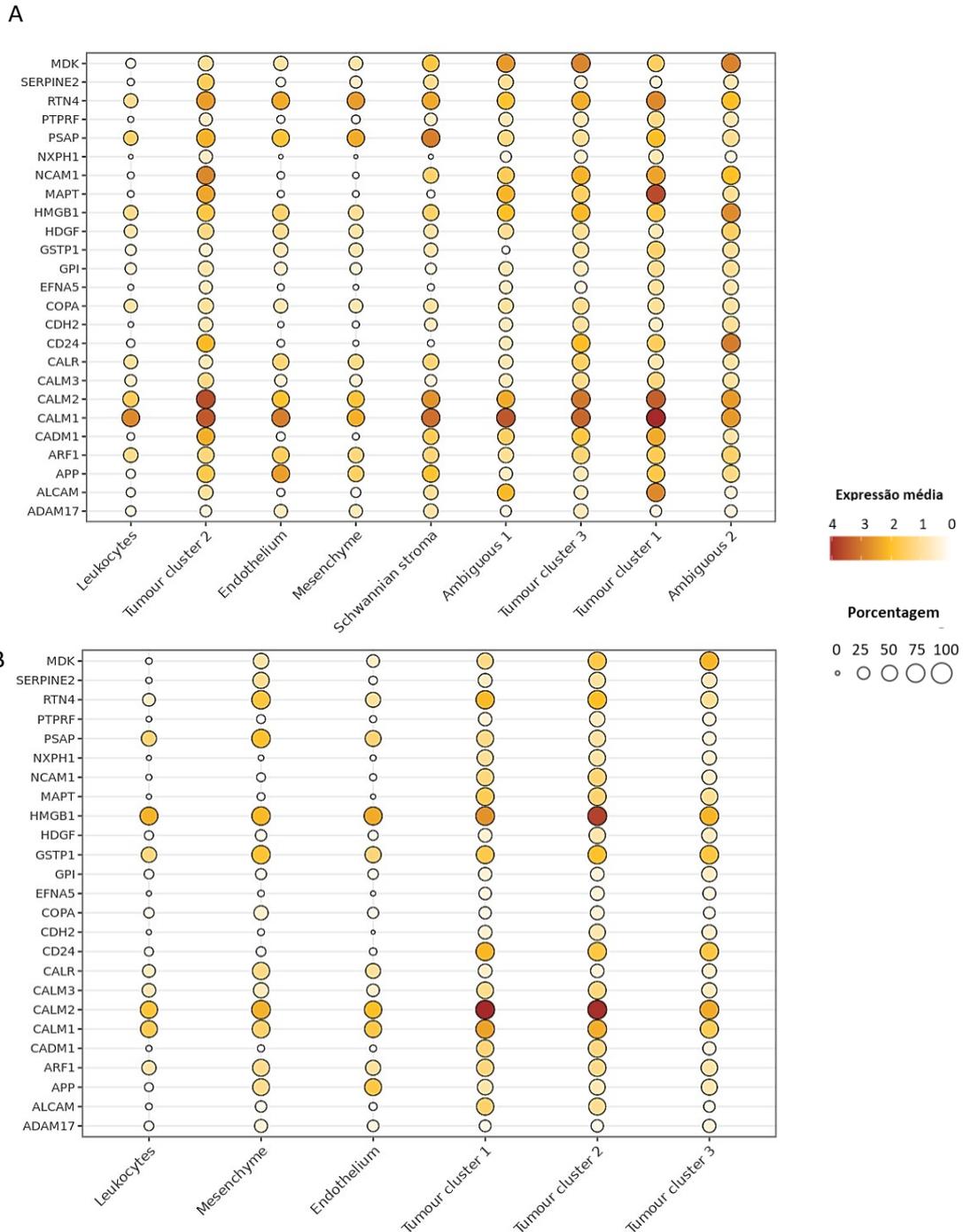
5.2.2 Caracterização do secretoma

Deve-se salientar que a análise do secretoma teve como um base um conhecimento prévio, e utilizou os ligantes e receptores apontados pelo banco de dados do NicheNet. O total de ligantes comuns aos grupos tumorais foi de 25 genes, os quais possuem expressão média diferentes, como pode ser visto na Figura 13. Essa diferença é esperada uma vez que os datasets foram sequenciados com amostras e técnicas diferentes. Ademais, para inferência de funções e correlação com fenótipos patológicos, realizou-se uma pesquisa sobre a função e as doenças relacionadas de cada um dos genes (Quadro 1).

Alguns dos genes comuns tumorais também se apresentaram como principais pares de ligantes-receptores nos grupos tumorais na seção 5.4., sendo eles: MDK, SERPINE2, RTN4, PSAP, NCAM1, MAPT, HMGB1, GSTP1, CD24, CALR, ARF1, APP, ALCAM e ADAM17.

Desta forma, 16 ligantes se apresentaram em uma interação ligante-receptor prioritizada, valendo salientar que, algumas das interações nas Figuras 11 e 12, apresentavam-se no espectro azul, ou seja, pode-se conjecturar que por mais que a interação não seja forte ou não ocorra com tanta frequência, não pode se descartar que aquela interação desencadeie ou auxilie em algum processo dentro do microambiente tumoral.

Figura 13 - Expressão dos ligantes comuns tumorais dos datasets tumorais



Legenda: A) Expressão média dos genes do nb_PMC; B) Expressão média dos genes do nb_GOSH. O tamanho da circunferência do círculo representa a porcentagem dos genes; enquanto o espectro laranja indica a intensidade da expressão dos genes em cada cluster.

Quadro 1 - Funções e doenças relacionadas aos genes tumorais selecionados

Genes	Funções Associadas	Doenças Relacionadas
ADAM17	Interações célula-célula e célula-matriz; Fertilização; Desenvolvimento muscular e Neurogênese	Esclerose múltipla; Carcinoma de cólon e hepatocelular; HNSCC, NSCLC; Câncer de mama e gástrico
ALCAM	Adesão e migração celular; Homeostase	Melanoma; Manchas maculares
APP	Crescimento de neuritos; Adesão neuronal; Sinaptogênese; Mobilidade celular; Regulação transcricional	Angiopatia Amiloide Cerebral; Alzheimer; Câncer de mama; Metástase do linfonodo
ARF1	Sinalização inter e intracelular; Regulação do ciclo celular; Reparo do DNA	Câncer de mama, ovário, próstata; Mieloma
CADM1	Reconhecimento celular; Regulação positiva da produção de citocinas	Câncer de mama, próstata; Carcinoma in situ do colo do útero
CALR	Adesão celular; Homeostase do cálcio; Proliferação, Migração e Adesão tumoral; Fagocitose e Apoptose	Mielofibrose; Trombocitemia; Câncer colorretal, oral e vaginal; carcinoma ductal da mama e urotelial
CD24	Modula sinais de crescimento; Diferenciação em granulócitos e células B	Eritroleucemia; Esclerose Múltipla
CDH2	Desenvolvimento do sistema nervoso; Formação de cartilagem e osso	Câncer de mama, colorretal, e da tireoide
COPA	Transporte reverso de proteínas vesiculares do aparelho de Golgi para o retículo endoplasmático (ER)	Hepatocarcinoma; Câncer cervical; Doença intersticial autoimune pulmonar, articular e renal
EFNA5	Adesão focal; Motilidade celular e Invasão do câncer	Glioblastoma; Esclerose lateral amiotrófica; PVPH; Catarata senil cortical
GPI	Fator neurotrófico; Sobrevivência dos neurônios motores e sensoriais; Indução de secreção de imunoglobulina.	Anemia hemolítica; Artrite reumatoide; Melanoma; Câncer de mama
GSTP1	Proteção contra danos no DNA; Auxílio no metabolismo de agentes quimioterápicos	Carcinoma de células escamosas; Leishmaniose visceral
HDGF	Proliferação e Diferenciação celular	Câncer de pulmão; Carcinoma hepatocelular
HMGB1	Organização do DNA; Inflamação; Diferenciação celular; Migração tumoral	Doenças autoimunes, Câncer pancreático; Câncer de mama
MAPT	Regulação dos microtúbulos e polaridade neuronal.	Alzheimer; Doença de Pick; Demência frontotemporal
NCAM1	Regulação da neurogênese; Crescimento de neuritos; Migração celular	Raiva; Câncer das vias biliares; Leucemia mieloide aguda; Câncer de mama
NXPH1	Proliferação celular; Adesão entre dendritos e axons	Neuroblastoma; Gliomas; Câncer de mama
PSAP	Fator neurotrófico; Tumorigênese	Doença de Gaucher; Câncer de mama e próstata
PTPRF	Crescimento e Diferenciação celular; Ciclo mitótico; Transformação oncogênica	Câncer de fígado; Câncer de mama; Leucemia
RTN4 (NOGO)	Secreção neuroendócrina; Homeostase vascular; Angiogênese tumoral	Gliomas (Oligodendroglioma, glioblastoma e etc); Carcinoma hepatocelular humano
SERPINE2	Regulação da matrix extracelular	Discinesia ciliar; Adenocarcinomas; Câncer de mama, pancreático e colorretal
MDK	Crescimento celular; Migração celular; Angiogênese; Tumorigênese	Câncer gástrico; Carcinoma hepatocelular

Fonte: Dimas, M.M. Funções e doenças foram retiradas do GeneCard: The Human Gene Database e literaturas relacionadas.

5.2.3 Predição dos fatores de transcrição

A comunicação intercelular não é uma interação unidirecional e sim bidirecional, logo, tem-se duas vias de comunicação, e essas vias podem diferir nas proteínas receptoras, nos reguladores de transcrição resultantes, e nos intermediários dessa comunicação. Sendo assim, as predições de vias de sinalização foram plotadas, representadas nas Figura 14, de forma bidirecional, tendo os grupos tumorais como células receptoras e secretoras.

Nem todos os grupos celulares apresentaram vias de sinalização dentre o limiar de atividade predita. Esse limiar foi adequado para cada janela de atividade dos grupos, e por isso, apresentam porcentagens e atividades com valores diferentes. Dentre as vias observadas, devemos ressaltar aquelas que tiveram como resultado os genes PHOX2B, MYCN e TOP2A, os quais já foram relacionados ao neuroblastoma.

As vias mais observadas, tendo como produto final (*t*) o MYCN, foi entre a interação do grupo mesenquimal com o grupo tumoral 2. Já os com o gene PHOX2A como produto, foi observado em interações do grupo tumoral 2 com os grupos: mesenquimal, endotelial, estroma schwanniano e leucócitos.

