

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA SINALIZAÇÃO POR BDNF/TRKB NA VIABILIDADE
E SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA HUMANO**

AMANDA CRISTINA GODOT THOMAZ

Orientador: Prof. Rafael Roesler

PORTO ALEGRE

Setembro/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA SINALIZAÇÃO POR BDNF/TRKB NA VIABILIDADE
E SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE MEDULOBLASTOMA HUMANO**

AMANDA CRISTINA GODOT THOMAZ

Orientador: Prof. Rafael Roesler

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

Setembro/2015

CIP - Catalogação na Publicação

Godot Thomaz, Amanda Cristina
AVALIAÇÃO DO PAPEL DA SINALIZAÇÃO POR BDNF/TRKB
NA VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DE
MEDULOBLASTOMA HUMANO / Amanda Cristina Godot
Thomaz. -- 2015.
70 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. TrkB. 2. BDNF. 3. Meduloblastoma. 4. Tumor
cerebral. 5. Câncer infantil . I. Roesler, Rafael,
orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rafael, por aceitar me orientar no mestrado, pela oportunidade única e confiança depositada em mim e pelos ensinamentos.

A Carol, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, desde a compra de materiais e reagentes até a discussão de resultados.

A todos do Laboratório de Câncer e Neurobiologia pela convivência agradável, pela amizade, pelos ensinamentos e por toda ajuda.

Ao meu namorado Victorio, que é o maior incentivador do meu trabalho e que me ajudou em todas as etapas do mestrado: Desde a minha vinda para Porto Alegre até me acompanhar ao laboratório para trabalhar nos fins de semana. Eu espero um dia ser parecida com o pesquisador brilhante que você tem se tornado, e com o qual eu tenho o privilégio de conviver e aprender todos os dias. Obrigada por tudo.

A minha família, que mesmo estando distante me apoia e me incentiva incondicionalmente, ainda que isso signifique morar longe e me ver apenas duas vezes por ano.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

Meduloblastoma é o tumor maligno intracranial mais comum em crianças. A desregulação da sinalização BDNF/TrkB tem sido associada a aumento da proliferação, invasão e resistência a quimioterapia, em diversos tipos de câncer, incluindo tumores de sistema nervoso. No entanto, seus efeitos biológicos e relevância clínica em meduloblastoma não estão compreendidos. Neste estudo foram analisados os efeitos do inibidor seletivo de TrkB, ANA-12, na viabilidade, sobrevivência e ciclo celular de linhagens de meduloblastoma humano. Este estudo demonstrou que o bloqueio seletivo de TrkB reduziu significativamente a viabilidade e sobrevivência de linhagens celulares representativas de diferentes subgrupos moleculares de meduloblastoma. Estes resultados fornecem uma base racional para investigar a inibição de TrkB como uma nova e potencial estratégia para o tratamento de meduloblastoma.

Palavras-chave TrkB • BDNF • Meduloblastoma • Tumor cerebral • Câncer infantil

ABSTRACT

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant pediatric brain tumor. Deregulation of BDNF/TrkB signaling has been associated with increased proliferative capabilities, invasiveness and chemo-resistance in several types of cancer. However, the relevance of this pathway in MB remains unknown. Here, we show that the selective TrkB inhibitor ANA-12 markedly reduced the viability and survival of human cell lines representative of different MB molecular subgroups. These findings provide a rationale to further investigate TrkB inhibition as a potential novel strategy for MB treatment.

Keywords TrkB • BDNF • Medulloblastoma • Brain tumor • Childhood cancer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégias de busca de referências bibliográficas para revisão da literatura das bases que fundamentam o objetivo deste estudo.

Tabela 2 - Caracterização molecular das linhagens de meduloblastoma humano.

Tabela 3 - Sinalização por BDNF e TrkB em tumores.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Consenso dos subgrupos moleculares de meduloblastoma.

Figura 2 - Vias de sinalização de Trks

Figura 3 - Visão geral dos efeitos celulares devido a ativação de TrkB em tumores.

Figura 4 - Estrutura da pequena molécula ANA-12.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

CDK6 – Ciclina dependente de cinase 6 (do inglês, *Cyclin-dependent kinase 6*)

CTNNB1 - Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1

ERK - Cinase reguladora de sinal extracelular (do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

GSK-3 β – Glicogênio sintase cinase 3 beta (do inglês, *Glycogen synthase kinase 3 beta*)

MB – Meduloblastoma

MYC – Myelocitomatosis

NGF – Fator de crescimento do nervo (do inglês, *Nerve Growth Factor*)

NT – Neurotrofina

NT-3 – Neurotrofina 3

NT-4 – Neurotrofina 4

NT-5 – Neurotrofina 5

OMS – Organização Mundial da Saúde

p75NTR – Receptor de neurotrofina p75 (do inglês, *Neurotrophin receptor p75*)

PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase*)

PNET – Tumor Neuroectodérmico Primário

SHH – Sonic Hedgehog

SNC – Sistema Nervoso Central

Trk – Receptor tropomiosina cinase (do inglês, *Tropomyosine kinase receptor*)

TrkA – Receptor tropomiosina cinase A (do inglês, *Tropomyosin receptor kinase A*)

TrkB – Receptor tropomiosina cinase B (do inglês, *Tropomyosin receptor kinase B*)

TrkC – Receptor tropomiosina cinase C (do inglês, *Tropomyosin receptor kinase C*)

WNT – *Wingless-related integration site*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. <i>ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES</i>	14
2.2. <i>MEDULOBLASTOMA</i>	15
2.3. <i>NEUROTROFINAS E TRKS</i>	20
2.4. <i>BDNF/TRKB EM CÂNCER</i>	22
2.5. <i>NEUROTROFINAS EM MEDULOBLASTOMA</i>	25
2.6. <i>ANA-12</i>	27
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. <i>GERAL</i>	30
4.2. <i>ESPECÍFICOS</i>	30
5. REFERÊNCIAS	31
6. ARTIGO	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8. PERSPECTIVAS	69

1. INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais são os tumores sólidos mais comuns em oncologia pediátrica e são os maiores responsáveis pela mortalidade por câncer na infância (Northcott et al. 2012a). O meduloblastoma (MB) é um câncer do sistema nervoso central (SNC) que surge principalmente durante a infância e é o tipo mais comum de tumor cerebral pediátrico, contabilizando cerca de 20% dos casos (Gajjar and Robinson 2014). O MB representa um grupo heterogêneo de tumores primários malignos, com características agressivas e tendência a formação de metástases (Gerber et al. 2014). Estudos baseados na genômica e transcriptômica de MB revelaram a existência de 4 diferentes subgrupos moleculares: WNT, Sonic hedgehog (SHH), grupo 3 e grupo 4. Estes grupos também podem ser caracterizados através do perfil epidemiológico, critérios histológicos, perfis de expressão gênica e evolução clínica (Taylor et al. 2012).

Apesar de avanços no tratamento atual de MB terem aumentado a sobrevida dos pacientes em cerca de 80% para pacientes com bom prognóstico e 60% para pacientes com mau prognóstico (Pui et al. 2011), estes indivíduos continuam apresentando efeitos a longo prazo (devido a terapias citotóxicas) como déficits cognitivos, distúrbios endocrinológicos e tumores secundários (Rusert et al. 2014). Devido a isso, as pesquisas atuais focam no desenvolvimento de terapias alvo dirigidas, que possam bloquear vias de sinalização específicas associadas a cada subtipo molecular da doença, resultando em terapias mais eficazes e menos tóxicas (DeSouza et al. 2014). Devido às células de MB expressarem ampla variedade de receptores, uma abordagem complementar seria o estudo de mecanismos moleculares de outras vias de sinalização que possam estar envolvidas na tumorigênese de MB.

As neurotrofinas (NT) são fatores de crescimento que atuam no desenvolvimento e manutenção do SNC e sistema nervoso periférico. Existem 4 principais membros da família de NT: NGF, BDNF e NT3, que se ligam preferencialmente a TrkA, TrkB e TrkC, respectivamente, além das NT4/5 que atuam via ligação em TrkB (Nakagawara 2001). Além disso, estas NT também se ligam ao receptor p75^{ntr} com baixa afinidade (Longo and Massa 2013). A

ativação anormal de TrkB está frequentemente associada com diversos tumores, inclusive tumores de SNC (Roesler et al. 2011). Logo, este receptor representa potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (Desmet and Peeper 2006).

As NT e seus respectivos receptores possuem expressão variável em MB (Krüttgen et al. 2006). Existe uma correlação entre a expressão de TrkC e prognóstico de MB, de modo que pacientes que apresentavam tumores com baixa ou nenhuma expressão de TrkC mostraram aproximadamente 5 vezes mais chance de risco de morte do que crianças com tumores expressando elevados níveis de TrkC (Segal et al. 1994). Outras NT e seus receptores já foram detectados em MB, como a sinalização BDNF/TrkB (Washiyama et al. 1996; Schmidt et al. 2010), no entanto sua expressão não apresenta valor preditivo estabelecido. Nesse contexto, inibidores seletivos de TrkB representam uma importante ferramenta para o estudo desta sinalização em MB.

