

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA “ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Impacto de las alteraciones genéticas en factores de neuroseñalización presentes en cáncer pediátrico: una aproximación bioinformática.

Trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller en Ciencias con mención en Biología

AUTOR

Bustamante Gonza, Liani Sairith

ASESORA

PhD. MSc. Machicado Rivero, Claudia Inés

Lima, Perú
2022

Tabla de contenido

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Pregunta de investigación.....	5
1. Estado del arte.....	6
1.1. El papel del sistema nervioso en la progresión del cáncer.....	6
1.1.1. Importancia del SN en procesos fisiológicos.....	6
1.1.2. Nervios como medio de diseminación y metástasis en diferentes tipos de cáncer.....	7
1.1.3. Sistema nervioso y microambiente tumoral.....	7
1.1.4. Alteraciones en factores de crecimiento neuronal (NTFs), moléculas de guía de axones (AGMs), receptores de neurotransmisores (NRs).	8
1.2. Cáncer pediátrico (CP).....	9
1.2.1. Incidencia y prevalencia del CP.....	9
1.2.2. Biología del CP.....	9
1.2.3. Mutaciones genéticas en las AGMs (moléculas de guía de axones) en neuroblastoma.....	10
1.3. Análisis secundario <i>in silico</i> de genomas de cáncer (TCGA).....	11
1.3.1. Correlación de la expresión génica y fenotipo mediante análisis secundarios de datos TCGA.....	11
1.3.2. Predicción <i>in silico</i> del impacto funcional de variantes genéticas, usando herramientas bioinformáticas.....	12
2. Problema de investigación.....	12
3. Estrategia de abordaje.....	14
Referencias.....	15

Resumen

El sistema nervioso (SN) está involucrado en los procesos fisiológicos como el desarrollo, el crecimiento, la reparación de los tejidos y el mantenimiento de la homeostasis de los órganos periféricos a través de los circuitos neuronales. La regulación neural también se ha asociado con el desarrollo del cáncer y la metástasis. La evidencia sugiere que el SN tiene un rol importante en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las neoplasias malignas, tanto sólidas como hematopoyéticas.

La neuroseñalización ocurre por acción de los factores neurotróficos (NTFs), moléculas de guía de axones (AGMs) y receptores de neurotransmisores (NRs). En cáncer adulto hay desregulación de dichos factores, tanto en las células cancerosas como en los nervios que rodean el tumor. Por ejemplo, se ha encontrado que la sobreexpresión de uno de los NTFs, conocido como factor de crecimiento nervioso (NGF) dentro del epitelio gástrico, promueve la carcinogénesis. Además, las AGMs parecen regular la angiogénesis del cáncer de páncreas y se ha sugerido un papel de los NRs en la progresión del cáncer de hígado.

La investigación en esta línea se ha concentrado en cáncer adulto, mas no en cáncer pediátrico (CP). En este sentido, es relevante investigar el estatus de mutación de las moléculas de neuroseñalización en CP, ya que dichas moléculas podrían cumplir un rol similar que en cáncer adulto en la progresión del CP. Existen estudios que han demostrado que la regulación de SN en tumores pediátricos sólidos y hematopoyéticos también es posible. Por ejemplo, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se encontró que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) podría ser un biomarcador en este tipo de cáncer. También, se detectaron mutaciones genéticas en las AGMs en neuroblastoma infantil.

En este estudio exploratorio *in silico* se describirá el impacto de mutaciones puntuales, presentes en CP, encontradas en NTFs, AGMs y NRs, sobre la estructura, función y *networking* de estas proteínas. También, se analizarán los niveles de expresión de los genes de interés, obtenidos en experimentos de transcriptómica en CP. El conocimiento generado podría ser útil para reconocer marcadores diagnósticos y nuevas dianas terapéuticas del CP.

Palabras clave: Factores de neuroseñalización, cáncer pediátrico, mutación, estudio *in silico*.