O gene/enzima TOP2A consegue controlar o estado topológico do DNA ao catalisar a quebra transitória e a união de duas fitas de DNA duplex durante sua transição, permitindo que as fitas passem uma pela outra. Ele é essencial para a divisão celular e é alvo de vários agentes anti-tumorais, rotineiramente utilizando como alvo em estudos de drogas que atuam contra tumores sólidos e hematológicos (UUSKÜLA-REIMAND, L.; WILSON, M., 20220). O TOP2A apresentou-se como um regulador de transcrição na via de sinalização resultante da interação do estroma schwanniano com o grupo tumoral 3.

Ao analisar o desdobramento de todas as vias de sinalização no excel gerado durante as análises, observou-se os seguintes caminhos:

- s->NTRK1->MAP4K4->GRK5->MYCN->t;
- s->GABBR1->HEBP1->LPAR1->GRK5->MYCN->t;
- s->NTRK1->MAP4K4->GRK5->MYCN->t;
- s->NTRK1->PHOX2A->t;
- s->RPSA->RPL15->RPL10->TOP2A->t;
- s->RPSA->SLC25A5->MCM5->TOP2A->t;
- s->RPSA->RPL36->RPL10->TOP2A->t;

- s->SORT1->CDK1->TOP2A->t;
- s->LRP1->C3->C2->C1QB->C1QA->FN1->TOP2A->t;
- s->EBP->LRRC59->CEP131->CEP78->CDK1->TOP2A->t;

Onde “s”, são os *sinks* – uma definição do algoritmo; para os receptores de superfície celular e o “t”, *targets*, são os possíveis reguladores de transcrição downstream do receptor de superfície indicado. Ou seja, podemos observar que, receptores e vias diferentes podem apresentar os mesmos fatores de transcrição resultante.

Outros fatores de transcrição interessantes observados, foram o BRCA1, que é um conhecido marcador de câncer de mama e o APP, que possui função na regulação transcricional e está relacionado a várias doenças, e cuja a presença foi observada em todos os grupos celulares tumorais, como visto no Quadro 1, na seção anterior.

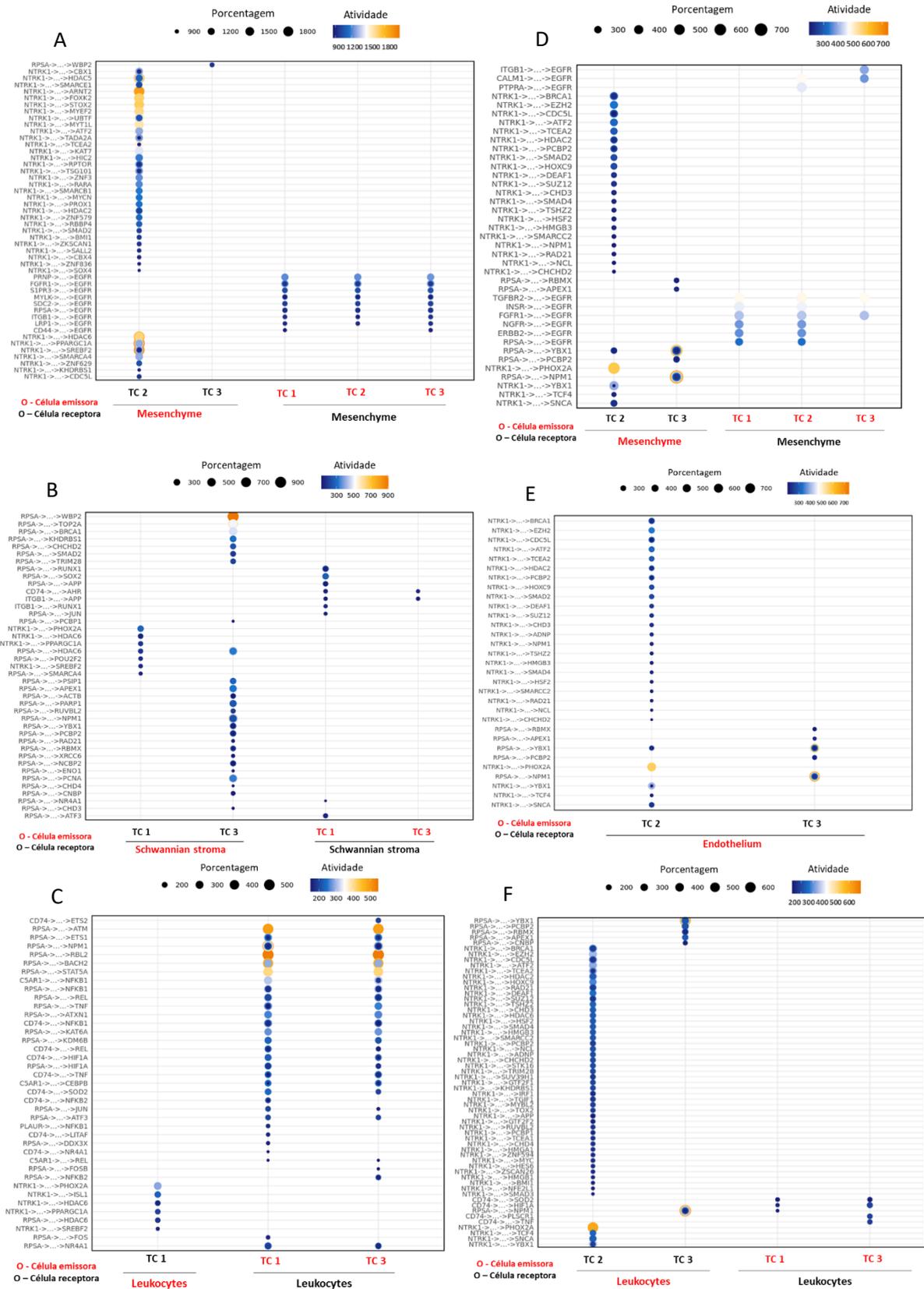
Baseando-se apenas na Figura 14, os targets, com maior atividade predita foram: ARNT2, FOXK2, STOX2, MYEF2, HDAC6, WBP2, ATM, RBL2, STAT5A, NPM1 e YBX1. Desses genes, os que já foram relacionados a outros cânceres são: o NPM1 (Leucemia); YBX1 (Liposarcoma); STAT5 (Mieloma); RBL2 (Retinoblastoma); ATM (Linfoma); FOXK2 (Câncer de pulmão).

Já os genes ARNT2, STOX2, MYEF2, HDAC6, WBP2, possuem papéis envolvidos no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise, suscetibilidade à pré-eclâmpsia com restrição do crescimento fetal, repressor transcricional do gene da proteína básica da mielina, desacetilação de resíduos de lisina na parte N-terminal das histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4), coativador transcricional dos receptores de estrogênio e progesterona, respectivamente (STELZER, G *et al.*, 2016; GeneCards: The Human Gene Database. www.genecards.org).

Vale ressaltar que o STOX2 é parálogo do STOX1, gene envolvido na regulação dos níveis de espécies reativas oxidativas e espécies reativas de nitrogênio e na homeostase mitocondrial na placenta (STELZER, G *et al.*, 2016; GeneCards: The Human Gene Database. www.genecards.org).

Estes genes podem representar novas direções de pesquisa em neuroblastoma, uma vez que não foram diretamente implicados no desenvolvimento e progressão da doença.

Figura 14 - Análise de predição das vias de sinalização downstream



Legenda: Os gráficos de A-C são análises provenientes do dataset nb_PMC, enquanto os gráficos D-E provem do nb_GOSH. TC é sigla para *Tumour cluster*. A) Vias entre o grupo mesenquimal e os grupo tumorais; B) Vias entre o grupo de estroma schwanniano e os grupos tumorais; c) Vias entre os leucócitos e os grupos tumorais; D) Vias entre o grupo mesenquimal e os clusters tumorais; E) Vias entre o grupo endotelial e os grupos tumorais e F) Sinalização entre os leucócitos e os grupos tumorais.

5.3 ANÁLISE DOS DADOS TUMORAIS E CONTROLE INTEGRADOS

5.3.1 Integração dos dados

Os dados integrados de neuroblastoma “nb_gosh” e de controle “adrenal_glands” geraram um novo objeto Seurat, cujo convertido para cellrouter, comportando 13 grupos celulares, observados na Figura 15, sendo eles: células ponte (bridge); Cromafins, Córtex; Endotélio; Eritoblastos; Leucócitos; Mesênquima; SCPs (células precursoras de Schwann); Simpatoblastos e Outros.

A Figura 16 apresenta um heatmap elucidando os principais (top 5) genes em cada população. Destaca-se os genes NPY, STMN2, PRPH, RNT1, TUBA1A, MAP1B, STMN4, TOP2A e HMGB2, pois eles foram os genes apontados ao se intersecionar os grupos tumorais e os simpatoblastos.

Figura 15 - Visualização dos dados integrados com dimensão reduzida (UMAP).