Recentemente foi desenvolvido uma pequena molécula antagonista seletivo de TrkB, ANA-12, que atua por mecanismo não competitivo com BDNF (Cazorla et al. 2011). Estudos subsequentes têm demonstrado que ANA-12 também pode ser uma ferramenta útil para examinar o envolvimento da sinalização BDNF/TrkB em condições patológicas (Longo and Massa 2013). Por exemplo, esta molécula reduziu a migração de linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão (Sinkevicius et al. 2014a). Dessa forma, a utilização desta molécula no estudo de cânceres é importante para a investigação do envolvimento da sinalização BDNF/TrkB na formação e manutenção de tumores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES:

Esta revisão da literatura teve por objetivo reunir informações relacionadas à MB, NT e Trks e suas possíveis interações. A revisão também foi focalizada em abordar a utilização de ANA-12 no estudo da sinalização BDNF/TrkB em câncer.

As estratégias de busca envolveram as seguintes bases de dados: PubMed e Scopus, com buscas pelos termos “Medulloblastoma”, “Neurotrophin”, “BDNF”, “TrkB”, “ANA-12” e suas combinações, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Estratégias de busca de referências bibliográficas para revisão da literatura das bases que fundamentam o objetivo deste estudo.

Termos	Resultado da pesquisa		Artigos utilizados	
	<i>PubMed</i>	<i>Scopus</i>	<i>PubMed</i>	<i>Scopus</i>
"Medulloblastoma"	7.503	10.695	22	25
"Neurotrophin"	8.017	13.186	13	10
"BDNF"	12.904	14.294	4	4
"TrkB"	3.757	3.956	6	7
"ANA-12"	24	28	4	5
"Medulloblastoma" AND "Neurotrophins"	13	19	9	11
"Medulloblastoma" AND "BDNF"	8	6	7	4
"Medulloblastoma" AND "TrkB"	11	9	5	4
"Medulloblastoma" AND "ANA-12"	0	0	0	0
"BDNF" AND "ANA-12"	21	18	6	5
"TrkB" AND "ANA-12"	21	19	6	6
"BDNF" AND "Cancer"	313	323	4	4
"TrkB" AND "Cancer"	238	272	12	11
"ANA-12" AND "Cancer"	1	0	1	0

2.2. *MEDULOBLASTOMA*

Os MB são tumores embrionários que se enquadram na categoria de tumores de tecidos neuroepiteliais (Louis et al. 2007). Ocorrem predominantemente em crianças, sendo o tipo mais comum de tumor intracranial pediátrico, contabilizando cerca de 20% dos casos (Pui et al. 2011). A primeira descrição de MB como um tumor cerebral distinto data de 1910 e foi realizada por James Homer Wright, sugerindo a origem deste tumor a partir de células precursoras neuronais (Wright 1910). No entanto, a definição original de MB foi descrita em 1925 por Bailey e Cushing para descrever tumores que ocupam o cerebelo e que possuem características histológicas de células imaturas (Hayat 2012). A partir de 1983, os MB passaram a serem classificados como tumores neuroectodérmicos primários (Primary Neuroectodermal Tumor - PNET) (Massimino et al. 2011). Entretanto, a última classificação da OMS listou PNET e MB separadamente, de acordo com diferenças em características histopatológicas, localização no cérebro e alterações moleculares das células (Louis et al. 2007).

Cerca de 75% dos casos de MB se originam do vermis cerebelar e de estruturas adjacentes (DeSouza et al. 2014), ademais, suas células de origem são progenitores cerebelares e precursores de neurônios granulares do cerebelo (Taylor et al. 2012). Os MB são tumores raros, com comportamento agressivo e com tendência a formação de metástases (DeSouza et al. 2014). Ocorrem cerca de 1000 novos casos por ano no mundo, com uma população com média de idade de 5 anos (Hatten and Roussel 2011), e atinge mais o sexo masculino (aproximadamente 60% dos pacientes são meninos (Louis et al. 2007). Apesar de serem predominantes na infância, cerca de 30% dos MB ocorre em adultos (Rossi et al. 2008).

Uma vez que o MB não apresenta sinais e sintomas específicos, é rara a detecção precoce em crianças, por consequência o diagnóstico é predominantemente tardio. Os principais sintomas incluem dores de cabeça,

mal estar, perda de apetite, vômito e outros sinais que imitam outras patologias comuns na infância (Wilne et al. 2012). O diagnóstico depende da classificação histológica utilizada pela OMS. Os MB podem ser divididos e classificados em cinco subgrupos histológicos: MB clássico, MB desmoplásico/nodular, MB com extensa nodularidade, MB anaplásico e MB de células grandes (Louis et al. 2007). O MB clássico é o subgrupo histológico mais comum (~66%), seguido do MB desmoplásico/nodular (15%) que geralmente apresenta prognóstico clínico favorável, MB anaplásico (15%) e MB de células grandes (2-4%) que são caracterizadas por intensa atividade proliferativa e pior prognóstico clínico (DeSouza et al. 2014).

A formação e crescimento de MB têm sido associados a múltiplas disfunções moleculares (Cimmino and Scoppettuolo 2012). Utilizando critérios baseados no perfil genético e análises de transcriptoma, foram identificados distintos subgrupos moleculares que se diferenciam em características como epidemiologia, histologia, perfil genético e evolução clínica (Taylor et al. 2012). O consenso atual acerca destes grupos moleculares consiste em 4 subgrupos: grupos 1 e 2 (caracterizados pela regulação positiva de genes das vias de sinalização Wnt ou SHH respectivamente), grupo 3 e grupo 4 (Taylor et al. 2012) (figura 1).







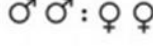
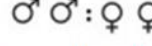
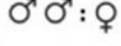
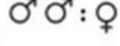



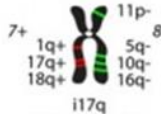
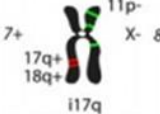
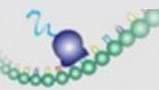
CONSENSO	SUBGRUPOS MOLECULARES DE MEDULOBLASTOMA			
	WNT	SHH	GRUPO 3	GRUPO 4
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4
Northcott (2010)	WNT	SHH	GRUPO C	GRUPO D
Kool (2010)	A	B	E	C/D
Thompson (2006)	B	C,D	E,A	A,C
EPIDEMIOLOGIA				
IDADE 				
≤4; >4 e ≤16; >16				
GÊNERO 				
CLÍNICA				
Histologia	Clássico e GCA raro	Desmoplásico/Nodular, Clássico, LCA	Clássico, LCA	Clássico, LCA
Metástase	M+ rara	M+ incomum	M+ muito frequente	M+ frequente
Prognóstico	Muito bom	≤4 anos bom, outros intermediário	Ruim	Intermediário
GENÉTICA				
				
EXPRESSÃO GÊNICA	Mutação em CTNNB1	Mutações em PTCH1/SMO/SUFU	Amplificação de MYC	Amplificação de NMYC e CDK6
	Sinalização WNT MYC +	Amplificação de GLI2 e NMYC Sinalização SHH NMYC +	Fotoreceptor gabaérgico MYC +++	Neuronal glutamatérgica Mínimo MYC/NMYC

Figura 1. Consenso dos subgrupos moleculares de meduloblastoma. M+: apresenta metástase, CGA: Grandes Células Anaplásico. Adaptado de Taylor et al. 2012 (Taylor et al. 2012).

O grupo Wnt é o subgrupo mais raro de MB, sendo também conhecido por apresentar melhor prognóstico a longo prazo, com uma taxa de sobrevivência global de 90% (Gajjar and Robinson 2014). Tumores Wnt também mostram uma distribuição etária específica, com maior incidência em crianças entre os 10 e 12 anos de idade e são quase ausentes em crianças menores de 4 anos. Wnt é uma família de receptores envolvidos na embriogênese do SNC, em MB são caracterizados por mutações no gene CTNNB1 que provocam hiperatividade desta via de sinalização, impedindo a degradação de β -catenina, gerando acúmulo desta proteína e transcrição de genes de proliferação celular. A maioria dos tumores Wnt apresenta histologia clássica (Schroeder and Gururangan 2014).

O grupo SHH ocorre em 30% dos MB, possuem prognóstico intermediário e distribuição etária dicotômica, sendo comuns em lactentes (menores de 4 anos) assim como em adultos (maiores de 16 anos) (DeSouza et al. 2014). A via SHH apresenta papel fundamental no desenvolvimento normal do cerebelo onde induz a proliferação de células precursoras neuronais, no entanto, devido a mutações germinativas em PTCH e receptores de SHH, geram sinalização aberrante de SHH aumentando os riscos de desenvolvimento de MB. Esse grupo possui características histológicas diversas (Northcott et al. 2012a).

As características moleculares dos grupos 3 e 4 foram até o presente momento pouco elucidadas. Sabe-se que o grupo 3 apresenta o pior prognósticos dos 4 grupos de MB. Esse grupo está associado à elevados níveis de expressão de MYC e são tumores frequentemente metastáticos (Gajjar and Robinson 2014). São raramente encontrados em adultos e afetam, com frequência duas vezes maior, crianças do sexo masculino. O grupo 4 é conhecido como o grupo molecular mais comum de MB (34%), estando associado a amplificação de MYCN e CDK6. Tumores desse grupo molecular costumam afetar crianças em um pico de 10 anos de idade e possuem prognóstico intermediário quando comparado ao grupo 3, porém possuem elevadas chances de desenvolvimento de metástases (Rusert et al. 2014).