Abstract

The nervous system (NS) is involved in physiological processes such as development, growth, tissue repair, and maintenance of peripheral organ homeostasis through neural circuits. Neural regulation has also been associated with cancer development and metastasis. Evidence suggests that the SN plays an important role in regulating the growth and development of malignant neoplasms, both solid and hematopoietic.

Neurosignaling occurs through the action of neurotrophic factors (NTFs), axon guidance molecules (AGMs), and neurotransmitter receptors (NRs). In adult cancer there is deregulation of these factors, both in cancer cells and in the nerves surrounding the tumor. For example, overexpression of one of the NTFs, known as nerve growth factor (NGF), within the gastric epithelium has been found to promote carcinogenesis. In addition, AGMs appear to regulate pancreatic cancer angiogenesis and a role for NRs in liver cancer progression has been suggested.

Research in this line has focused on adult cancer, but not on pediatric cancer (PC). In this sense, it is relevant to investigate the mutation status of neurosignaling molecules in PC,

since these molecules could play a similar role as in adult cancer in the progression of PC. There are studies that have shown that the regulation of SN in pediatric solid and hematopoietic tumors is also possible. For example, in acute lymphoblastic leukemia (ALL), it was found that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) could be a biomarker in this type of cancer. Also, genetic mutations in AGMs were detected in childhood neuroblastoma.

In this exploratory *in silico* study, the impact of point mutations, present in CP, found in NTFs, AGMs and NRs, on the structure, function and networking of these proteins will be described. Also, the expression levels of the genes of interest, obtained in transcriptomics experiments in PC, will be analyzed. The knowledge generated could be useful to recognize diagnostic markers and new therapeutic targets for PC

Keywords: neurosignaling factors, pediatric, Cancer, mutation, *in silico* study.

Pregunta de investigación

¿Cuál es el impacto de las mutaciones en los genes codantes para factores de neuroseñalización sobre la estructura, función o networking de estas proteínas en cáncer pediátrico?

1. Estado del arte

1.1. El papel del sistema nervioso en la progresión del cáncer

1.1.1. Importancia del SN en procesos fisiológicos

En los últimos años, se ha reconocido la función del sistema nervioso (SN) en el desarrollo del cáncer y la metástasis. Se presume que las fibras nerviosas, que se encuentran presentes dentro y alrededor del tumor, liberan neurotransmisores y neuropéptidos, los cuales actuarían de manera directa sobre los receptores de las células cancerígenas. [1,2]

La expresión de estos neurotransmisores puede ser modulada por diversos factores, entre ellos, la alpha-synucleína, la cual es una proteína pequeña que mediante el efecto que tiene sobre la movilización de las vesículas sinápticas, puede regular positiva o negativamente la liberación de neurotransmisores.[3]

Así mismo, esta secreción de neurotransmisores también puede estar modulada por la innervación tumoral. Así, las células cancerosas tienen la capacidad de atraer fibras nerviosas normales, mediante la liberación de factores neurotróficos y moléculas de señalización. Por lo cual, esta interacción entre los nervios y las células tumorales influye en la metástasis, puesto que las terminaciones nerviosas secretan neurotransmisores (noradrenalina, dopamina y sustancia P, etc.) y neuropéptidos, los cuales tienen receptores expresados en las células tumorales y de esta manera favorecen su migración y metástasis. [1]

1.1.2. Nervios como medio de diseminación y metástasis en diferentes tipos de cáncer

Debido a que existe un contacto estrecho entre las células nerviosas y las células tumorales se ha sugerido que habría una sinapsis neuro-neoplásica, es decir, una modulación directa de los neurotransmisores liberados localmente sobre la actividad de las células tumorales. Por ello, estudios *in vitro* y clínicos, señalan que existe una correlación bidireccional entre los factores neurales liberados y la progresión y metástasis del cáncer. [4]