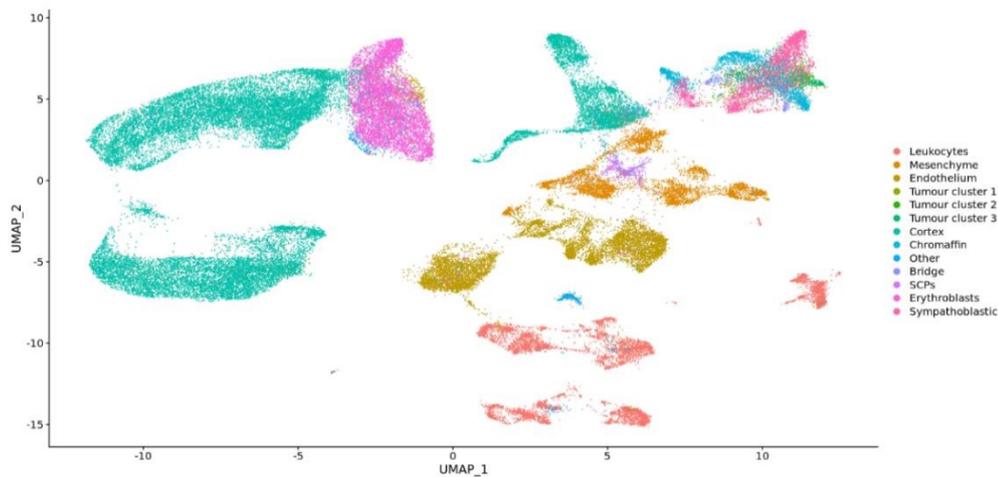
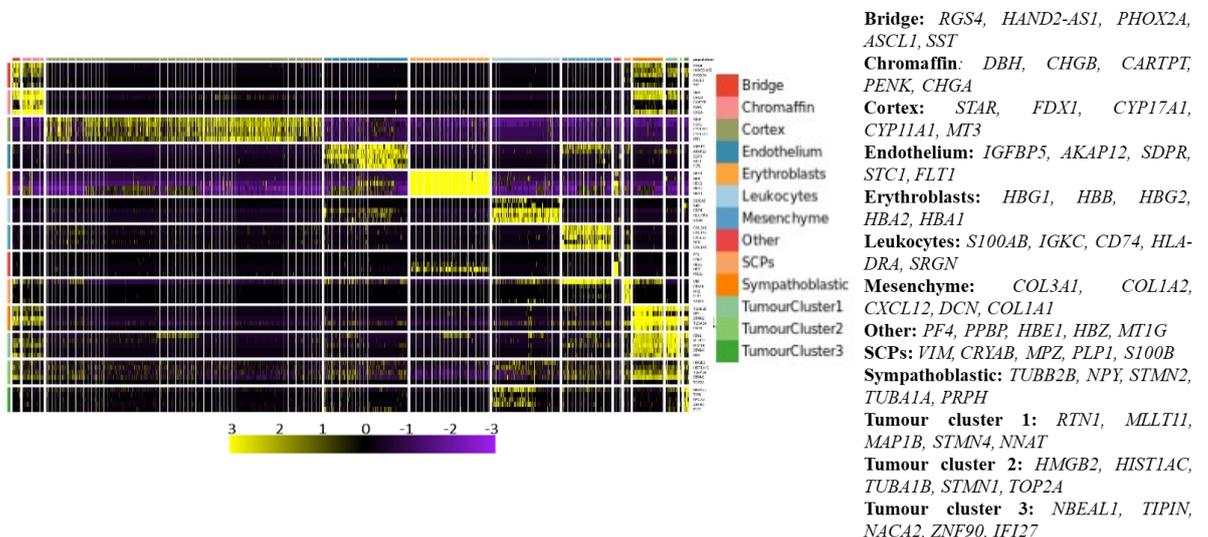


Figura 16 - Heatmap com os genes assinatura dos dados integrados



5.3.2 Interação entre os grupos celulares

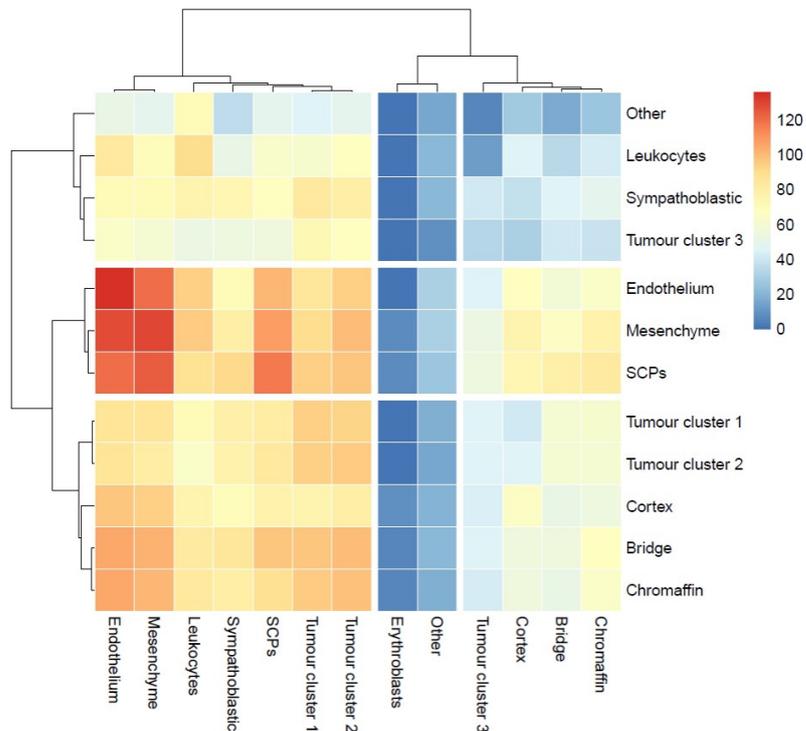
Através do heatmap de interação célula-célula, representado na Figura 17, identificou-se os grupos que mais interagem entre si. Onde é possível observar uma maior interação entre os pares de ligantes-receptores dos grupos: mesenquimal, endotelial, cromafina, SCPs e simpatoblastos com os grupos celulares tumorais 1 e 2.

Os autores dos datasets utilizados, em seu estudo, analisaram os perfis de expressão de RNA de células individuais e encontraram uma população de simpatoblastos intramedulares derivados dos precursores das células de Schwann (SCPs).

Uma das suposições levantadas sobre a gênese do neuroblastoma é de que as SCPs associadas aos nervos, ao se dividir por um tempo e diferenciando-se em outros tipos celulares findam ocasionando na formação do neuroblastoma. Portanto, uma das conclusões apontada pelos autores é de que os simpatoblastos poderiam ser uma possível origem para as células tumorais de neuroblastoma.

Na Figura 17 podemos observar que há uma interação no espectro mais quente entre as SCPs, simpatoblastos, mesenquênio e os grupos celulares tumorais.

Figura 17 - Heatmaps de interação entre os grupos celulares integrados



Legenda: Interações entre os clusters presentes no dataset integrado (tumoral e controle), onde o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores é mostrado de azul (menor grau) até vermelho (maior grau).

5.3.3 Interação ligante-receptor entre os grupos celulares

Baseando-se no heatmap de interações e na literatura, buscou-se priorizar ligantes e receptores priorizados na superfície celular, tendo como enfoque os grupos mesenquimais, SCPs e simpatoblastos (Figura 18). Utilizando o princípio da bidirecionalidade, os gráficos foram gerados com os grupos tumorais como receptores e como secretores (Figura 19), onde eles foram pareados com outros grupos que apresentaram alguma atividade de interação no heatmap, e não só os 3 mencionados anteriormente, para que pudéssemos ter um panorama geral dos principais pares ligantes-receptores formado pelos grupos tumorais.

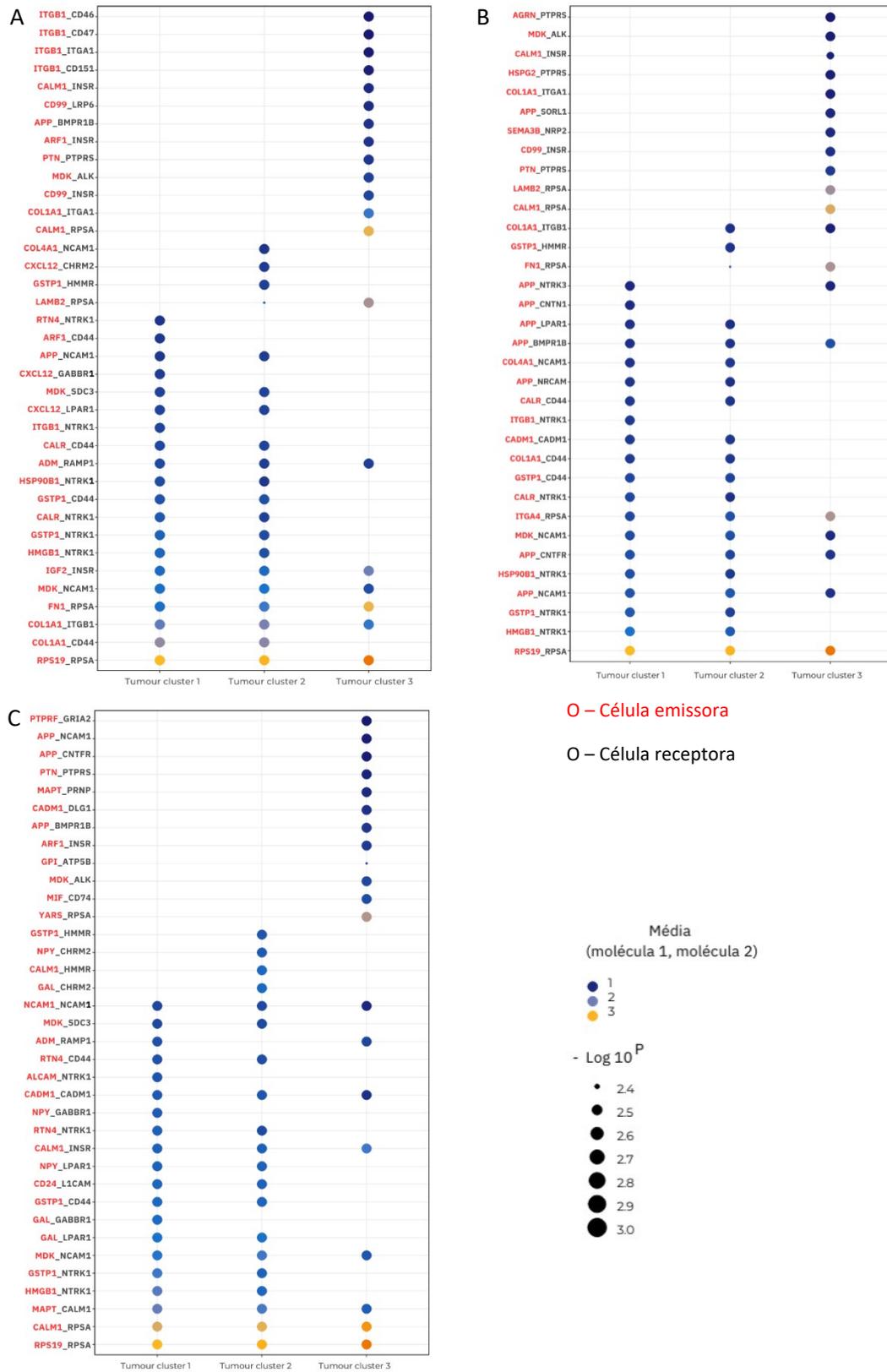
Os ligantes RTN4, MDK, CALR e NPY foram novamente identificados, como visto nas seções anteriores. Um gene em específico, o APP, se apresentou como ligante de vários receptores, em especial nos que tinham as SCPs como secretoras (Figura 18.B). Deste grupo, o APP se apresentou como ligante nos 3 grupos tumorais, quando interagindo com os receptores BMPR1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B*), CNTFR (*Ciliary Neurotrophic Factor Receptor*) e NCAM1 (*Neural Cell Adhesion Molecule 1*).