Em 2015 foi realizada também a caracterização molecular de linhagens celulares de MB. Estas células apresentam características moleculares semelhantes aos tumores, pertencem principalmente aos grupos SHH e grupo 3, podem apresentar ou não p53 mutado e amplificação do oncogene MYC. A classificação molecular das linhagens celulares representou um avanço para a pesquisa básica, principalmente para investigações *in vitro* e *in vivo*, já que estas células são indispensáveis aos estudos experimentais, devido à sua natureza relativamente uniforme, facilidade de compartilhamento entre laboratórios, facilidade de expansão *in vitro*, manipulação e experimentação (Xu et al. 2015) (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização molecular de linhagens celulares de meduloblastoma humano.

Linhagem	Histologia do tumor primário	Grupo molecular	Status de p53	Amplificação de MYC	Referências
ONS-76		SHH	Normal	Não	(Bigner et al. 1990; Northcott et al. 2012b)
UW-426		SHH	Normal		(Northcott et al. 2012b)
DAOY		SHH	Mutado	Não	(Raffel et al. 1993; Weeraratne et al. 2012; Triscott et al. 2013)
UW-228	Células grandes	SHH	Mutado		(Triscott et al. 2013)
CHLA-01-MED		Grupo 4		Sim	(Erdreich-Epstein et al. 2014)
D283MED		Grupo 3	Normal	Sim	(Friedman et al. 1988; Sengupta et al. 2014)
D341MED		Grupo 3	Normal	Sim	(Friedman et al. 1988; Bigner et al. 1990)
D384MED		Grupo 3		Sim	(Sengupta et al. 2014)
D425MED		Grupo 3	Normal	Sim	(Zurawel et al. 2000)
D487				Sim	(Zurawel et al. 2000)
D458		Grupo 3		Sim	(Zurawel et al. 2000; Sengupta et al. 2014)
D556		Grupo 3		Sim	(Zindy et al. 2014; Sengupta et al. 2014)
MED8A		Grupo 3	Normal	Sim	(Northcott et al. 2012b; Zindy et al. 2014)
HD-MB03	Células grandes	Grupo 3		Sim	(Milde et al. 2012)
MB002	Células grandes	Grupo 3		Sim	(Sengupta et al. 2014)

Adaptado de Xu *et al.* 2015 (Xu et al. 2015).

Estratégias de terapias atuais para MB são baseadas em estratificação de risco e idade dos pacientes. Em todos os subgrupos de MB a cirurgia é a primeira linha de tratamento, que tem como objetivo a ressecção máxima do

tumor (Rossi et al. 2008). O tratamento pós-cirúrgico é variável, mas grupos de alto risco recebem elevadas doses de quimioterapia e radioterapia cranioespinhal (DeSouza et al. 2014). Apesar de avanços na radiação e quimioterapia oncológica terem aumentado em 70% as taxas de sobrevivência de pacientes com meduloblastoma de risco médio, os tratamentos atuais possuem toxicidade e efeitos adversos significativos, como o comprometimento cognitivo, sequelas endocrinológicas, déficits auditivos, problemas de fertilidade e tumores secundários (Finlay et al.; Gajjar et al. 2006; Gottardo et al. 2014). Dessa forma, considerando a heterogeneidade dos MB, o estudo de outras vias de sinalização envolvidas na tumorigênese de MB pode levar ao desenvolvimento de terapias alvo-dirigidas menos tóxicas e mais eficazes.

2.3. NEUROTROFINAS E TRKS

Os receptores tropomiosina cinases (Trk) são uma subfamília de receptores tirosina cinases composta por três membros: TrkA, TrkB e TrkC (Friedman and Greene 1999). Os receptores Trk são uma importante classe de receptores de neurotrofinas (NT), que são fatores de crescimento e possuem papel importante na proliferação, migração e diferenciação no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (Stoleru et al. 2013). Participam da manutenção da atividade neuronal, regeneração, estabilidade estrutural e neurogênese. Em particular, atuam como moduladores da transmissão sináptica (Thiele et al. 2009).

A sinalização de receptores Trk é ativada em resposta a ligação de uma NT específica para cada receptor. O Fator de Crescimento do Nervo (NGF) se liga ao TrkA, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e Neurotrofinas 4 e 5 (NT4/5) se ligam a TrkB, enquanto a Neurotrofina 3 (NT-3) se liga a TrkC (Soppet et al. 1991). Além disso, estas NT também se ligam com baixa afinidade ao receptor p75^{ntr}, que pertence à família dos receptores do fator de necrose tumoral, e podem contribuir aumentando a especificidade de ligação entre as NT e seus receptores específicos ou alterar a função destes receptores (Longo and Massa 2013).

As NT se apresentam na forma de homodímeros e se ligam a porção extracelular dos Trks resultando na dimerização do receptor que leva ao aumento da atividade catalítica do domínio intracelular (Soppet et al. 1991). Após a ativação e recrutamento de proteínas adaptadoras aos diferentes resíduos de tirosina poderá ocorrer ativação de três principais vias de sinalização intracelulares: (1) Cascata de sinalização MAPK que promove crescimento e diferenciação neuronal; (2) Cascata de sinalização PI3K que promove crescimento e sobrevivência neuronal; (3) Sinalização PLC- γ geralmente associada à plasticidade sináptica e neurotransmissão (Huang and Reichardt 2003) (figura 2). Após a sinalização o complexo Trk/NT é internalizado por endocitose. A ativação de Trks também pode ocorrer na ausência de neurotrofinas através de receptores acoplados a proteína G (Lee et al. 2002).

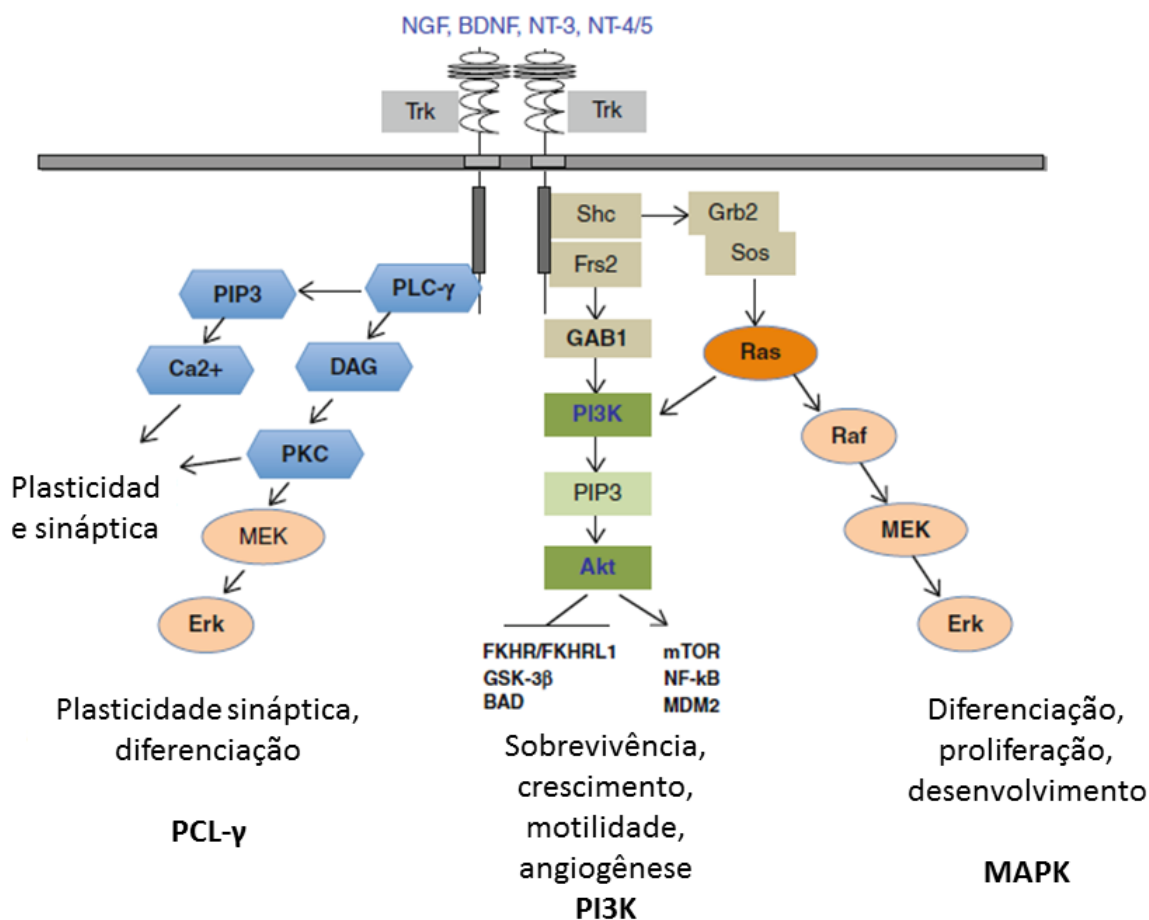


Figura 2. Vias de sinalização de Trks. Tan et al. 2014 (Tan et al. 2014).

Além de atuarem na regulação de processos fisiológicos, as NT e Trks possuem papel importante em processos patológicos e têm sido bastante estudadas em câncer (Nakagawara 2001). A participação de NT na progressão tumoral tem relação com a indução de sinais mitogênicos que estimulam o crescimento tumoral, prevenindo apoptose, regulando angiogênese e auxiliando na propagação de metástases (Desmet and Peeper 2006). A ativação de Trks pode ainda atuar estimulando ou suprimindo o crescimento tumoral, dependendo do tipo de tumor a que se relacionam (Thiele et al. 2009). Além disso, existem diversas evidências de que TrkB contribui para a tumorigênese (Roesler et al. 2011).