De este modo, el SN influiría en el inicio de la metástasis tumoral y expansión clonal. Ello debido a la sobreexpresión de las enzimas proteolíticas MMP (metaloproteinasas de matriz), las cuales están reguladas por factores neurales y neurotransmisores. El SN también actuaría en la evasión de la apoptosis de células nerviosas (anoikis). Esto último estaría mediado por la sobreexpresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de su receptor quinasa B relacionado con la tropomiosina (TrkB). [1]

La regulación del SN en la metástasis también desencadena la ruptura de la membrana basal a través de la liberación de neurotrofinas y neurotransmisores. Esta ruptura incluye la transición epitelio-mesenquimal (EMT), proceso importante para la progresión del tumor pues incrementa la invasividad y la resistencia a anoikis. [1]

1.1.3. Sistema nervioso y microambiente tumoral

El SN también regularía la extravasación y colonización mediadas por la acción de neuropéptidos, los cuales aumentan la permeabilidad vascular. Estos procesos promueven la angiogénesis, que es un *hallmark* del cáncer, y la evasión de la respuesta inmune (se le atribuye un papel fundamental en la metástasis al nervio vago por su función

antiinflamatoria). Por último, las terminaciones nerviosas también están presentes en el microambiente tumoral, donde también se encuentran moléculas de señalización y células estromales, mismas que favorecen la proliferación y supervivencia de las células tumorales. [1,4] Además, se ha demostrado que específicamente es el SN simpático el que inerva este microambiente y se relaciona con la progresión del cáncer de mama, de próstata y el melanoma. Mientras que los nervios parasimpáticos están relacionados con el cáncer gástrico y colorrectal. [2,5]

1.1.4. Alteraciones en factores de crecimiento neuronal (NTFs), moléculas de guía de axones (AGMs), receptores de neurotransmisores (NRs).

En relación con lo ya mencionado, tanto en cáncer de tejidos sólidos como hematopoyéticos, se han encontrado alteraciones en factores de neuroseñalización como los factores neurotróficos (NTFs), moléculas de guía de axones (AGMs) y receptores de neurotransmisores (NRs), en diferentes tipos de cáncer adulto. Los NTFs hacen referencia a un grupo de proteínas específicas del sistema nervioso, cuya función se relaciona con la diferenciación, proliferación y supervivencia neuronal durante la formación del sistema nervioso central (SNC) y periférico. [6] Los AGMs intervienen en el proceso por el cual las neuronas emiten axones para llegar a algún objetivo específico. Estas moléculas incluyen señales atractivas y repulsivas, las cuales pueden actuar localmente o a largas distancias [7]. Finalmente, los NRs son sustancias químicas que se encargan de transmitir, impulsar y equilibrar las señales entre las células nerviosas. Existen principalmente tres tipos de moléculas que se asocian con los NRs: excitadores (como la epinefrina y norepinefrina), inhibidores (por ejemplo, serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA)) y moduladores (oxitocina, sustancia P, neuropéptido Y, etc.). [8]

En cáncer gástrico adulto, se encontró una sobreexpresión del NGF (factor de crecimiento nervioso), el cual pertenece a la familia de los NTFs. En un estudio se demostró que esta alteración en la expresión de NGF, promovida por la liberación aberrante del neurotransmisor acetilcolina (ACh), se relacionó con la progresión de la carcinogénesis en el cáncer de estómago. [9]

Con respecto a las AGMs, en un estudio realizado en muestras de pacientes con cáncer pancreático metastásico, se identificaron mutaciones somáticas en los genes que codifican estas moléculas. Por lo que se sugiere que mutaciones de tipo *drivers* o conductoras de la carcinogénesis ocurrirían en AGMs, lo cual promovería la diseminación del cáncer pancreático. [10] Por último, en el caso de los NRs, un estudio señala la asociación entre la alteración en la modulación de los neurotransmisores y la progresión y gravedad de los carcinomas hepatocelulares. [11]

1.2.Cáncer pediátrico (CP)