As BMPs estão envolvidas na formação óssea endocondral e na embriogênese, e relacionadas às vias de sinalização AKT e NF-κB. Já as CNTFR desempenham um papel crítico na sobrevivência, diferenciação e expressão gênica de células neuronais, e está envolvida na sinalização de citocinas no sistema imunológico e em específico na sinalização da família da interleucina-6. As NCAM1, citadas na seção anterior, estão envolvidas na regulação da neurogênese e migração celular. Entre suas vias relacionadas estão a cascata RAF/MAP quinase e o desenvolvimento do sistema nervoso.

Na Figura 20, tendo os grupos tumorais como secretores e com a adição dos outros grupos celulares, temos um panorama mais diversificado. A interação RTN4_CD99 se mostrou presente em todos os grupos em 19.A e 19.B, em 20.C se apresentou apenas nos simpatoblastos e cromafina.

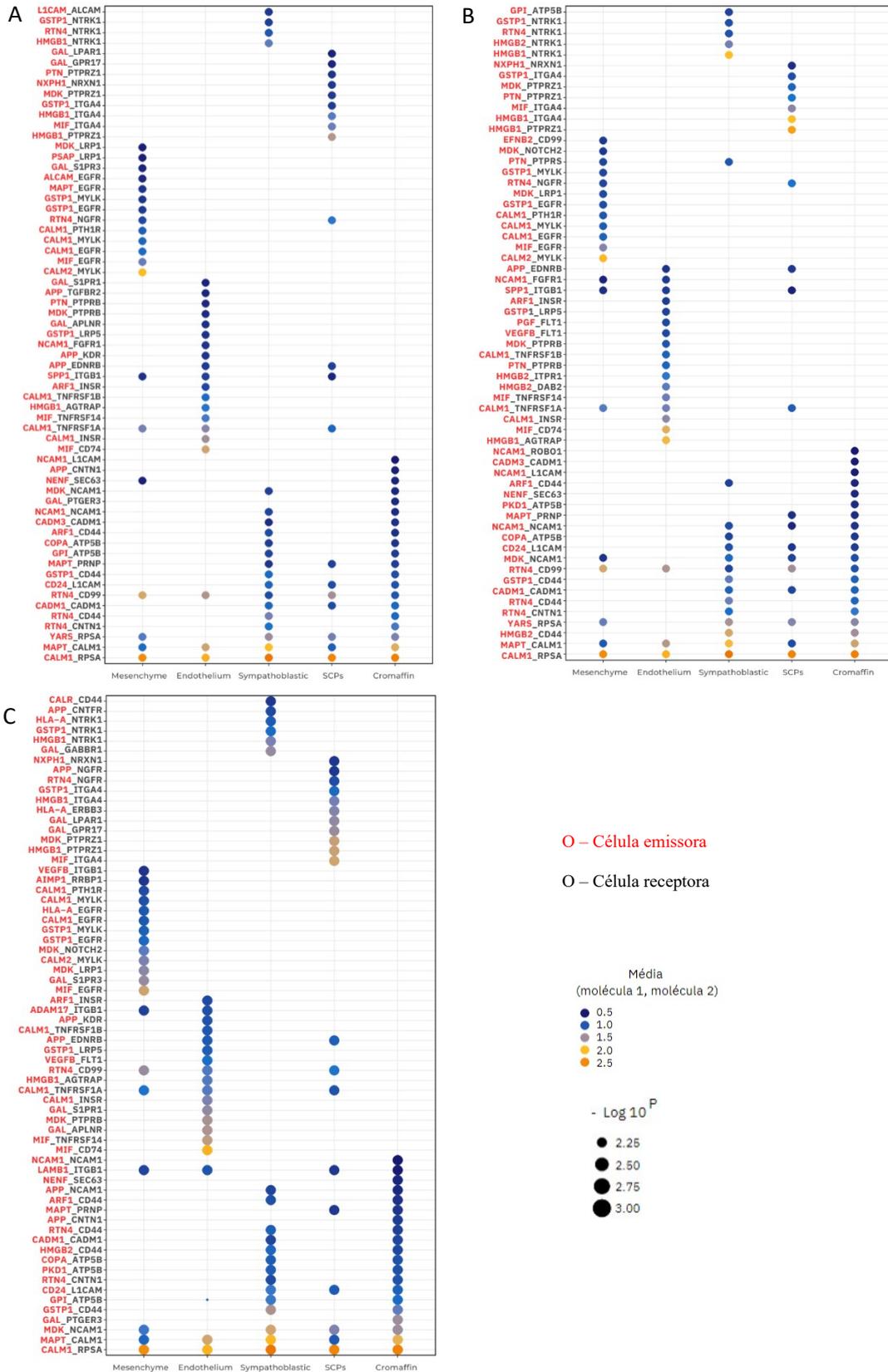
O RTN4 (*Reticulon 4*), também conhecido como NOGO, está envolvido na secreção neuroendócrina, no tráfego de membrana em células neuroendócrinas e produz uma resposta inibitória potente de crescimento de neurônios. Ele também regula a homeostase lipídica, a sinalização AKT e a modulação do citoesqueleto (PATHAK *et al.*, 2018).

Figura 18 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores do dataset integrado com os grupos tumorais como receptores



Legenda: Interação do grupo mesenquimal (A), grupo das SCPs (B) e grupo dos simpatoblastos (C) com os grupos tumorais 1, 2 e 3. O eixo X são os grupos tumorais como receptores, na Figura 19 eles são as células secretoras.

Figura 19 - Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores do dataset integrado com os clusters tumorais como secretores



Legenda: Interação do grupo tumoral 1 (A), grupo tumoral 2 (B) e grupo tumoral 3 (C) com os grupos mesenquimal, endotelial, simpatoblástico, SCPs e cromafina, os quais eram os secretores na Figura 18, nesta figura, eles estão agindo como os receptores.

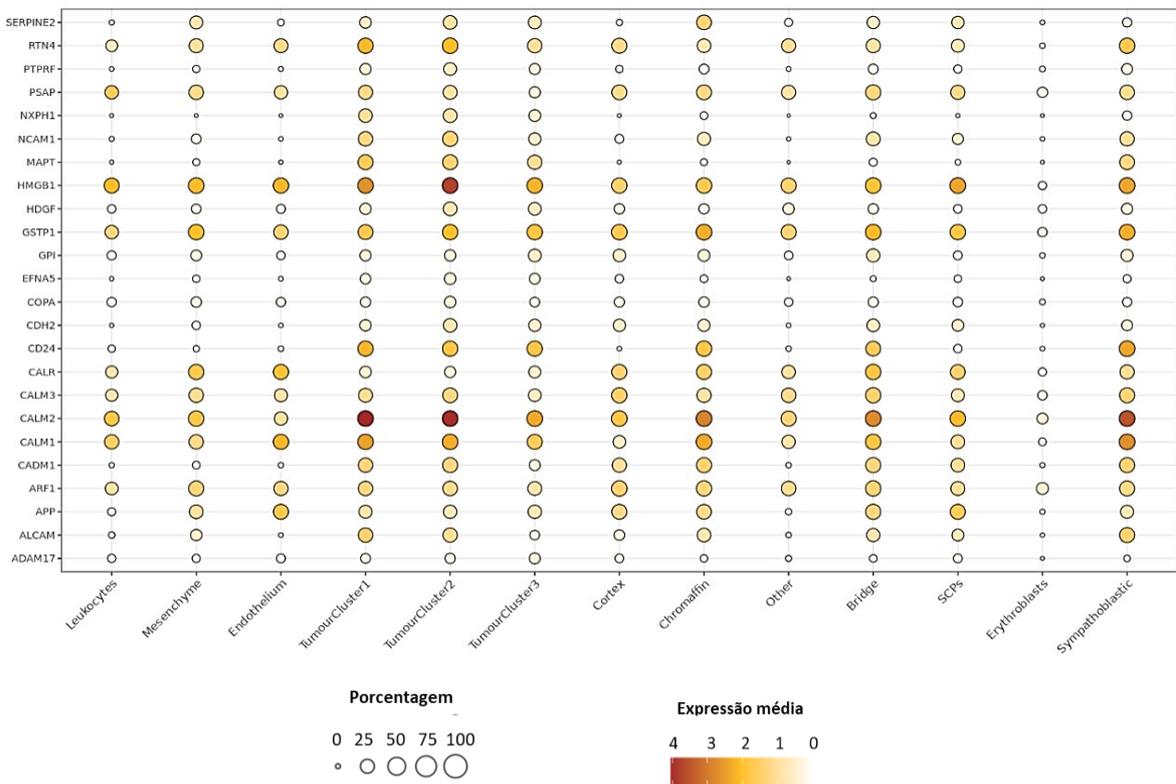
O gene CD99 é uma glicoproteína relacionada na migração de leucócitos, transporte de proteínas transmembrana e morte de células T por uma via independente de caspase. Ademais, o CD99 já foi relacionado ao sarcoma de Ewing extraósseo e o linfoma linfoblástico, e apontado como um possível oncosupressor no osteossarcoma. Então, com essa interação poderíamos, por exemplo, supor que o RTN4 está agindo como um inibidor do CD99, um supressor tumoral, embora esta hipótese ainda precise ser demonstrada.

Outros genes, já citados anteriormente, como o MDK e MAPT apareceram com frequência nas análises realizadas cujo o secretor é o tumoral (Figura 19). Alguns presentes apenas na interação com o grupo mesenquimal ou SCPs, outros presentes em mais de um grupo.

5.3.4 Expressão gênica do secretoma

Os 25 genes identificados na seção 5.2.2, que são os ligantes comuns a todos os grupos tumorais, foram utilizados para gerou um gráfico com a expressão média dos genes ligantes em todos 13 grupos presentes no dataset integrado (Figura 20).

Figura 20- Expressão dos genes comuns tumorais no dataset integrado



Legenda: Expressão gênica do dataset “nb_gosh” e “adrenal_glands” integrados. O tamanho da circunferência do círculo representa a porcentagem dos genes; enquanto o espectro laranja indica a intensidade da expressão dos genes em cada grupo celular

Os genes RTN4, HMGB1, GSTP1, CD24 e ALCAM tiveram uma expressão média de nível mediano (3), nos grupos tumorais, nos simpatoblastos e no cromafim. Já no grupo das SCPs, eles apresentaram uma porcentagem e uma expressão média menor (1-2). O gene APP se mostrou com uma porcentagem pequena e uma expressão média baixa (1-2) em todos os grupos. Os eritoblastos não apresentaram nenhuma expressão significativa dos 25 genes analisados.