2.4. BDNF/TRKB EM CÂNCER

A sinalização BDNF/TrkB tem sido amplamente descrita como mediadora de carcinogênese estando relacionada a proliferação, invasão, inibição de apoptose, resistência a quimioterapia, resistência a *anoikis* (apoptose quando as células se destacam da matriz extracelular) e metástase (Desmet and Peeper 2006) (Figura 3). A ativação de TrkB, dependente ou independente de BDNF, representa uma via de transdução de sinal crítica na proliferação e sobrevivência celular (Boulle et al. 2012). Dessa forma a superexpressão de TrkB é uma característica de vários tumores, que resultam na ativação de vias de sinalização autócrina e parácrinas ligadas a promoção da sobrevivência de células cancerosas (Thiele et al. 2009). Além de contribuir com o desenvolvimento de resistência a agentes quimioterápicos, TrkB atua como um potente supressor de *anoikis* o que está associado com a aquisição de um fenótipo tumoral agressivo e metastático *in vitro* (Desmet and Peeper 2006).

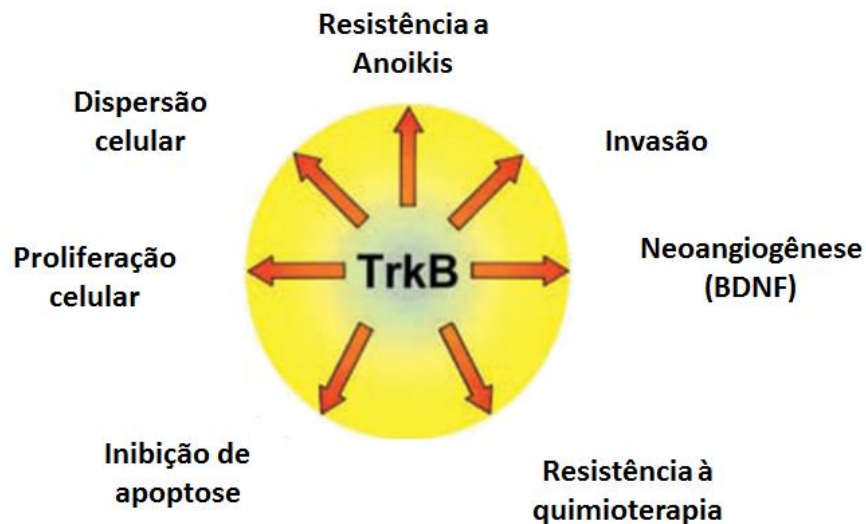


Figura 3. Visão geral dos efeitos celulares devido a ativação de TrkB em tumores. Adaptado de Desmet et al. 2006 (Desmet and Peeper 2006).

O suporte para o estudo do papel de TrkB em tumores surgiu de estudos em neuroblastoma. Nestes tumores foi estabelecido que elevados níveis de TrkA e TrkC são correlacionadas com prognóstico favorável (Brodeur et al. 2009), enquanto a expressão de TrkB é associada a características mais agressivas e pior prognóstico (Thiele et al. 2009). A sinalização BDNF/TrkB em neuroblastoma representa um sistema de regulação autócrino para manutenção do tumor, invasão e metástase (Dewitt et al. 2014). Além disso, a ativação de TrkB por BDNF promove mecanismos de resistência a quimioterapia, mediadas por PI3k e Akt (Roesler et al. 2011).

Existem alguns exemplos importantes de tumores não neuronais que apresentam superexpressão de TrkB. Níveis elevados de TrkB já foram demonstrados em adenocarcinoma de pâncreas, sendo relacionados com metástases no fígado e menor tempo de recorrência (Sclabas et al. 2005). Além disso, o aumento do potencial metastático de linhagem celular de câncer de pâncreas está correlacionado com os níveis aumentados de expressão de TrkB (Sclabas et al. 2005). Em câncer de próstata foi relatada superexpressão de TrkB em 70% de 32 casos analisados (Dionne et al. 1998). Em tumor de Wilms, a superexpressão de TrkB está associada com o aumento do risco de

mortalidade (Eggert et al. 2001). Em câncer coloretal existe a correlação entre ativação de TrkB e o aumento da proliferação e desenvolvimento de mecanismos de resistência (de Farias et al. 2012). A superexpressão de TrkB em conjunto com BDNF pode promover a sobrevivência de células de linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo (Renné et al. 2005; Pearse et al. 2005). Em adenocarcinoma de pulmão TrkB é responsável pela promoção de metástase (Sinkevicius et al. 2014). Adicionalmente, BDNF também parece contribuir com o fenótipo de pior prognóstico por atuar na promoção de angiogênese através do recrutamento de células hematopoiéticas que expressam TrkB (Kermani et al. 2005). Estas evidências sugerem que TrkB possa ser um possível alvo para terapias antitumorais (Tabela 3).

Tabela 3 - Sinalização por BDNF e TrkB em tumores.

Tipo de tumor	Neuroblastoma	Pâncreas	Coloretal	Próstata	Wilms	Pulmão
Alteração	Ativação de TrkB	↑TrkB	Ativação de TrkB	↑TrkB	↑TrkB	↑TrkB
Efeito	↑Proliferação ↑Resistência ↑ Invasão	↑Metástase	↑Proliferação ↑Resistência ↓Apoptose	↓Apoptose	↑Risco de morte	↑Metástase
Ref.	Scala, 1996 Middlemas, 1999 Nakamura, 2006	Sclabas, 2005.	Yang , 2013; De Farias, 2010.	Bronzetti, 2008; Dionne, 1998.	Eggert, 2001	Sinkevicius, 2014

As flechas indicam aumento ou diminuição da atividade ou expressão da molécula descrita.

2.5. NEUROTROFINAS EM MEDULOBLASTOMA

As neurotrofinas e seus respectivos receptores possuem expressão variável em MB. TrkC foi o primeiro receptor de NT a ser associado com aspectos clínicos de MB (Segal et al. 1994). Estudos demonstraram que TrkC desempenha um papel importante em MB, uma vez que a ativação de TrkC por seu ligante (NT-3), induziu a morte de células de cultivo primário de MB por apoptose (Kim et al. 1999). Ademais, células de MB transfectadas para superexpressarem TrkC foram incapazes de desenvolver tumor intracranial *in vivo* (Kim et al. 1999). A elevada expressão do RNA mensageiro de TrkC tem sido correlacionado com melhor prognóstico em pacientes com MB, de modo que pacientes que apresentavam tumores com baixa ou nenhuma expressão deste receptor mostraram aproximadamente 4.8 vezes mais risco de morte do que pacientes com elevados níveis de TrkC (Grotzer et al.). Apesar disso, um estudo de 2004 mostrou que, apesar de elevados níveis de RNA mensageiro de TrkC serem facilmente detectados em amostras de MB, TrkC não foi correlacionado com prognóstico clínico neste trabalho (Gajjar et al. 2004). Ainda, foi demonstrada correlação entre elevados níveis de RNA mensageiro de TrkC e o aumento da proporção de células em apoptose em decorrência ao tratamento com lomustina (Shinwari et al. 2011).

A expressão de TrkA também está associado com níveis elevados de apoptose em células de MB. NGF apresentou efeitos indutores de apoptose em linhagens de MB que expressam TrkA, com atividade dependente de Ras, mas independente de MEK/ERK (Chou et al. 2000). Outros estudos demonstraram que a expressão de TrkA está relacionada com elevado nível de apoptose em MB clássico (Ohta et al. 2006) e que TrkA também pode induzir a morte de células de MB (Daoy) por mecanismo independente de caspase, que envolve a estimulação de macropinocitose (Li et al. 2010). Além disso, o fator de transcrição Zhangfei, expresso em neurônios diferenciados, também leva à diferenciação e apoptose pela indução da expressão de TrkA em células de MB (Valderrama et al. 2009).

O receptor p75^{ntr} também vem sendo investigado e existem evidências de que este receptor é importante na biologia e desenvolvimento de MB (Bassili et al. 2010). Estudo utilizando linhagens celulares de MB com distintos perfis genéticos demonstrou que p75^{ntr} encontrava-se expresso em 88% das células e que a expressão estava correlacionada com migração e invasão celulares (Wang et al. 2010). Também foi demonstrado que p75^{ntr} encontra-se mais expresso em pacientes com MB desmoplásico, quando comparado ao MB clássico (Bühren et al. 2000). No entanto, outro estudo encontrou expressão deste receptor em apenas 12% das amostras de MB, mas demonstrou que p75^{ntr} está localizado na camada granular externa do cerebelo, conhecida por originar células de MB (Barnes et al. 2009). Além disso, células D283-MED transfectadas para expressar p75^{ntr} demonstraram que este receptor leva a estimulação de apoptose sem alterações na mitogenicidade (Küchler et al. 2011). Por fim, estudo com células tronco tumorais de MB classificaram p75^{ntr} como marcador de auto-renovação celular (Morrison et al. 2013).

Existem poucos estudos a cerca da função de BDNF e TrkB em MB. De modo similar as demais neurotrofinas, TrkB encontra-se expresso em MB e estudos prévios demonstraram que BDNF pode atuar como possível mediador reduzindo a viabilidade linhagens celulares de MB humano (Schmidt et al. 2010; Nör et al. 2011).