1.2.1. Incidencia y prevalencia del CP

Si bien la investigación en cáncer adulto sugiere que los factores de neuroseñalización son importantes en la progresión y metástasis, en CP hay muy limitada información. Este último comprende las neoplasias diagnosticadas en niños o jóvenes de menos de 19 años. [12]

1.2.2. Biología del CP

Se ha sugerido que en CP el SN tiene una implicancia tanto en neoplasias sólidas como hematopoyéticas. Por ejemplo, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que es el cáncer infantil más común, se encontró que el SNC promueve la infiltración y los mecanismos de supervivencia de las células leucémicas. [13] En otro estudio se halló que el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) podría ser un biomarcador de LLA. Además, se demostró que bajos niveles de BDNF se relacionaron con el mantenimiento de las células en un estado inmaduro promoviendo así la progresión de LLA. [14]

1.2.3. Mutaciones genéticas en las AGMs (moléculas de guía de axones) en neuroblastoma

Por otro lado, se realizó un análisis genómico para detectar mutaciones genéticas en las AGMs en neuroblastoma, un tumor maligno sólido infantil que se origina a partir de células precursoras del sistema nervioso periférico. Se encontró que las aberraciones cromosómicas estructurales que se detectaron en las AGMs fueron las más frecuentes en los tumores más agresivos o avanzados, los cuales corresponden mayoritariamente a la etapa de metástasis. [15]

En síntesis, esta evidencia sugiere que la regulación neuronal en las neoplasias malignas de los niños también es posible. Pero, aún no se ha realizado una investigación que englobe una descripción completa de las mutaciones en los genes codantes de los factores de neuroseñalización (NTFs, AGMs y NRs), ni el impacto de dichas alteraciones en la estructura, función y *networking* de estas proteínas. Más aún, no se ha documentado si dichas mutaciones son conductoras del cáncer, lo cual demostraría que son relevantes en la carcinogénesis pediátrica. Por último, no se conoce si la expresión de las moléculas de neuroseñalización es aberrante en CP.

1.3.Análisis secundario *in silico* de genomas de cáncer (TCGA)

1.3.1. Correlación de la expresión génica y fenotipo mediante análisis secundarios de datos TCGA

Este conocimiento se puede obtener a través de un análisis secundario *in silico* de genomas de cáncer, información descrita en el Atlas de Genomas de Cáncer (TCGA). Es viable también la correlación de la expresión génica con el fenotipo y la predicción *in silico* del impacto funcional de variantes genéticas, usando herramientas bioinformáticas. Este tipo de investigaciones se han realizado en cáncer adulto, aunque no de forma particular en genes de neuroseñalización. Por ejemplo, en un estudio se usó la TCGA data para analizar el efecto de las mutaciones sin sentido en la región codificante del gen homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), el cual está relacionado con varios tipos de cáncer. Y se estableció una relación de estas mutaciones con la estructura y función de las proteínas codificadas por este gen. [16]

Así mismo, se realizó otro estudio usando esta data para analizar las alteraciones genéticas del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y cómo estas afectan a su expresión en cáncer de cuello uterino. [17]

Por ello, la TCGA data es un recurso útil para estudiar la genómica del cáncer e identificar los cambios en el ADN de varios tipos de cáncer. El análisis secundario de estos genomas ha permitido identificar variantes genéticas y relacionarlas a rasgos fenotípicos en distintos tipos de cáncer. El estudio del genotipo incluye mutaciones y cambios en la expresión génica, y el del fenotipo abarca variables como el tiempo de supervivencia global (se refiere al tiempo en meses que transcurre desde el inicio de la quimioterapia hasta el término del tratamiento o el fallecimiento del paciente), la

sobrevivida libre de enfermedad (tiempo en meses transcurrido desde que inicia el tratamiento hasta el evento de recaída) y algunas variables clínico-patológicas. [17]