5.3.5 Genes diferencialmente expressos

Aplicando a função de comparação de grupos do FUSCA pode-se observar quais genes estavam mais expressos dentro das populações selecionadas. Ao todo se fez 9 comparações, realizada em pares, onde o grupo 1, representava cada um dos 3 grupos tumorais, e o grupo 2 foi o grupo dos simpatoblastos, mesenquimais e SCPs, individualmente. Cada comparação gerava um *dataframe* contendo o a média na população (*mean.p*), a média fora da população (*mean.np*), o *fold change* (fc), o valor de p, e o valor de p ajustado (Tabela 2).

Levando em consideração, que em *single-cell* o número de células é muito grande e, conseqüentemente, o valor de p, geralmente, encontra-se inflado e não necessariamente representa a significância estatística, desconsiderou-se o valor de p e somente o *fold change* foi utilizado para selecionar genes de interesse. Com exceção nos casos em que $p \geq 1$, quando ocorrido, os genes eram descartados da análise, apesar do valor de *fold change*.

Desta forma, analisou-se os dados e foram selecionados os genes com maiores fc, positivo (Tabela 2) e negativo (Tabela 3), e com funções biológicas já previamente conhecidas e/ou correlacionada às análises previamente realizadas.

Podemos observar que dentre os genes escolhidos, os genes CD99, APP, NPY, CD24, TOP2A, RTN4, STMN2, PRPH, e TUBA1A foram previamente discutidos nas seções anteriores. Ao todo foram selecionados, 15 genes mais expressos nos 3 grupos tumorais (fc positivo) e 15 genes do grupo comparativo (fc negativo), sendo ele composto por 5 genes de cada grupo (mesenquimal, SCPs e simpatoblastos).

Devido ao fato de serem um grupo celular de mesma natureza e alguns dos genes se repetirem, não se fez uma segregação dos genes de cada cluster tumoral, fez-se uma junção dos genes repetidos e genes únicos (Tabela 3). Os genes presentes no Tabela 2 e 3, foram os utilizados para análise de enriquecimento funcional.

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos dos grupos tumorais (fc positivo)

Gene	Mean.np	Mean.p	Fold change
STMN2	1.486612835	6.342031	4.855418
MLLT11	0.988803637	4.969981	3.981177
CD24	0.414093506	3.462818	3.048724
PRPH	0.402575331	3.237211	2.834636
MAPT	0.075329271	2.757533	2.682203
CALM2	3.337384664	5.976708	2.639324
TUBA1A	4.086213975	6.672147	2.585933
CNTFR	0.042629773	2.138716	2.096087
GAP43	0.1278720777	4.357368	4.229496
CHGB	0.1694901527	4.056550	3.887059
TOP2A	0.098095826	3.630781	3.532685
NBEAL1	0.6516276082	5.331117	4.679489
B2M	1.3385380687	5.557171	4.218633
IL7	0.9870601760	2.837618	1.850558
RTN4	1.3961512210	3.386905	1.990754

Fonte: Dimas, M.M.

Tabela 3– Genes diferencialmente expressos dos grupos comparativos (fc negativo)

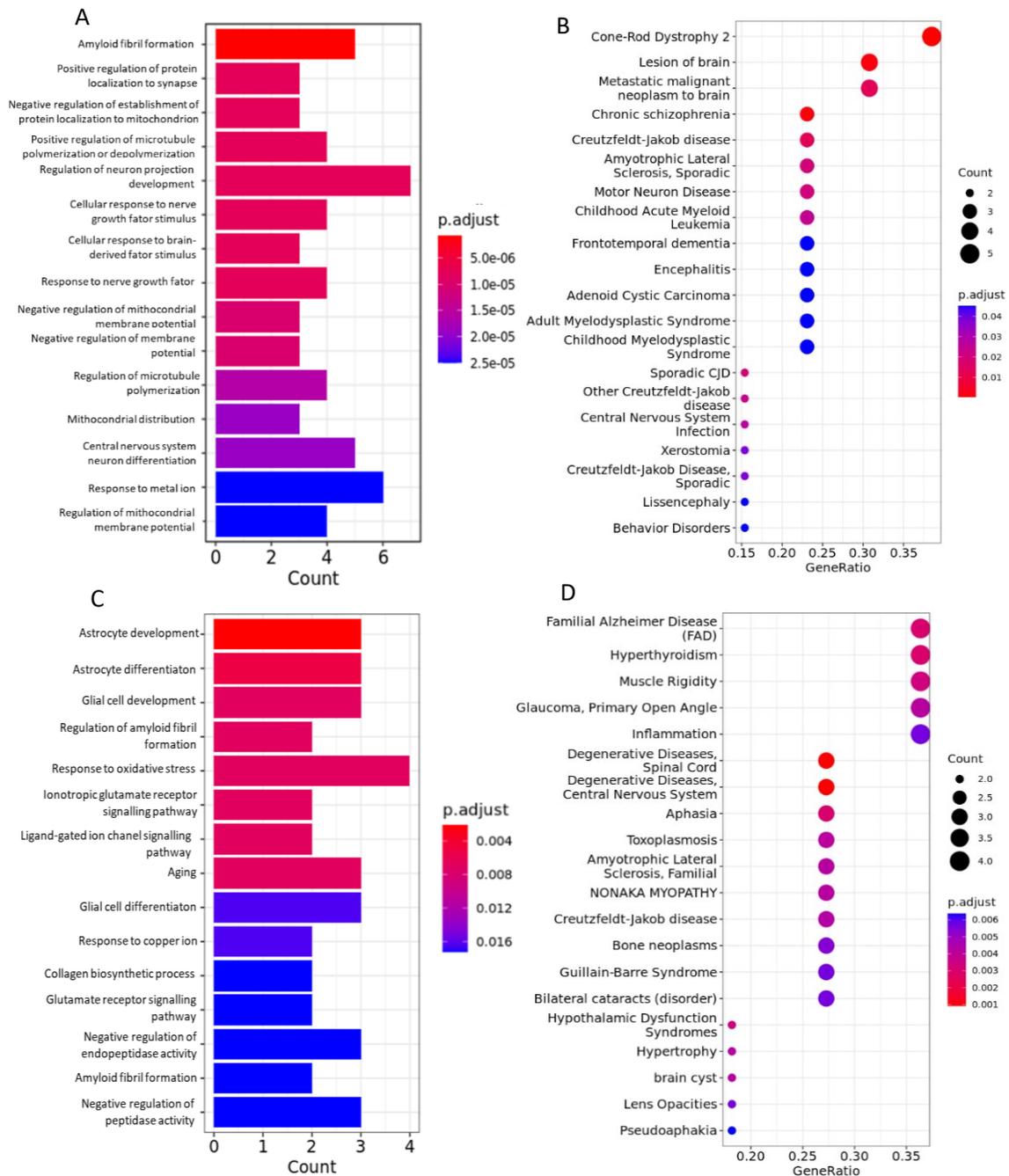
	Gene	Mean.np	Mean.p	Fold change
Mesenquimais	RPL10	6.452987	0.0000000000	-6.452987
	MT-CO1/COX1	6.169683	0.0000000000	-6.169683
	RPS8	5.981033	0.0000000000	-5.981033
	COL1A1	5.950405	0.2257924977	-5.724613
	VIM	5.809642	0.6704646949	-5.139178
SCPs	HBG2	5.750115	0.0445250204	-5.705590
	CRYAB	3.989616	0.0000000000	-3.989616
	PLP1	4.219191	0.0000000000	-4.219191
	CD99	2.316891	0.1039149521	-2.212976
	APP	2.793059	1.700237093	-1.092822
Simpatoblastos	RPS2	5.714917	0.0000000000	-5.714917
	RPL13A	5.684975	0.0000000000	-5.684975
	CCT2	2.113868	0.0000000000	-2.113868
	NPY	4.709184	2.671309572	-2.037875
	LXN	1.792093	0.001089953	-1.791003

Fonte: Dimas, M.M.

5.3.6 Enriquecimento funcional

Selecionado os genes, fez-se o enriquecimento funcional, com ontologia de gene (GO) e doença (DO), dos grupos tumorais (*up-regulated*) e dos comparativos (*down-regulated*) (Figura 21) e a integração dos dois (Figura 22), para visualização da interseção de funções de grupos tumorais e sádios.

Figura 21 – Enriquecimento funcional (GO e DO) dos genes selecionados



Legenda: A) Gráfico de barras dos termos enriquecidos (GO) do cluster tumoral (*up-regulated*). B) Gráfico de pontos dos termos enriquecidos (DO) do cluster tumoral (*up-regulated*). C) Gráfico de barras dos termos enriquecidos (GO) do cluster comparativo (*down-regulated*). D) Gráfico de pontos dos termos enriquecidos (DO) do cluster comparativo (*down-regulated*). *Count* refere-se ao número de genes relevantes encontrados relacionados à função; *GeneRatio* é a proporção de genes relevantes a uma determinada função, levando em consideração o número total de genes (T=15 genes). Para o enriquecimento DO utilizou-se o método Benjamini-Hochberg para ajuste do valor de p.

Dentre as funções, relacionadas aos genes do cluster tumoral, pode-se observar que a maioria dos genes selecionados estão relacionados à regulação do desenvolvimento da projeção neuronal, diferenciação neuronal no sistema nervoso central, formação de fibrilas amiloides e resposta à ions metálicos.

As fibrilas amiloides são um conglomerado de proteínas mal formadas que se agregam à oligômeros, que, devido a essa conformação anormal das fibrilas, elas se tornam insolúveis, e conseqüentemente, difíceis de serem removidas, o que ocasiona na disrupção da estrutura normal do tecido e à interferência na fisiologia normal (Adroque, H.E., 2022).

Como comentado na seção 5.2.1, o cálcio, um íon metálico, é importante para a migração e invasão das células cancerosas. Além disso, a homeostase do cálcio está relacionada ao crescimento e diferenciação neural, potencial de ação e plasticidade sináptica. O seu desequilíbrio pode causar hiperfosforilação da proteína tau, estresse no retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial (WANG *et al.*, 2020). Na Figura 21.A podemos observar que muito dos genes selecionados foram relacionados à resposta a íons metálicos, o que corrobora com o papel do cálcio na progressão tumoral.