2.6. ANA-12

A ativação prolongada de TrkB é observada em muitas condições patológicas e podem ser a base do desenvolvimento e evolução de sintomas clínicos. Com base na participação de TrkB em câncer, o desenvolvimento de moléculas que regulem a ativação deste receptor é fundamental para compreensão do seu papel na tumorigênese. Até o momento apenas alguns inibidores seletivos de TrkB foram desenvolvidos (Boulle et al. 2012).

Análises *in silico* de modelagem de pequenas moléculas têm contribuído no desenvolvimento de novas moléculas com capacidade de interagir com TrkB (Boulle et al. 2012). Em 2011, Cazorla *et al.* sintetizou uma pequena molécula, ANA-12, que previne a ativação de TrkB através da interação com o domínio TrkB-D5 (Figura 4), e atua por mecanismo não competitivo com BDNF. Estudos *in vitro* mostraram que esta molécula é um potente antagonista seletivo de TrkB, pois demonstrou inibir processos de ativação intracelulares deste receptor sem alterar as funções de TrkA e TrkC (Cazorla et al. 2011).

Quando administrado periféricamente ANA-12 é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e se difunde preferencialmente na região do estriado, resultando em efeitos ansiolítico e antidepressivo em ratos (Cazorla et al. 2011). Também foi observada a inibição da fosforilação de TrkB em regiões do córtex e hipocampo (Cazorla et al. 2011). ANA-12 pode inibir o desenvolvimento de neuritos induzidos por BDNF em concentrações abaixo de 10 nM, com completa inibição em concentrações micromolares (Cazorla et al. 2011). É importante ressaltar que ANA-12 não pareceu promover morte neuronal, o que seria uma consequência provável da inibição da sinalização BDNF/TrkB. Apesar disso, um pequeno aumento de células apoptóticas foi observado em ratos que receberam doses elevadas de ANA-12 (Cazorla et al. 2011). Outro estudo apresentou dados de que ANA-12 utilizado nas concentrações de 0,1 e 10 μ M, não altera a sobrevivência neuronal em cultura de neurônios corticais de camundongos (Doi et al. 2013).

Estudos subsequentes têm demonstrado que ANA-12 também pode ser uma ferramenta útil para examinar o envolvimento da sinalização BDNF/TrkB em condições patológicas. Por exemplo, esta molécula reduziu a migração de

linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão (Sinkevicius et al. 2014b). Também foi identificado o aumento de apoptose em células de leucemia tratadas com ANA-12, e o aumento da fosforilação de GSK-3 β (Polakowski et al. 2014). Dessa forma, a utilização desta molécula no estudo de cânceres é importante para investigar o envolvimento da sinalização BDNF/TrkB na formação e manutenção de tumores.

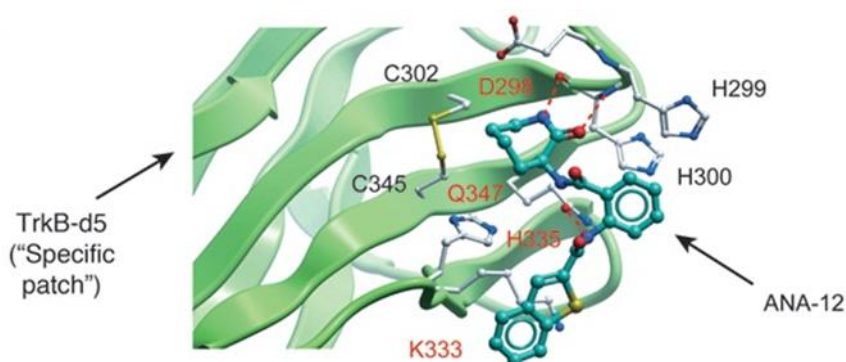


Figura 4. Estrutura da pequena molécula ANA-12. Modelo computacional do encaixe de ANA-12 (*N*-[2-[[*(*Hexahydro-2-oxo-1*H*-azepin-3-yl) amino] carbonyl] phenyl] – benzo [*b*] thiophene-2-carboxamide) a porção TrkB-D5 (fita verde). Linhas pontilhadas em vermelho representam 3 ligações de hidrogênio que ancoram ANA-12 à TrkB. Adaptado de Cazorla et al. 2011 (Cazorla et al. 2011).

3. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no tratamento de MB, 30% dos pacientes não apresenta resposta às terapias convencionais. Além disso, a terapia citotóxica causa efeitos adversos a longo prazo que geram impacto negativo na vida do paciente. Considerando a heterogeneidade e o desenvolvimento de mecanismos de resistência a terapias disponíveis, são necessários estudos de outras vias de sinalização que possam estar envolvidas na tumorigênese de MB. A expressão de TrkA e TrkC em MB estão relacionadas a componentes de regulação de apoptose e prognóstico clínico, respectivamente, o que justifica o estudo desse grupo de moléculas nestes tumores.

A sinalização BDNF/TrkB, que apresenta-se desregulada em diversos tipos de tumores e que possui relação com proliferação celular, invasão e resistência a quimioterapia, ainda é pouco elucidada em MB. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento deste complexo na sobrevivência celular destes tumores. A utilização do antagonista seletivo de TrkB, ANA-12, em estudos de câncer tem sido uma ferramenta importante para investigar o envolvimento da sinalização BDNF/TrkB em tumores. Devido o potencial desta molécula inibindo a migração e causando apoptose de células tumorais em carcinoma de pulmão e leucemia, consideramos a utilização de ANA-12 no estudo da sinalização TrkB em MB.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Avaliar o papel da sinalização BDNF/TrkB sob a viabilidade, sobrevivência e ciclo celular em células de MB humano.

4.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos ANA-12 na viabilidade celular, utilizando o corante de exclusão azul de tripan, em linhagens celulares de MB humano;
- Verificar os efeitos de ANA-12 e BDNF na formação de colônias, em linhagens celulares de MB humano.
- Testar os efeitos de ANA-12 e BDNF no ciclo celular em linhagem celular de MB humano por citometria de fluxo.
- Determinar os efeitos de ANA-12 e BDNF na viabilidade celular em linhagem de MB humano, por citometria de fluxo.
- Identificar a expressão de RNA mensageiro de BDNF e TrkB por RT-PCR em linhagem celular de MB humano.

5. REFERÊNCIAS

- Barnes M, Eberhart CG, Collins R, Tihan T (2009) Expression of p75NTR in fetal brain and medulloblastomas: evidence of a precursor cell marker and its persistence in neoplasia. *J Neurooncol* 92:193–201.
- Bassili M, Birman E, Schor NF, Saragovi HU (2010) Differential roles of Trk and p75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex vivo and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:1047–56.
- Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, et al (1990) Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50:2347–50.
- Boulle F, Kenis G, Cazorla M, et al (2012) TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. *Prog Neurobiol* 98:197–206.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al (2009) Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15:3244–50.
- Bühren J, Christoph AH, Buslei R, et al (2000) Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:229–40.
- Cazorla M, Prémont J, Mann A, et al (2011) Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* 121:1846–57.
- Chou TT, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma. *J Biol Chem* 275:565–70.
- Cimmino F, Scoppettuolo M (2012) Norcantharidin impairs medulloblastoma growth by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling.

- De Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, et al (2012) BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 425:328–32.
- Desmet CJ, Peeper DS (2006) The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63:755–9.
- DeSouza R-M, Jones BRT, Lowis SP, Kurian KM (2014) Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. *Front Oncol* 4:176.
- Dewitt J, Ochoa V, Urschitz J, et al (2014) Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene* 33:977–85.
- Dionne CA, Camoratto AM, Jani JP, et al (1998) Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Cancer Res* 4:1887–98.
- Doi Y, Takeuchi H, Horiuchi H, et al (2013) Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid β -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One* 8:e61988.
- Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, et al (2001) Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 19:689–96.
- Erdreich-Epstein A, Robison N, Ren X, et al (2014) PID1 (NYGGF4), a new growth-inhibitory gene in embryonal brain tumors and gliomas. *Clin Cancer Res* 20:827–36.
- Finlay JL, Erdreich-Epstein A, Packer RJ Progress in the treatment of childhood brain tumors: no room for complacency. *Pediatr Hematol Oncol* 24:79–84.
- Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, et al (1988) Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft

(D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. *Am J Pathol* 130:472–84.

Friedman WJ, Greene LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253:131–42.

Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, et al (2006) Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol* 7:813–20.

Gajjar A, Hernan R, Kocak M, et al (2004) Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol* 22:984–93.

Gajjar AJ, Robinson GW (2014) Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol*.

Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, et al (2014) Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev* 40:356–65.

Gottardo NG, Hansford JR, McGlade JP, et al (2014) Medulloblastoma Down Under 2013: a report from the third annual meeting of the International Medulloblastoma Working Group. *Acta Neuropathol* 127:189–201.

Grotzer MA, Janss AJ, Phillips PC, Trojanowski JQ Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin Pädiatrie* 212:196–9.

Hatten ME, Roussel MF (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* 34:134–42.

Hayat MA (ed) (2012) *Tumors of the Central Nervous System, Volume 8*. Springer Netherlands, Dordrecht

- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–42.
- Islam O, Loo TX, Heese K (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Curr Neurovasc Res* 6:42–53.
- Kermani P, Rafii D, Jin DK, et al (2005) Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 115:653–63.
- Kim JY, Sutton ME, Lu DJ, et al (1999) Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res* 59:711–9.
- Krüttgen A, Schneider I, Weis J (2006) The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Brain Pathol* 16:304–10.
- Küchler J, Hartmann W, Waha A, et al (2011) p75(NTR) induces apoptosis in medulloblastoma cells. *Int J Cancer* 128:1804–12.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, et al (2002) Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. *J Biol Chem* 277:9096–102.
- Li C, Macdonald JIS, Hryciw T, Meakin SO (2010) Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J Neurochem* 112:882–99.
- Longo FM, Massa SM (2013) Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov* 12:507–525.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109.