1.3.2. Predicción *in silico* del impacto funcional de variantes genéticas, usando herramientas bioinformáticas

Así mismo, para predecir *in silico* cuál es el impacto de las mutaciones en la estructura, función y *networking* de las proteínas, se utilizan herramientas bioinformáticas. Estos alcances se basan en predicciones teóricas puestas a punto con cientos o miles de variantes genéticas y permiten estimar el daño de ciertas mutaciones sobre la estructura 3D (plegamiento, dominios proteicos, sitios catalíticos, etc.) y la función de la proteína.[18] También es posible predecir si las mutaciones desestabilizan energéticamente a la proteína lo cual podría explicar su disfunción. [19] Finalmente, si la estructura y función de estas proteínas es aberrante, su relación con otras proteínas, ya sea a nivel intracelular o dentro del microambiente tumoral, podría verse afectado. [20]

2. Problema de investigación

Actualmente, se sabe que el SN cumple un rol fundamental en el desarrollo y la progresión del cáncer. Esto es debido a que libera neurotransmisores y neuropéptidos, cuyos receptores se encuentran en las células tumorales, permitiendo así una interacción bidireccional con ellas. Además, favorece a su supervivencia, crecimiento e invasividad, por lo cual esta desregulación neural estaría relacionada a la diseminación del cáncer y metástasis de tumores sólidos y hematopoyéticos. [1,2]

Se sabe que en cáncer adulto existen alteraciones de esta regulación neural. Principalmente en factores de neuroseñalización como los factores neurotróficos (NTFs), moléculas de guía de axones (AGMs) y receptores de neurotransmisores (NRs). Estas

alteraciones se encontraron en distintos tipos de cáncer como el cáncer del estómago, pancreático y de hígado, respectivamente. [9, 10,11]

Pero si bien varios estudios se han centrado en cáncer adulto, en CP se han realizado muy pocos. La limitada evidencia en CP sugiere que el SN también tiene una implicancia en la progresión y desarrollo de neoplasias pediátricas, ya sea en tumores sólidos o hematopoyéticos. Por ejemplo, en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que es un tipo de cáncer que afecta al tejido hematopoyético, se encontró que las alteraciones de los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) están asociadas a la progresión de LLA [14]. Otro ejemplo, pero en tumores sólidos, como el neuroblastoma, en un estudio se identificó una mayor frecuencia de mutaciones estructurales en las AGMs, las cuales se relacionaron con la progresión de esta neoplasia. [15]

De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), se estima que cada año más de 250.000 niños y jóvenes menores de 15 años son diagnosticados con cáncer en todo el mundo. [12] Dado que la investigación respecto a CP y la alteración de estos factores de neuroseñalización es escasa, un estudio de análisis secundario de datos genómicos para explorar un posible rol de las moléculas de neuroseñalización en el CP resultaría muy novedoso y útil. Investigaciones como la propuesta aquí pueden identificar potenciales marcadores que en un futuro sean testeados y validados. Ello es muy relevante en el manejo y tratamiento del cáncer, enfermedad que se ha convertido en un problema de salud pública, sobre todo en los países en desarrollo donde el acceso a las instalaciones de atención médica para el tratamiento y diagnóstico del cáncer es muy limitado. [21]

Por ello, en este estudio *in silico* se hará una exploración para identificar, describir y analizar mutaciones puntuales y alteraciones en la expresión de moléculas de neuroseñalización, usando herramientas bioinformáticas. El conocimiento que se generará será muy útil para el reconocimiento de nuevos marcadores genéticos y para la

implementación de nuevas dianas terapéuticas en CP. Ello sería de gran beneficio puesto que sumado a que sus tasas de supervivencia son muy bajas, el tratamiento antitumoral en las neoplasias malignas de los niños consiste comúnmente en radiación, quimioterapia y cirugía, existiendo limitadas opciones en terapia dirigida.[12] Investigaciones que identifiquen dianas para terapias dirigidas permitirán contar con drogas anticancerosas específicas para CP en un futuro.