Neoplasias como carcinoma adenoide cístico, leucemia, metástase, glaucoma e tumor ósseo foram apontadas nos gráficos 21.B-D, reafirmando a relação dos genes com o processo tumoral. Contudo, ressalta-se que nenhum dos tumores neuroblásticos periféricos (ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma e neuroblastoma) foi citado entre as doenças relacionadas, possivelmente devido à falta de informações moleculares específicas sobre o neuroblastoma em banco de dados e filtro estatístico.

O fato de se ter funções complementares entre os grupos enriquecidos, como formação de fibrilas amiloides e regulação da formação de fibrilas amiloides; resposta à ions metálicos, estresse oxidativo e via de sinalização do canal iônico controlado por ligante, reforça a hipótese de que os genes mais expressos nos seus grupos de escolha, de forma distinta, possuem funções direta e/ou indiretamente correlacionadas.

Quando integrados e enriquecidos funcionalmente, pôde-se visualizar a interseção dos genes e funções atribuídas. No gráfico de rede (Figura 22.B), os genes MAPT e APP estão no centro das interações, mostrando relação entre si e com as funções relevantes atribuídas aos genes em análise. Para a plotagem do gráfico de redes aplicou-se o layout Kamada-Kawai, pois ele posiciona os nós no espaço de tal modo que a distância geométrica (euclidiana) entre eles seja a mais próxima possível da distância teórica (caminho) entre eles.

O gene MAPT foi escolhido dentre os genes diferencialmente expressos, proveniente dos grupos tumorais, enquanto o APP, foi selecionado dentre os genes do cluster das SCPs. A presença desses genes não foi isolada, eles apareceram em outros grupos, tumorais e não tumorais, mas sua expressão foi maior no cluster tumoral 1 (MAPT) e SCPs (APP).

Quadro 2 – Vias de sinalização relacionadas ao gene MAPT

Interações (Secretor - Receptor)	Vias de sinalização
Mesenquêmio - Cluster tumoral	s->TGFBR1->PEG10->MAPT->APP->t
	s->NCAM1->SPTB->MAPT->APP->t
	s->NCAM1->FYN->MAPT->APP->t
	s->NCAM1->SPTB->MAPT->TUBB3->HEY1->t
Endotélio - Cluster tumoral	s->TGFBR1->PEG10->MAPT->APP->t
	s->PTPRA->FYN->MAPT->APP->t
	s->RPSA->RPL28->MAPT->HDAC6->t

Fonte: Dimas, M.M.

As MAPTs são expressas, de forma distinta, no sistema nervoso, dependendo do estágio de maturação neuronal e o tipo de neurônio. As MAPTs fornecem instruções para produzir uma proteína chamada Tau, e, normalmente, é associada à tauopatias e doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Pick's, DFTs). Geralmente, em estudos *in vitro*, as linhas celulares de neuroblastoma são utilizadas como um substituto para células neurais, mas não se tem muita informação sobre o mecanismo das MAPTs em câncer neurológicos, e especificamente, no neuroblastoma (ZAMAN *et al.*, 2018).

As APPs (*Amyloid Precursor Protein*) e os outros membros da família são conhecidas por estarem envolvidas no desenvolvimento do sistema nervoso, sinaptogênese e crescimento axonal, porém podem ser expressas em tecidos não neuronais também. Elas podem agir como moléculas de adesão celular, devido a sua capacidade de interagir de forma cis e trans, e são bastante estudadas em relação a doenças neurodegenerativas, possuindo papel estabelecido na patogênese do Alzheimer (O'BRIEN; WONG, 2011; MÜLLER *et al.*, 2017; PFUNDSTEIN *et al.*, 2022).

Ademais, recentemente tem se apontado o envolvimento das APPs e membro da família de proteínas na progressão, proliferação e migração de células, e na formação das células-tronco hematopoiéticas (LEE *et al.*, 2021; DA ROCHA *et al.*, 2022). O que é interessante, uma vez que, alguns tumores voltam a apresentar características de células tronco ou menos diferenciadas.

Para uma melhor visualização da relação entre os genes e funções apontadas no gráfico de redes, gerou-se um heatmap (Figura 22.A), onde no eixo x, temos os genes relevantes relacionados a função, representado no eixo Y.

A resposta a íons metálicos é outra função apontada na Figura 22 que deve ser ressaltada, pois como citado anteriormente, o cálcio é um íon metálico importante, cuja a homeostase, no caso, a quebra dela auxilia na progressão tumoral e pode causar hiperfosforilação da proteína tau (WANG *et al.*, 2020).

Uma vez que o MAPT, presente como ligante priorizado nos grupos tumorais nas Figura 18 e 19, apontado como um dos 5 genes marcadores dentro da população tumoral na Figura 9.A, e gene com expressão diferencial significativa, no Tabela 2, foi relacionado à resposta a íons metálicos, diferenciação neural do CNS e fator de crescimento neural, faz-se hipotetizar que o gene MAPT possui função biológica relevante na patogênese e progressão do neuroblastoma.

É importante ressaltar que, até o momento, não há nenhuma análise comparativa da comunicação intercelular das células precursoras de neuroblastoma, e este trabalho é apenas o começo de estudos mais aprofundados.

Por fim, devem ser consideradas como limitações deste trabalho, que para identificar com precisão comunicação intercelular, vias de sinalização e regulação de genes, seria necessário a integração de informação espacial (CITE-seq) com perfis epigenômico.

6. CONCLUSÃO

I – A análise *in silico* de dados públicos de single-cell de neuroblastoma forneceu uma melhor compreensão sobre o secretoma do neuroblastoma

II – As interações celulares encontradas foram diversas, mas ao mesmo tempo limitadas a ligantes específicos, como MAPT, APP, RTN4, entre outros.

III – Identificou-se possíveis vias de sinalização que resultam nos genes MYCN, PHOX2A e TOP2A, conhecidos por serem relacionado ao neuroblastoma.

IV - Diante das análises obtidas neste trabalho foi possível observar uma ampla quantidade de genes e fatores relacionados à regulação do desenvolvimento neuronal e mitocondrial.

V – Os genes MAPT e RTN4 mostraram-se promissores para um aprofundamento de estudos relacionados à patogênese e progressão do neuroblastoma

7. PERSPECTIVAS

I - Pesquisas futuras que integrem dados de diferentes grupos celulares e populacionais para fornecer um panorama cada vez mais amplo acerca da dinâmica das interações celulares. Ademais, deve-se aplicar uma abordagem integrando informação espacial, perfis epigenômico e análises *in vitro* e *in vivo* para auxiliar no entendimento do mecanismo patogênico do neuroblastoma.

II - Os genes identificados neste trabalho devem ser testados experimentalmente *in vitro* e *in vivo* para demonstrar seu papel no processo tumoral do neuroblastoma.

REFERÊNCIAS

- ABUALSAUD, N. *et al.* **Neuropeptide Y/Y5 Receptor Pathway Stimulates Neuroblastoma Cell Motility Through RhoA Activation.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [s.l.], v. 8, no February, p. 1–19, 2021. ISSN: 2296-634X, DOI: 10.3389/fcell.2020.627090.
- ADROGUE, H. E. **Amyloidosis of the Heart and Kidney.** *Methodist DeBakey cardiovascular journal*. v. 18,4 27-33. 6 Sep. 2022. DOI:10.14797/mdcvj.1150
- AMAR, D. B *et al.* **Environmental cues from neural crest derivatives act as metastatic triggers in an embryonic neuroblastoma model.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 13, n° 1, p. 2549, 2022. ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/s41467-022-30237-3.
- ARA, T.; DECLERCK, Y. A. **Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma.** *Cancer and Metastasis Reviews*, [s.l.], v. 25, n° 4, p. 645–657, 2006. ISSN: 01677659, DOI: 10.1007/s10555-006-9028-9.
- ASHOK, G. *et al.* **Integrated systems biology approach using gene network analysis to identify the important pathways and new potential drug targets for Neuroblastoma.** *Gene Reports*, [s.l.], v. 23, n° February, p. 101101, 2021. ISSN: 24520144, DOI: 10.1016/j.genrep.2021.101101.
- BAGHBAN, R. *et al.* **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance.** *Cell Communication and Signaling*, [s.l.], v. 18, n° 1, p. 59, 2020. ISSN: 1478-811X, DOI: 10.1186/s12964-020-0530-4.
- BALKWILL, F. R. *et al.* **The tumor microenvironment at a glance.** *Journal of Cell Science*, [s.l.], v. 125, n° 23, p. 5591–5596, 2012. ISSN: 00219533, DOI: 10.1242/jcs.116392.
- BARR, E. K.; APPLEBAUM, M. A. **Genetic predisposition to neuroblastoma.** *Children*, [s.l.], v. 5, n° 9, p. 1–18, 2018. ISSN: 22279067, DOI: 10.3390/children5090119.
- BAYEVA, N. *et al.* **Differentiating Neuroblastoma: A Systematic Review of the Retinoic Acid, Its Derivatives, and Synergistic Interactions.** *Journal of Personalized Medicine*, [s.l.], v. 11, n° 3, p. 211, 2021. ISSN: 2075-4426, DOI: 10.3390/jpm11030211.
- BELL, J. L. *et al.* **Identification of RNA-binding proteins as targetable putative oncogenes in neuroblastoma.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 21, n° 14, p. 1–27, 2020. ISSN: 14220067, DOI: 10.3390/ijms21145098.
- BEROIS, N.; OSINAGA, E. **Glycobiology of Neuroblastoma: Impact on Tumor Behavior, Prognosis, and Therapeutic Strategies.** *Frontiers in Oncology*, [s.l.], v. 4, no May, p. 1–13, 2014. ISSN: 2234-943X, DOI: 10.3389/fonc.2014.00114.
- BOEVA, V. *et al.* **Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries.** *Nature Genetics*, [s.l.], v. 49, n° 9, p. 1408–1413, 2017. ISSN: 15461718, DOI: 10.1038/ng.3921.
- BORBA, F. M. S. G. *et al.* **Aspectos Clínicos e Fatores Prognósticos do Neuroblastoma: Relato de Caso.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, [s.l.], v. 68, n° 3, p. 3–7, 2022. DOI: 10.32635/2176-9745.rbc.2022v68n3.2515.

BRADY, S. W. *et al.* **Pan-neuroblastoma analysis reveals age- and signature-associated driver alterations.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 11, n° 1, p. 1–13, 2020. ISSN: 20411723, DOI: 10.1038/s41467-020-18987-4.