- Massimino M, Giangaspero F, Garrè ML, et al (2011) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 79:65–83.
- Milde T, Lodrini M, Savelyeva L, et al (2012) HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment. *J Neurooncol* 110:335–48.
- Morrison LC, McClelland R, Aiken C, et al (2013) Deconstruction of medulloblastoma cellular heterogeneity reveals differences between the most highly invasive and self-renewing phenotypes. *Neoplasia* 15:384–98.
- Nakagawara A (2001) Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169:107–14.
- Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2011) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. *Childs Nerv Syst* 27:897–901.
- Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD (2012a) The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8:340–51.
- Northcott PA, Shih DJH, Peacock J, et al (2012b) Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488:49–56.
- Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, et al (2006) TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology* 26:170–7.
- Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al (2005) A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood* 105:4429–36.
- Polakowski N, Terol M, Hoang K, et al (2014) HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. *J Virol* 88:13482–94.

- Pui C-H, Gajjar AJ, Kane JR, et al (2011) Challenging issues in pediatric oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 8:540–9.
- Raffel C, Thomas GA, Tishler DM, et al (1993) Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Neurosurgery* 33:301–5.
- Renné C, Willenbrock K, Küppers R, et al (2005) Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 105:4051–9.
- Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2011) BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 11:1473–5.
- Rossi A, Caracciolo V, Russo G, et al (2008) Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* 14:971–6.
- Rusert JM, Wu X, Eberhart CG, et al (2014) SnapShot: Medulloblastoma. *Cancer Cell* 26:940–940.
- Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2010) BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 40:303–10.
- Schroeder K, Gururangan S (2014) Molecular variants and mutations in medulloblastoma. *Pharmgenomics Pers Med* 7:43–51.
- Sclabas GM, Fujioka S, Schmidt C, et al (2005) Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 11:440–9.
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, et al (1994) Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12867–71.

- Sengupta S, Weeraratne SD, Sun H, et al (2014) $\alpha 5$ -GABAA receptors negatively regulate MYC-amplified medulloblastoma growth. *Acta Neuropathol* 127:593–603.
- Shinwari Z, Al-Hindi H, Al-Shail E, et al (2011) Response of medulloblastoma cells to vincristine and lomustine: role of TRKC, CTNNB1 and STK15. *Anticancer Res* 31:1721–33.
- Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, et al (2014a) Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10299–304.
- Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, et al (2014b) Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10299–304.
- Soppet D, Escandon E, Maragos J, et al (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65:895–903.
- Stoleru B, Popescu AM, Tache DE, et al (2013) Tropomyosin-receptor-kinases signaling in the nervous system. *Mædica* 8:43–8.
- Tan F, Thiele C, Li Z (2014) Neurotrophin signaling in cancer.
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465–72.
- Thiele CJ, Li Z, McKee AE (2009) On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15:5962–7.
- Triscott J, Lee C, Foster C, et al (2013) Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. *Cancer Res* 73:6734–44.

- Valderrama X, Rapin N, Verge VMK, Misra V (2009) Zhangfei induces the expression of the nerve growth factor receptor, trkA, in medulloblastoma cells and causes their differentiation or apoptosis. *J Neurooncol* 91:7–17.
- Wang X, Cui M, Wang L, et al (2010) Inhibition of neurotrophin receptor p75 intramembran proteolysis by gamma-secretase inhibitor reduces medulloblastoma spinal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 403:264–9.
- Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, et al (1996) Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am J Pathol* 148:929–40.
- Weeraratne SD, Amani V, Teider N, et al (2012) Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 123:539–52.
- Wilne S, Collier J, Kennedy C, et al (2012) Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours. *Eur J Pediatr* 171:87–93.
- Wright JH (1910) NEUROCYTOMA OR NEUROBLASTOMA, A KIND OF TUMOR NOT GENERALLY RECOGNIZED. *J Exp Med* 12:556–61.
- Xu J, Margol A, Asgharzadeh S, Erdreich-Epstein A (2015) Pediatric brain tumor cell lines. *J Cell Biochem* 116:218–24.
- Zindy F, Kawauchi D, Lee Y, et al (2014) Role of the miR-17~92 cluster family in cerebellar and medulloblastoma development. *Biol Open* 3:597–605.
- Zurawel RH, Allen C, Wechsler-Reya R, et al (2000) Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer* 28:77–81.

6. ARTIGO

BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells

Autores: Amanda Thomaz a, b, Mariane Jaeger a, b, Marienela Buendia a, b, Victorio Bambini-Junior c, Lauro José Gregianin a, d, Algemir Lunardi Brunetto a, e, André T. Brunetto a, e, Caroline Brunetto de Farias a, e, Rafael Roesler a, b, *

Periódico: Journal of Molecular Neuroscience.

Status: Manuscrito submetido

Journal of Molecular Neuroscience**BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells**

Amanda Thomaz a, b, Mariane Jaeger a, b, Marienela Buendia a, b, Victorio Bambini-Junior c, Lauro José Gregianin a, d, Algemir Lunardi Brunetto a, e, André T. Brunetto a, e, Caroline Brunetto de Farias a, e, Rafael Roesler a, b, *

a Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

b Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

c Laboratory of Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

d Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil e Children's Cancer Institute (ICI), 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +5551 33083183; fax: +5551 33083121.

E-mail address: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler).

Abstract Medulloblastoma (MB) is the most common malignant pediatric brain tumor. Deregulation of BDNF/TrkB signaling has been associated with increased proliferative capabilities, invasiveness and chemo-resistance in several types of cancer. However, the relevance of this pathway in MB remains unknown. Here, we show that the selective TrkB inhibitor ANA-12 markedly reduced the viability and survival of human cell lines representative of different MB molecular subgroups. These findings provide a rationale to further investigate TrkB inhibition as a potential novel strategy for MB treatment.

Keywords TrkB • Brain-derived neurotrophic factor • Medulloblastoma • Brain tumor • Childhood cancer

Introduction

Brain tumors represent the main leading cause of cancer-related death in childhood. Medulloblastoma (MB), the most common type of brain cancer afflicting children, is an embryonal solid tumor that usually arises in the cerebellum and spreads through the cerebrospinal fluid (CSF), leading to metastasis (Roussel and Hatten 2011; Brandes et al. 2015). The use of next-generation sequencing and other advanced molecular biology approaches has recently revolutionized our understanding of MB biology, leading to the current consensus that MB represents a heterogeneous group of tumors that can be divided into four distinct molecular subgroups – WNT, SHH, Group 3 and Group 4 (Taylor et al. 2012). MB subgroups display distinct cellular origins, mutations, gene expression signatures, methylation profiles as well as clinical course (Northcott et al. 2012). Despite the remarkable recent advances in the understanding of MB biology, one-third of patients still have low chance of being cured.(Rusert et al. 2014). Contemporary therapeutic approaches are highly toxic, and survivors often suffer from treatment-related neurological disabilities (Samkari et al. 2015). Therefore, the development of novel specific therapies is urgently needed.

Emerging therapeutic targets for cancer treatment include receptors for neurotrophins (NT), which are also important in normal development and function of the CNS (Nakagawara 2001). The activities of NTs are mediated by NGF, BDNF, NT-3 and NT-4/5 binding to their related tropomyosin kinase receptors TrkA, TrkB and TrkC respectively (Thiele et al. 2009). Trk activation

or mutation was detected in several types of cancer, including tumors of neuronal origin, e.g. neuroblastoma and MB (Tan et al. 2014). BDNF and TrkB overexpression or TrkB activation has been characterized in neuroblastoma (Zhang et al. 2008; Brodeur et al. 2009), lung (Sinkevicius et al. 2014), colorectal (de Farias et al. 2012), prostate (Bronzetti et al. 2008) and breast cancer (Vanhecke et al. 2011). TrkB-positive cells are linked to increased proliferative capabilities, anoikis resistance, metastasis, invasiveness and chemo-resistance (Desmet and Peeper 2006; Roesler et al. 2011).

Expression of BDNF and TrkB has been detected in both MB biopsy samples and MB cell lines (Chou et al. 1997; Schmidt et al. 2010). Previous reports have shown that BDNF alone or in combination of HDAC inhibitors, is able to decrease cell viability in MB cell lines (Schmidt et al. 2010; Nör et al. 2011). However, the biological role and clinical significance of BDNF/TrkB signaling in MB remains poorly understood yet, and previous studies have not verified whether TrkB inhibition affects MB growth.

A small molecule selective TrkB inhibitor, ANA-12, has been recently developed and has become a useful tool for examining the involvement of BDNF/TrkB signaling in physiological and pathological processes (Cazorla et al. 2011). Here, we investigated the effects of ANA-12 in human pediatric MB cell lines representative of different molecular subgroups. ANA-12 reduced cell viability and clonogenic survival as a single agent and in dose-dependent manner. These findings are the first evidence suggesting TrkB inhibition as a potential targeted therapy for MB.