3. Estrategia de abordaje

- Base de datos de cáncer pediátrico: Se consultará el estatus de mutación de cada gen de interés a través del portal público de datos de St. Jude Pediatric Cancer (PeCan). Los datos provienen de seis estudios en CP realizados a nivel mundial. Contamos con datos genómicos de 5510 muestras provenientes de 5213 pacientes con cáncer, incluyendo neoplasias hematopoyéticas, tumor cerebral y otros tumores sólidos.[22]
- Estudio de genes: Se coleccionará estado de mutación, tipo de mutación (driver o pasajera), tipo de gen (oncogenes y genes supresores), si la variante es SNP, tipo de cáncer asociado. Recursos: CBioportal, Cosmic, DriverDB, Intogen. A nivel de expresión génica (consulta por Xena Browser): sub o sobreexpresión y asociación con fenotipo de interés. [23,24,25,26,27]
- Predicción funcional, expresión y networking de las proteínas: El impacto funcional será predicho con cuatro programas: Panther, Condel, REVEL y CADD. Se determinará el dominio afectado mediante Uniprot y se estimará el ddG por efecto de las mutaciones con MAESTRO Web e i-Mutant 3.0. El interactoma de los factores será representado y analizado por String.[28,29]

Referencias

1. Kuol N, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Nurgali K. Role of the nervous system in cancer metastasis. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research [Internet]. 2018 Jan 15 [cited 2021 Apr 7];37(1). Available from: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-018-0674-x>
2. Gillespie, S., Monje, M. The Neural Regulation of Cancer [Internet]. Annual Reviews. 2019 [cited 2021 Apr 6]. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-cancerbio-030419-033349>
3. Emanuele M, Chieragatti E. Mechanisms of Alpha-Synuclein Action on Neurotransmission: Cell-Autonomous and Non-Cell Autonomous Role. Biomolecules [Internet]. 2015 May 13 [cited 2021 Jun 30];5(2):865–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4496700/>
4. Ondicova K, Mravec B. Role of nervous system in cancer aetiopathogenesis. The Lancet Oncology [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Apr 7];11(6):596–601. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522385/>
5. Kamiya A, Hiyama T, Fujimura A, Yoshikawa S. Sympathetic and parasympathetic innervation in cancer: therapeutic implications. Clinical Autonomic Research [Internet]. 2020 Sep 14 [cited 2021 Apr 8]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32926324/>
6. Ramos JA, Sánchez C, Coromina M, Martínez I, et al. Factores neurotróficos y su trascendencia en el trastorno por déficit de atención/hiperactividad : Neurología.com [Internet]. Neurologia.com.

- 2019 [cited 2021 May 26]. Available from:
<https://www.neurologia.com/articulo/2013555>
7. Stoeckli ET. Understanding axon guidance: are we nearly there yet? Development [Internet]. 2018 May 14 [cited 2021 May 27];145(10). Available from:
<https://journals.biologists.com/dev/article/145/10/dev151415/48515/Understanding-axon-guidance-are-we-nearly-there>
 8. How Neurotransmitters Work and What They Do [Internet]. Verywell Mind. 2021 [cited 2021 May 27]. Available from:
<https://www.verywellmind.com/what-is-a-neurotransmitter-2795394>
 9. Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, Asfaha S, Niikura R, Tomita H, et al. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. Cancer Cell [Internet]. 2017 Jan [cited 2021 Jan 28];31(1):21–34. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610816305475>
 10. Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras M-C, Muthuswamy LB, Johns AL, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. Nature [Internet]. 2012 Oct 24 [cited 2021 Jan 28];491(7424):399–405. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23103869/>
 11. Stavropoulos I, Sarantopoulos A, Liverezas A. Does sympathetic nervous system modulate tumor progression? A narrative review of the literature. Journal of Drug Assessment [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Mar 24];9(1):106–16. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7470065/>

12. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology* [Internet]. 2017 Jun [cited 2021 Jan 26];18(6):719–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410997/>
13. Lenk L, Alsadeq A, Schewe DM. Involvement of the central nervous system in acute lymphoblastic leukemia: opinions on molecular mechanisms and clinical implications based on recent data. *Cancer and Metastasis Reviews* [Internet]. 2020 Jan 22 [cited 2021 Jan 26];39(1):173–87. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-020-09848-z>
14. Portich JP, Gil MS, dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MBC, Loss JF, et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer Biomarkers* [Internet]. 2016 Sep 26 [cited 2021 May 28];17(3):347–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27434294/>
15. Li Y, Ohira M, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, et al. Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2017 May 23 [cited 2021 Apr 6];8(34):56684–97. Available from: <https://www.ontotarget.com/article/18079/text/>
16. Khan I, Ansari IA, Singh P, Dass J FP. Prediction of functionally significant single nucleotide polymorphisms in PTEN tumor suppressor gene: An in silico approach. *Biotechnology and Applied Biochemistry*

- [Internet]. 2017 Aug 23 [cited 2021 Apr 23];64(5):657–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26800850/>
17. Heineman TE, Widman A, Kuan EC, St John M. The genetic landscape of programmed death ligand-1 (PD-L1) alterations in head and neck cancer. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* [Internet]. 2017 May 17 [cited 2021 May 28];2(3):99–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28894827/>
18. Gyulkhandanyan A, Rezaie AR, Roumenina L, Lagarde N, Fremeaux-Bacchi V, Miteva MA, et al. Analysis of protein missense alterations by combining sequence- and structure-based methods. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* [Internet]. 2020 Feb 25 [cited 2021 May 28];8(4). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mgg3.1166>
19. Dehghanpoor R, Ricks E, Hursh K, Gunderson S, Farhoodi R, Haspel N, et al. Predicting the Effect of Single and Multiple Mutations on Protein Structural Stability. *Molecules* [Internet]. 2018 Jan 27 [cited 2021 May 28];23(2):251. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382060/>
20. Chandrasekaran G, Hwang EC, Kang TW, Kwon DD, Park K, Lee J-J, et al. In silico analysis of the deleterious nsSNPs (missense) in the homeobox domain of humanHOXB13gene responsible for hereditary prostate cancer. *Chemical Biology & Drug Design* [Internet]. 2017 Mar 6 [cited 2021 Apr 23];90(2):188–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28072499/>

21. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) National Cancer Policy Board, Hewitt M, Weiner SL, Simone JV. The Epidemiology of Childhood Cancer [Internet]. Nih.gov. National Academies Press (US); 2011 [cited 2021 Jan 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK221740/>
22. PeCan | St. Jude Cloud [Internet]. Stjude.cloud. 2021 [cited 2021 May 29]. Available from: <https://pecan.stjude.cloud/>
23. cBioPortal for Cancer Genomics [Internet]. Cbioportal.org. 2016 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.cbioportal.org/>
24. Cosmic. COSMIC [Internet]. Sanger.ac.uk. COSMIC; 2021 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
25. DriverDBV3 [Internet]. Cmu.edu.tw. 2020 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <http://driverdb.tms.cmu.edu.tw/>
26. IntOGen - Cancer Mutations Browser [Internet]. Intogen.org. 2020 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://www.intogen.org/search>
27. UCSC Xena [Internet]. Xenabrowser.net. 2021 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://xenabrowser.net/datapages/>
28. MAESTROweb [Internet]. Sbg.ac.at. 2015 [cited 2021 Jun 28]. Available from: <https://pbwww.services.came.sbg.ac.at/maestro/web>
29. IGFBP7 protein (human) - STRING interaction network [Internet]. String-db.org. 2020 [cited 2021 Jun 27]. Available from: <https://string-db.org/cgi/network?taskId=b2xDw586i9Rm&sessionId=b3JeXhywkU4>