BRANDETTI, E. *et al.* **MYCN is an immunosuppressive oncogene dampening the expression of ligands for NK-cell-activating receptors in human high-risk neuroblastoma.** *OncoImmunology*, [s.l.], v. 6, n° 6, p. 1–10, 2017. ISSN: 2162402X, DOI: 10.1080/2162402X.2017.1316439.

BROWAEYS, R. *et al.* **NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes.** *Nature Methods*, [s.l.], v. 17, n° 2, p. 159–162, 2019. ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/s41592-019-0667-5.

CAPECE, D. *et al.* **Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, [s.l.], v. 78, p. 51–61, 2018. ISSN: 10963634, DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.08.004.

CHEN, M. J. *et al.* **Transcriptome Dynamics of Hematopoietic Stem Cell Formation Revealed Using a Combinatorial Runx1 and Ly6a Reporter System.** *Stem Cell Reports*, [s.l.], v. 14, n° 5, p. 956–971, 2020. ISSN: 22136711, DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.03.020.

CHEN, S.-T. *et al.* **Breast Tumor Microenvironment: Proteomics Highlights the Treatments Targeting Secretome.** *Journal of Proteome Research*, [s.l.], v. 7, n° 4, p. 1379–1387, 2008. ISBN: 6176321972, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr700745n.

CHEUNG, N. K. V.; DYER, M. A. **Neuroblastoma: Developmental biology, cancer genomics and immunotherapy.** *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 13, n° 6, p. 397–411, 2013. ISSN: 1474175X, DOI: 10.1038/nrc3526.

CHOW, A. *et al.* **Macrophage immunomodulation by breast cancer-derived exosomes requires Toll-like receptor 2-mediated activation of NF- κ B.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 5750, 2014. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep05750.

COLELLA, S. *et al.* **Molecular signatures of metastasis in head and neck cancer.** *Head & Neck*, [s.l.], v. 30, n° 10, p. 1273–1283, 2008. ISSN: 10433074, DOI: 10.1002/hed.20871.

COLON, N. C.; CHUNG, D. H. **Neuroblastoma.** *Advances in Pediatrics*, [s.l.], v. 58, n° 1, p. 297–311, 2011. ISBN: 6176321972, ISSN: 00653101, DOI: 10.1016/j.yapd.2011.03.011.

DA CUNHA, B. R. *et al.* **Cellular interactions in the tumor microenvironment: The role of secretome.** *Journal of Cancer*, [s.l.], v. 10, n° 19, p. 4574–4587, 2019. ISSN: 18379664, DOI: 10.7150/jca.21780.

DA ROCHA, E. L. *et al.* **CellComm infers cellular crosstalk that drives haematopoietic stem and progenitor cell development.** *Nature Cell Biology*, [s.l.], v. 24, n° 4, p. 579–589, 2022. ISSN: 1465-7392, DOI: 10.1038/s41556-022-00884-1.

DA ROCHA, E. L. *et al.* **Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 892, 2018. ISSN: 2041-1723, DOI: 10.1038/s41467-018-03214-y.

FILIPPOU, P. S. *et al.* **Midkine (MDK) growth factor: a key player in cancer progression and a promising therapeutic target.** *Oncogene*, [s.l.], v. 39, no 10, p. 2040–2054, 2020. ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/s41388-019-1124-8.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. **Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.** *Nature Reviews Immunology*, [s.l.], v. 9, n° 3, p. 162–174, 2009. ISSN: 1474-1733, DOI: 10.1038/nri2506.

GRONBORG, M. *et al.* **Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach.** *Molecular and Cellular Proteomics*, [s.l.], v. 5, n° 1, p. 157–171, 2006. ISSN: 15359476, DOI: 10.1074/mcp.M500178-MCP200.

HANEMAAIJER, E. S. *et al.* **Single-cell atlas of developing murine adrenal gland reveals relation of Schwann cell precursor signature to neuroblastoma phenotype.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s.l.], v. 118, n° 5, 2021. ISSN: 10916490, DOI: 10.1073/pnas.2022350118.

HIAM-GALVEZ, K. J. *et al.* **Systemic immunity in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 21, n° 6, p. 345–359, 2021. ISBN: 0123456789, ISSN: 14741768, DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z.

HOOD, L. **Systems biology: Integrating technology, biology, and computation.** *Mechanisms of Ageing and Development*, [s.l.], v. 124, n° 1, p. 9–16, 2003. ISSN: 00476374, DOI: 10.1016/S0047-6374(02)00164-1.

JANSKY, S. *et al.* **Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma.** *Nature Genetics*, [s.l.], v. 53, n° 5, p. 683–693, 2021. ISSN: 15461718, DOI: 10.1038/s41588-021-00806-1.

JOHNSEN, J. I. *et al.* **Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, [s.l.], v. 12, n° January, p. 1–11, 2019. ISSN: 16625099, DOI: 10.3389/fnmol.2019.00009.

KAMENEVA, P. *et al.* **Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin.** *Nature Genetics*, [s.l.], v. 53, n° 5, p. 694–706, 2021. ISSN: 15461718, DOI: 10.1038/s41588-021-00818-x.

KARAGIANNIS, G. S.; PAVLOU, M. P.; DIAMANDIS, E. P. **Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology.** *Molecular Oncology*, [s.l.], v. 4, n° 6, p. 496–510, 2010. ISSN: 15747891, DOI: 10.1016/j.molonc.2010.09.001.

KHOLODENKO, I. V. *et al.* **Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy.** *Journal of Immunology Research*, [s.l.], v. 2018, 2018. ISSN: 23147156, DOI: 10.1155/2018/7394268.

KILDISIUTE, G. *et al.* **Tumor to normal single-cell mRNA comparisons reveal a pan-neuroblastoma cancer cell.** *Science Advances*, [s.l.], v. 7, n° 6, p. 1–14, 2021. ISSN: 23752548, DOI: 10.1126/sciadv.abd3311.

KISHIDA, S.; KADOMATSU, K. **Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis.** *British Journal of Pharmacology*, [s.l.], v. 171, no 4, p. 896–904, 2014. ISSN: 00071188, DOI: 10.1111/bph.12442.

LALCHUNGUNGA, H. *et al.* **Genome wide DNA methylation analysis identifies novel molecular subgroups and predicts survival in neuroblastoma.** *British Journal of Cancer*, [s.l.], n° September, 2022. ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/s41416-022-01988-z.

LAMBRECHTS, D. *et al.* **Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment.** *Nature Medicine*, [s.l.], v. 24, n° 8, p. 1277–1289, 2018. ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/s41591-018-0096-5.

LAUGHNEY, A. M. *et al.* **Regenerative lineages and immune-mediated pruning in lung cancer metastasis.** *Nature Medicine*, [s.l.], v. 26, n° 2, p. 259–269, 2020. ISBN: 4159101907506, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/s41591-019-0750-6.

LEE, H. N.; JEONG, M. S.; JANG, S. B. **Molecular Characteristics of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Effects in Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 22, no 9, p. 4999, 2021. ISBN: 8251510252, ISSN: 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms22094999.

LIU, S. *et al.* **Generation of the tumor-suppressive secretome from tumor cells.** *Theranostics*, [s.l.], v. 11, n° 17, p. 8517–8534, 2021. ISSN: 18387640, DOI: 10.7150/THNO.61006.

LIU, Z. *et al.* **Loss of CASZ1 tumor suppressor linked to oncogenic subversion of neuroblastoma core regulatory circuitry.** *Cell Death and Disease*, [s.l.], v. 13, n° 10, p. 1–12, 2022. ISSN: 20414889, DOI: 10.1038/s41419-022-05314-6.

MA, X. *et al.* **SPaRTAN, a computational framework for linking cell-surface receptors to transcriptional regulators.** *bioRxiv*, [s.l.], p. 2020.12.22.423961, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.12.22.42396>.

MAKRIDAKIS, M.; VLAHOU, A. **Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers.** *Journal of Proteomics*, [s.l.], v. 73, n° 12, p. 2291–2305, 2010. ISSN: 18743919, DOI: 10.1016/j.jprot.2010.07.001.

MANGANI, D. *et al.* **The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma.** *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 130, p. 1–9, 2017. ISSN: 00062952, DOI: 10.1016/j.bcp.2016.12.011.

MARIS, J. M. *et al.* **Neuroblastoma.** *Lancet (London, England)*. v. 369,9579 (2007): 2106-20. doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0.

MARSHALL, G. M. *et al.* **The prenatal origins of cancer.** *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 14, n° 4, p. 277–289, 2014. ISSN: 14741768, DOI: 10.1038/nrc3679.

MARTINEZ-MONLEON, A. *et al.* **Amplification of CDK4 and MDM2: a detailed study of a high-risk neuroblastoma subgroup.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 1–17, 2022. ISBN: 0123456789, ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/s41598-022-16455-1.

MATTHAY, K. K. *et al.* **Neuroblastoma.** *Nature Reviews Disease Primers*, [s.l.], v. 2, 2016. ISSN: 2056676X, DOI: 10.1038/nrdp.2016.78.

MORENO-SMITH, M. *et al.* **Restoration of the molecular clock is tumor suppressive in neuroblastoma.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 1–16, 2021. ISSN: 20411723, DOI: 10.1038/s41467-021-24196-4.

MÜLLER, U. *et al.* **Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family.** *Nature Reviews Neuroscience*. v 18, 281–298 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>

O'BRIEN, R. J.; WONG, P. C. **Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease.** *Annual review of neuroscience*. v. 34 (2011): 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613

PALTRIDGE, J. L.; BELLE, L.; KHEW-GOODALL, Y. **The secretome in cancer progression.** *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, [s.l.], v. 1834, n° 11, p. 2233–2241, 2013. ISSN: 15709639, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.03.014.

PATHAK, G. P. *et al.* **RTN4 Knockdown Dysregulates the AKT Pathway, Destabilizes the Cytoskeleton, and Enhances Paclitaxel-Induced Cytotoxicity in Cancers.** *Molecular Therapy*, [s.l.], v. 26, no 8, p. 2019–2033, 2018. ISSN: 15250016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.05.026.

PFUNDSTEIN, G. *et al.* **Amyloid precursor protein (APP) and amyloid β (A β) interact with cell adhesion molecules: Implications in Alzheimer's disease and normal physiology.** *Frontiers in cell and developmental biology*. v. 10 969547. 26 Jul. 2022, doi:10.3389/fcell.2022.969547

PISTOIA, V. *et al.* **Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma.** *Frontiers in Oncology*, [s.l.], v. 3 JUN, n° June, p. 1–8, 2013. ISSN: 2234943X, DOI: 10.3389/fonc.2013.00167.