Materials and Methods

Reagents

ANA-12 (N-[2-[[[Hexahydro-2-oxo-1H-azepin-3-yl] amino] carbonyl] phenyl]-benzo [b] thiophene-2-carboxamide), human recombinant BDNF, and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Annexin V-FITC was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Propidium iodide (PI), trizol, SuperScript® III Reverse Transcriptase and low DNA mass ladder were provided by Invitrogen-Life technologies (Carlsbad, CA, USA). GoTaq® Hot Start Polymerase and RQ1 RNase-Free DNase were supplied by Promega (Madison, WI, USA). Ethidium bromide was purchased from Biotium (Hayward, USA). All culture materials were obtained from Gibco-Life technologies (Grand Island, NY, USA). Cisplatin was donated by the Kaplan Oncology Institute (Porto Alegre, Brazil).

Cell Culture and Treatments

Human MB cell lines Daoy, D283, ONS-76 and UW-228 were kindly donated by Dr. Michael D. Taylor (The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada). Daoy, D283 and ONS-76 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose, while UW-228 cell was cultured in DMEM: Nutrient

Mixture F-12 (DMEM/F-12), both media supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

Cells were treated with increasing concentrations of ANA-12 (5, 20 or 30 µM) or BDNF (50 ng/ml) in complete medium for 48 hours. ANA-12 was dissolved in DMSO. The concentration of the vehicle DMSO was used as control and did not exceed 0.5% (v/v). ANA-12 concentrations were based in previous *in vitro* study using this inhibitor (Sinkevicius et al. 2014).

Cell Viability

Cell viability was assessed by trypan blue cell counting (Nör et al. 2011; Jaeger et al. 2013). Daoy, ONS-76, UW-228 and D283 cells were seeded at a density of 3×10^3 cells per well in complete medium into 96-well plates (TPP® Switzerland). After overnight culture in complete medium, cells were treated with ANA-12. After 48 hours of treatment, the medium was removed, cells were washed with PBS and 50 µl of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach cells. Cell suspension was homogenized with 0.4 % Trypan blue 1:1 and counted immediately in a hemocytometer. Experiments were performed at least four times in quadruplicates for each treatment. Cell viability was normalized to the control DMSO.

Colony Formation

For evaluation of cell survival, UW-228 and D283 cells were plated at 400 cells per well in six-well plates (NEST®, China). Cells were allowed to adhere and then were incubated overnight in complete medium at 37°C, and were then exposed to ANA-12 or BDNF. After 48 h the cells were washed with standard medium to remove ANA-12 or BDNF and cultured for another week, with the medium being changed every 2 days. Cells were then fixed with 70 % ethanol and counterstained with 0.5 % crystal violet. Colony numbers and colony size were assessed by ImageJ plugin, “ColonyArea” as previously described by Guzmán et al (Guzmán et al. 2014).

Cell Cycle

UW-228 cell was plated at 15×10^3 cells per well in 24-well plate (NEST®, China), followed by drug treatments as describe above. After 48h of treatment, both floating and attached cells were harvested, washed twice with PBS and marked with a solution containing 50 µg/ml PI, 0.1% Triton X-100 and 0,1% sodium citrate for 15 min, in the dark, at room temperature. Cells were analyzed by flow cytometer (Attune® applied biosystems). Single cells were gated using

width and area parameters. An area parameter histogram was used to determine the percentage of cells in Sub-G1/G0, G1, S and G2 phases.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA from UW-228 cell was extracted using trizol reagent, in accordance with the manufacturer's instructions, quantified in NanoDrop (Thermo Scientific), treated with DNase and reverse-transcribed with superscript® III First-Strand Synthesis supermix. BDNF, TrkB and β -actin primers used for RT-PCR amplification were designed according to the corresponding GenBank sequence and are shown in Table 1. The expression of β -actin was measured as an internal control.

PCR conditions for experiments were 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M for each primer, 0.2 dNTPs, 1.25u GoTaq® Hot Start Polymerase, and 1 μ l cDNA template. All assays were carried out in a total volume of 15 μ l using 35 cycles for amplification that consisted of 1 min at 95 °C, denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 58–60 °C, accordingly to the specific primer, for 30 s, and extension of primers at 72 °C for 45 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The products of BDNF, TrkB and β -actin were electrophoresed through 1.5 % agarose gels containing ethidium bromide and visualized with ultraviolet light. The fragments' length was confirmed using a low DNA mass ladder. For each set of PCR reactions, a negative control was included.

Statistical Analysis

Data are shown as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by tukey post-hoc test for multiple comparisons of at least three independent experiments for each experiments; *p* values under 0.05 was considered significant. Analyses were conducted using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

TrkB Inhibition Reduces MB Cell Viability

The cytotoxic activity of the selective TrkB inhibitor ANA-12 was evaluated by trypan blue cell counting assay at 48 hours under standard growth conditions (Fig. 1). Analysis with ANOVA indicated that ANA-12 produced a reduction of MB cell viability at all doses tested ($F = 2.182$, $df = 9$, $p = 0.0392$). Further analysis with Tukey tests comparing control and drug-treated cells showed that ANA-12 at 5 μM was ineffective in ONS-76, UW-228 and Daoy cells, but significantly reduce cell viability in D283 cells ($29.8 \pm 9.03\%$; $p < 0.01$). Treatment with ANA-12 at 20 μM reduced viability in all cell lines (ONS-76: $62.95 \pm 4.8\%$, $p < 0.001$; UW-228: $57.69 \pm 5.3\%$, $p < 0.001$; Daoy: $59.41 \pm 9.27\%$, $p < 0.01$; D283 $62.51 \pm 4.08\%$, $p < 0.0001$). The maximal decrease in cell viability was produced by ANA-12 at 30 μM (ONS-76: $75.43 \pm 6.9\%$, $p < 0.0001$; UW-228: $94.80 \pm 4.16\%$, $p < 0.001$; Daoy: $90.10 \pm 3.52\%$, $p < 0.001$; D283: $93.58 \pm 0.82\%$, $p < 0.0001$).

TrkB Inhibition Reduces MB Cell Survival

The effect of ANA-12 and BDNF in colony formation was analyzed in UW-228 and D283 cells (Fig. 2). ANA-12 reduced the colony formation in both UW-228 and D283 cells, during one week, after 48h of previous treatment. BDNF alone did not affect colony formation. In UW-228 cell, ANA-12 decreased colony number at 20 μM ($10.53 \pm 5.69\%$, $p < 0.01$) and 30 μM ($3.03 \pm 0.87\%$, $p <$

0.001), when compared to both control ($33.4 \pm 1.75\%$) and BDNF-treated cells ($21.26 \pm 3.91\%$), whereas colony size was not significantly affected (Fig. 2a, 2c). In D283 cell, the percentage of colony numbers was reduced only by the dose of $30 \mu\text{M}$ of ANA-12 ($3.76 \pm 2.39\%$, $p < 0.05$) when compared with both control ($22.71 \pm 5.09\%$) and BDNF-treated cells ($22.16 \pm 2.42\%$). This dose of ANA-12 also decreased colony size ($1.53 \pm 0.99\%$, $p < 0.05$) in comparison with control cells ($9.94 \pm 2.51\%$) and cells exposed to BDNF ($10.03 \pm 1.66\%$) (Fig. 2b, 2d).

TrkB Inhibition Alters the Cell Cycle

UW-228 cell was used to assess cell cycle distribution after 48h of ANA-12 treatment. ANA-12 induced sub-G1 cell cycle arrest in a dose-dependent manner (Fig. 3). Intracellular PI fluorescence intensities are presented (Fig. 3a) and the percentage of cells in the sub-G1 phase was significantly increased upon ANA-12 treatment at $30 \mu\text{M}$ (sub G1: $17.3 \pm 3.99\%$, $p < 0.001$) compared to controls (sub-G1: $1.73 \pm 0.07\%$) and BDNF-treated cells (sub-G1: $1.09 \pm 0.55\%$). In addition, the percentage of cells in the G1 phase was inhibited for ANA-12 at $30 \mu\text{M}$ (G1: $36.86 \pm 4.57\%$, $p < 0.001$) compared to controls (G1: $65.3 \pm 4.90\%$) and BDNF-treated cells (G1: $64.50 \pm 2.83\%$) (Fig. 3b). BDNF alone did not affect the cell cycle. These data suggest that ANA-12 induced cell cycle arrest in UW-228 cell.

UW-228 MB cell express TrkB and BDNF

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis confirmed that UW-228 cell express mRNA for BDNF and TrkB. Two transcripts with 130 bp and 123 bp of size, representing a fragment of TrkB and BDNF respectively, were identified (Fig. 3c). BDNF and TrkB expression for Daoy, D283 and ONS-76 MB cells were demonstrated in previous reports (Schmidt et al. 2010; Nör et al. 2011).

Discussion

Aggressive multimodal therapy in MB patients is generally associated with long term side effects, therefore, novel antitumor strategies targeting MB deregulated pathways need to be explored (Gottardo et al. 2014). Given that BDNF/TrkB signaling has been shown to promote tumor cell proliferation, survival and increase chemo-resistance in several type of cancers (Tan et al. 2014), we hypothesized that this pathway could regulate cell viability in pediatric MB. To study BDNF/TrkB signaling in MB cells, we employed a small molecule, ANA-12, that blocks TrkB selectively (Cazorla et al. 2011). We used MB cell lines that were recently characterized as representative of different MB molecular subgroups lines representative of different molecular groups of MB. Daoy, ONS-76 and UW-228 cells show features of SHH tumors, whereas D283 displays *MYC* amplification and is classified as Group 3 MB subgroup 3 (Xu et al. 2015). Our results indicate that TrkB inhibition can reduce cell viability and survival of MB cells.