PURAM, S. V. *et al.* **Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer.** *Cell*, [s.l.], v. 171, n° 7, p. 1611-1624.e24, 2017. ISSN: 10974172, DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.044.

QIU, B.; MATTHAY, K. K. **Advancing therapy for neuroblastoma.** *Nature Reviews Clinical Oncology*, [s.l.], v. 19, n° 8, p. 515–533, 2022. ISBN: 0123456789, ISSN: 17594782, DOI: 10.1038/s41571-022-00643-z.

RACHED, J. *et al.* **L1-CAM knock-down radiosensitizes neuroblastoma IMR-32 cells by simultaneously decreasing MycN, but increasing PTEN protein expression.** *International Journal of Oncology*, [s.l.], v. 49, no 4, p. 1722–1730, 2016. ISSN: 1019-6439, DOI: 10.3892/ijo.2016.3625.

RAFFAGHELLO, L. *et al.* **Mechanisms of immune evasion of human neuroblastoma.** *Cancer Letters*, [s.l.], v. 228, n° 1–2, p. 155–161, 2005. ISSN: 03043835, DOI: 10.1016/j.canlet.2004.11.064.

RAMOS, R. **Análise de secretoma tumoral por redes de correlação.** 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo (ICT-UNIFESP), 2021.

RITENOUR, L. E. *et al.* **Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions.** *Cell and Tissue Research*, [s.l.], v. 372, n° 2, p. 287–307, 2018. ISSN: 14320878, DOI: 10.1007/s00441-018-2820-3.

ROHRER, H. **Linking human sympathoadrenal development and neuroblastoma.** *Nature Genetics*, [s.l.], v. 53, n° 5, p. 593–594, 2021. ISSN: 1061-4036, DOI: 10.1038/s41588-021-00845-8.

ROZENBLATT-ROSEN, O. *et al.* **The Human Tumor Atlas Network: Charting Tumor Transitions across Space and Time at Single-Cell Resolution.** *Cell*, [s.l.], v. 181, n° 2, p. 236–249, 2020. ISSN: 00928674, DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.053.

SACHS, N.; CLEVERS, H. **Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes.** *Current Opinion in Genetics & Development*, [s.l.], v. 24, n° 1, p. 68–73, 2014. ISSN: 0959437X, DOI: 10.1016/j.gde.2013.11.012.

SCHAAIJ-VISSER, T. B. M. *et al.* **The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context.** *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, [s.l.], v. 1834, n° 11, p. 2242–2258, 2013. ISSN: 18781454, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.029.

SENGUPTA, S. *et al.* **Mesenchymal and adrenergic cell lineage states in neuroblastoma possess distinct immunogenic phenotypes.** *Nature Cancer*, [s.l.], v. 3, n° 10, p. 1228–1246, 2022. ISSN: 26621347, DOI: 10.1038/s43018-022-00427-5.

SHARMA, A. *et al.* **Oncofetal reprogramming in tumour development and progression.** *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 22, n° 10, p. 593–602, 2022. ISBN: 0123456789, ISSN: 14741768, DOI: 10.1038/s41568-022-00497-8.

SHI, J. *et al.* **Bioinformatics analysis of neuroblastoma miRNA based on GEO data.** *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, [s.l.], v. 14, p. 849–858, 2021. ISSN: 11787066, DOI: 10.2147/PGPM.S312171.

SHI, R.; TANG, Y. Q.; MIAO, H. **Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy.** *MedComm*, [s.l.], v. 1, n° 1, p. 47–68, 2020. ISSN: 26882663, DOI: 10.1002/mco2.6.

SHIMADA, H. *et al.* **The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).** *Cancer*, [s.l.], v. 86, n° 2, p. 364–72, 1999. ISSN: 0008-543X, DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990715\)86:2%3C364::AID-CNCR21%3E3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990715)86:2%3C364::AID-CNCR21%3E3.0.CO;2-7).

SHIMADA, H. *et al.* **Histopathologic Prognostic Factors in Neuroblastic Tumors: Definition of Subtypes of Ganglioneuroblastoma and an Age-Linked Classification of Neuroblastomas.** *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, [s.l.], v. 73, n° 2, p. 405–416, 1984. ISSN: 0027-8874, DOI: 10.1093/jnci/73.2.405.

SOKOL, E.; DESAI, A. V. **The evolution of risk classification for neuroblastoma.** *Children*, [s.l.], v. 6, n° 2, p. 1–12, 2019. ISSN: 22279067, DOI: 10.3390/children6020027.

SOLDATI, R. *et al.* **Neuroblastoma triggers an immune evasive program involving galectin-1-dependent modulation of T cell and dendritic cell compartments.** *International*

- Journal of Cancer, [s.l.], v. 131, no 5, p. 1131–1141, 2012. ISSN: 00207136, DOI: 10.1002/ijc.26498.
- SPELEMAN, F. *et al.* **Neuroblastoma: A Tough Nut to Crack.** *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, [s.l.], n° 36, p. e548–e557, 2016. ISSN: 1548-8748, DOI: 10.1200/EDBK_159169.
- STELZER, G *et al.* **The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses** *Current Protocols in Bioinformatics (2016)*, 54:1.30.1 - 1.30.33.doi: 10.1002 / cpbi.5
- TANG, X. X. *et al.* **Clinical Relevance of CD4 Cytotoxic T Cells in High-Risk Neuroblastoma.** *Frontiers in Immunology*, [s.l.], v. 12, n° April, p. 1–10, 2021. ISSN: 16643224, DOI: 10.3389/fimmu.2021.650427.
- TILAN, J.; KITLINSKA, J. **Neuropeptide Y (NPY) in tumor growth and progression: Lessons learned from pediatric oncology.** *Neuropeptides*, [s.l.], v. 55, no 6, p. 55–66, 2016. ISBN: 8586542555, ISSN: 01434179, DOI: 10.1016/j.npep.2015.10.005.
- TIROSH, I. *et al.* **Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq.** *Science*, [s.l.], v. 352, n° 6282, p. 189–196, 2016. ISSN: 10959203, DOI: 10.1126/science.aad0501.
- TOMOLONIS, J. A. *et al.* **Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development.** *Cell and Tissue Research*, [s.l.], v. 372, n° 2, p. 245–262, 2017. ISSN: 0302-766X, DOI: 10.1007/s00441-017-2747-0.
- UUSKÜLA-REIMAND, L.; WILSON M.D. **Untangling the roles of TOP2A and TOP2B in transcription and cancer.** *Science advances*, vol. 8, n° 44, 2022. eadd4920. doi:10.1126/sciadv.add4920
- VANICHAPOL, T. *et al.* **Immune Escape Mechanisms and Future Prospects for Immunotherapy in Neuroblastoma.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2018, 2018. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2018/1812535.
- VERHOEVEN, B. M. *et al.* **The immune cell atlas of human neuroblastoma.** *Cell Reports Medicine*, [s.l.], v. 3, n° 6, 2022. ISSN: 26663791, DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100657.
- WANG, E. *et al.* **Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data.** *Seminars in Cancer Biology*, [s.l.], v. 30, p. 4–12, 2014. ISSN: 1044579X, DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.04.002.
- WANG, L. *et al.* **Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease.** *Translational neurodegeneration*. v. 9 10. 3. Apr. 2020, doi:10.1186/s40035-020-00189-z
- WANG, L. *et al.* **EZH2 depletion potentiates MYC degradation inhibiting neuroblastoma and small cell carcinoma tumor formation.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 13, n° 1, p. 1–16, 2022. ISBN: 4146702127, ISSN: 20411723, DOI: 10.1038/s41467-021-27609-6.
- WANG, Y. *et al.* **Bioinformatic Identification of Neuroblastoma Microenvironment-Associated Biomarkers with Prognostic Value.** *Journal of Oncology*, [s.l.], v. 2020, 2020. ISSN: 16878469, DOI: 10.1155/2020/5943014.

WERNER, H. M. J. *et al.* **Cancer systems biology: A peek into the future of patient care?** *Nature Reviews Clinical Oncology*, [s.l.], v. 11, n° 3, p. 167–176, 2014. ISSN: 17594774, DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.6.

WHITESIDE, T. L. **The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth.** *Oncogene*, [s.l.], v. 27, n° 45, p. 5904–5912, 2008. ISBN: 6176321972, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2008.271.

WIENKE, J. *et al.* **The immune landscape of neuroblastoma: Challenges and opportunities for novel therapeutic strategies in pediatric oncology.** *European Journal of Cancer*, [s.l.], v. 144, p. 123–150, 2021. ISSN: 18790852, DOI: 10.1016/j.ejca.2020.11.014.

WU, T *et al.* **clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data.** *Innovation (Cambridge (Mass.))* v. 2,3 100141. 1 Jul. 2021, doi:10.1016/j.xinn.2021.100141

WU, X. *et al.* **Amyloid precursor protein promotes the migration and invasion of breast cancer cells by regulating the MAPK signaling pathway.** *International Journal of Molecular Medicine*, [s.l.], v. 45, no 1, p. 162–174, 2019. ISSN: 1107-3756, DOI: 10.3892/ijmm.2019.4404.

XUE, H.; LU, B.; LAI, M. **The cancer secretome: A reservoir of biomarkers.** *Journal of Translational Medicine*, [s.l.], v. 6, p. 1–12, 2008. ISSN: 14795876, DOI: 10.1186/1479-5876-6-52.

YU, G. *et al.* **DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis.** *Bioinformatics (Oxford, England)* v. 31,4 (2015): 608-9. doi:10.1093/bioinformatics/btu684

ZAMAN, S. *et al.* **MAPT (Tau) expression is a biomarker for an increased rate of survival in pediatric neuroblastoma.** *Cell Cycle*, [s.l.], v. 17, no 21–22, p. 2474–2483, 2018. ISSN: 1538-4101, DOI: 10.1080/15384101.2018.1542898.

ZENG, X. *et al.* **Quantitative secretome analysis reveals the interactions between epithelia and tumor cells by in vitro modulating colon cancer microenvironment.** *Journal of Proteomics*, [s.l.], v. 89, n° 17, p. 51–70, 2013. ISSN: 18743919, DOI: 10.1016/j.jprot.2013.05.032.

ZHANG, Q. *et al.* **Collaborative ISL1/GATA3 interaction in controlling neuroblastoma oncogenic pathways overlapping with but distinct from MYCN.** *Theranostics*, [s.l.], v. 9, n° 4, p. 986–1000, 2019. ISSN: 18387640, DOI: 10.7150/thno.30199.