The suggestion that BDNF/TrkB might be relevant in MB first came from few studies analyzing this signaling in MB. Segal *et al.* (Segal et al. 1994) found that the level of TrkB mRNA expression was not associated with extent of disease progression or patient survival. Washiyama *et al.* (Washiyama et al. 1996) evaluated 27 samples from MB patients and detected 67% of tumors expressing TrkB and 22% expressing BDNF. However, the molecular classification of MB was only recently defined (Xu et al. 2015), and the relationship between expression levels of NTs and Trk receptors in different

subgroups remains to be characterized. Expression of BDNF and TrkB was verified in the Daoy, ONS-76 and D283 cell lines (Schmidt et al. 2010), and in the present study we demonstrated that UW-228 cell likewise express mRNA for both TrkB and BDNF.

The present report is the first demonstration of a selective TrkB inhibitor antitumor effect in MB cells. Moreover, it was previously demonstrated that pan-Trk inhibitors can reduce MB xenografts growth (Evans et al. 1999). Because we did not aim to address candidate downstream signaling components possibly involved in mediating the effects, any discussion of mechanisms remain speculative at this point. Indeed, TrkB activation initiate multiple signaling cascades, including mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway, and phospholipase C-gamma (PLC- γ). All these pathways play important roles in cell proliferation, differentiation and survival, consistent with a role for TrkB in these cellular processes (Boulle et al. 2012).

The sub-G1 accumulation in cell cycle analyses may be related to apoptotic cells, which can be identified on DNA frequency histograms as cells with fractional DNA content (Kajstura et al. 2007). Previous report using leukemia cells, found apoptosis and reduction of GSK-3 β phosphorylation after ANA-12 treatment (Polakowski et al. 2014). In neurons, GSK-3 β activation opposes the effects of BDNF and specific downstream signaling of TrkB phosphorylation pathway converge to the inactivation of GSK-3 β (Phukan et al. 2010). The involvement of GSK-3 β in a variety of cellular responses is well established, including cytoskeleton regulation, cell cycle progression, apoptosis and cell adhesion (McCubrey et al. 2014). It has been also postulated that

constitutive phosphorylation of GSK-3 β , found in many tumor cells, including MB, improves cell survival and contributes to malignant transformation (Urbanska et al. 2007). However, the functional role of ANA-12 in apoptosis of MB cells remains to be determined.

A previous study found that MB cells *in vitro* treated with BDNF, had decreased viability (Schmidt et al. 2010). In the present study, we found no alterations in survival of MB cells treated with BDNF. Since BDNF can also bind to p75^{ntr} receptor, leading to activation of pro-apoptotic pathways (Tan et al. 2014), we hypothesized that the stimulation of p75^{ntr} by BDNF may explain the fact above. Thus, the biological significance of BDNF in MB needs to be further evaluated in future studies, providing a better rationale about TrkB inhibition and MB.

In summary, the present study found pronounced dose-dependent inhibitory effects of a selective TrkB inhibitor, ANA-12, on cell viability and survival in pediatric MB cell lines *in vitro*. These results provide the first evidence that selective TrkB inhibition may be a promising strategy worth further investigation in experimental MB.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8 and 303276/2013-4 to R.R.); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21 to C.B.F); the Rafael Koff Acordi Research Fund, Children's Cancer Institute (ICI); and the South American Office for Anticancer Drug Development.

References

- Boulle F, Kenis G, Cazorla M, et al (2012) TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. *Prog Neurobiol* 98:197–206.
- Brandes AA, Bartolotti M, Marucci G, et al (2015) New perspectives in the treatment of adult medulloblastoma in the era of molecular oncology. *Crit Rev Oncol Hematol* 94:348–59.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, et al (2009) Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15:3244–50.
- Bronzetti E, Artico M, Forte F, et al (2008) A possible role of BDNF in prostate cancer detection. *Oncol Rep* 19:969–74.
- Cazorla M, Prémont J, Mann A, et al (2011) Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest* 121:1846–57.
- Chou TT, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Neurotrophin signal transduction in medulloblastoma. *J Neurosci Res* 49:522–7.
- De Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, et al (2012) BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 425:328–32.
- Desmet CJ, Peeper DS (2006) The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63:755–9.
- Evans AE, Kisselbach KD, Yamashiro DJ, et al (1999) Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 5:3594–602.
- Gottardo NG, Hansford JR, McGlade JP, et al (2014) Medulloblastoma Down Under 2013: a report from the third annual meeting of the International Medulloblastoma Working Group. *Acta Neuropathol* 127:189–201.
- Guzmán C, Bagga M, Kaur A, et al (2014) ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One* 9:e92444.
- Jaeger M, Nör C, de Farias CB, et al (2013) Anti-EGFR therapy combined with neuromedin B receptor blockade induces the death of DAOY medulloblastoma cells. *Childs Nerv Syst*.
- Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z (2007) Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytom Part A* 71A:125–131.

- McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, et al (2014) GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 5:2881–911.
- Nakagawara A (2001) Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169:107–14.
- Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2011) The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. *Childs Nerv Syst* 27:897–901.
- Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD (2012) The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8:340–51.
- Phukan S, Babu VS, Kannoji A, et al (2010) GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol* 160:1–19.
- Polakowski N, Terol M, Hoang K, et al (2014) HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. *J Virol* 88:13482–94.
- Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2011) BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 11:1473–5.
- Roussel MF, Hatten ME (2011) Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol* 94:235–82.
- Rusert JM, Wu X, Eberhart CG, et al (2014) SnapShot: Medulloblastoma. *Cancer Cell* 26:940–940.
- Samkari A, White JC, Packer RJ (2015) Medulloblastoma: toward biologically based management. *Semin Pediatr Neurol* 22:6–13.
- Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, et al (2010) BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 40:303–10.
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, et al (1994) Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12867–71.
- Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, et al (2014) Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:10299–304.
- Tan F, Thiele C, Li Z (2014) Neurotrophin signaling in cancer.
- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123:465–72.

- Thiele CJ, Li Z, McKee AE (2009) On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15:5962–7.
- Urbanska K, Trojanek J, Del Valle L, et al (2007) Inhibition of IGF-I receptor in anchorage-independence attenuates GSK-3beta constitutive phosphorylation and compromises growth and survival of medulloblastoma cell lines. *Oncogene* 26:2308–17.
- Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, et al (2011) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Cancer Res* 17:1741–52.
- Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, et al (1996) Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am J Pathol* 148:929–40.
- Xu J, Margol A, Asgharzadeh S, Erdreich-Epstein A (2015) Pediatric brain tumor cell lines. *J Cell Biochem* 116:218–24.
- Zhang J-H, Li A-M, Chen S, et al (2008) [Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 10:47–50.

Table 1. Forward and reverse primers used for RT-PCR amplification

Gene	Primer sequence	PCR product size (bp)
TrKB	Forward: 5'- TGGTGCATTCCATTCACTGT-3'	130
	Reverse:5'- CGTGGTACTCCGTGTGATTG-3'	
BDNF	Forward:5'- GGCTATGTGGAGTTGGCATT-3'	123
	Reverse:5'- CTTCAGAGGCCTTCGTTTTG-3'	
β-actin	Forward:5'- GAGACCTTCAACACCCCAG 3'	190
	Reverse:5'- GCTACAGCTTCACCAGCAG 3'	

Legends for figures

Figure 1. A TrkB inhibitor dose-dependently reduces MB cell viability.

ANA-12 decreased the viability of **(a)** ONS-76, **(b)** UW-228, **(c)** Daoy, and **(d)** D283 cells. Cells were treated with increasing concentrations of ANA-12. After 48 h of drug exposure the cell viability was assessed by trypan blue counting assay. Data are expressed by mean \pm SEM percentage of control (the average value among replicates was assumed as 100%) and represent four independent experiments performed in quadruplicates. Statistically significant differences are marked by asterisks as follow: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

Figure 2. TrkB inhibition reduces colony formation in MB cells.

UW-228 and D283 cells were exposed to BDNF (50 ng/ml) or ANA-12 (5, 20 or 30 μ M) for 48 hours and subsequently maintained in standard growth medium for 7 days. Colony formation and colony size were assessed using ImageJ version 1.47n software. **(a and c)** Data are mean \pm SEM % colony number and colony size. Data represent at least three independent experiments. Statistically significant differences are marked by asterisks * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. **(b and d)** Representative images of colonies formed under the different treatment conditions.

Figure 3. TrkB induced sub-G1 cell cycle arrest in UW-228 MB cell. Cells were exposed to BDNF (50 ng/ml) or ANA-12 (5, 20 and 30 μ M) for 48 hours and subsequently the cell cycle distribution was determined by propidium iodide staining. **(a)** Representative DNA fluorescence histograms of UW-228 cell following the treatments and control (DMSO). **(b)** Data are mean \pm SEM % of cells in each cycle phase. Statistically significant differences are marked by asterisks as follow: *** $p < 0.001$. The data represents three independent experiments. **(c)** UW-228 MB cell express TrkB and BDNF. mRNA was extracted from UW-228 cells and RT-PCR was performed. A transcript with 130 bp, representing a fragment of TrkB gene, was identified. A transcript with 123 bp, representing a fragment of BDNF, was identified. B-actin was used as control.

Figure 1

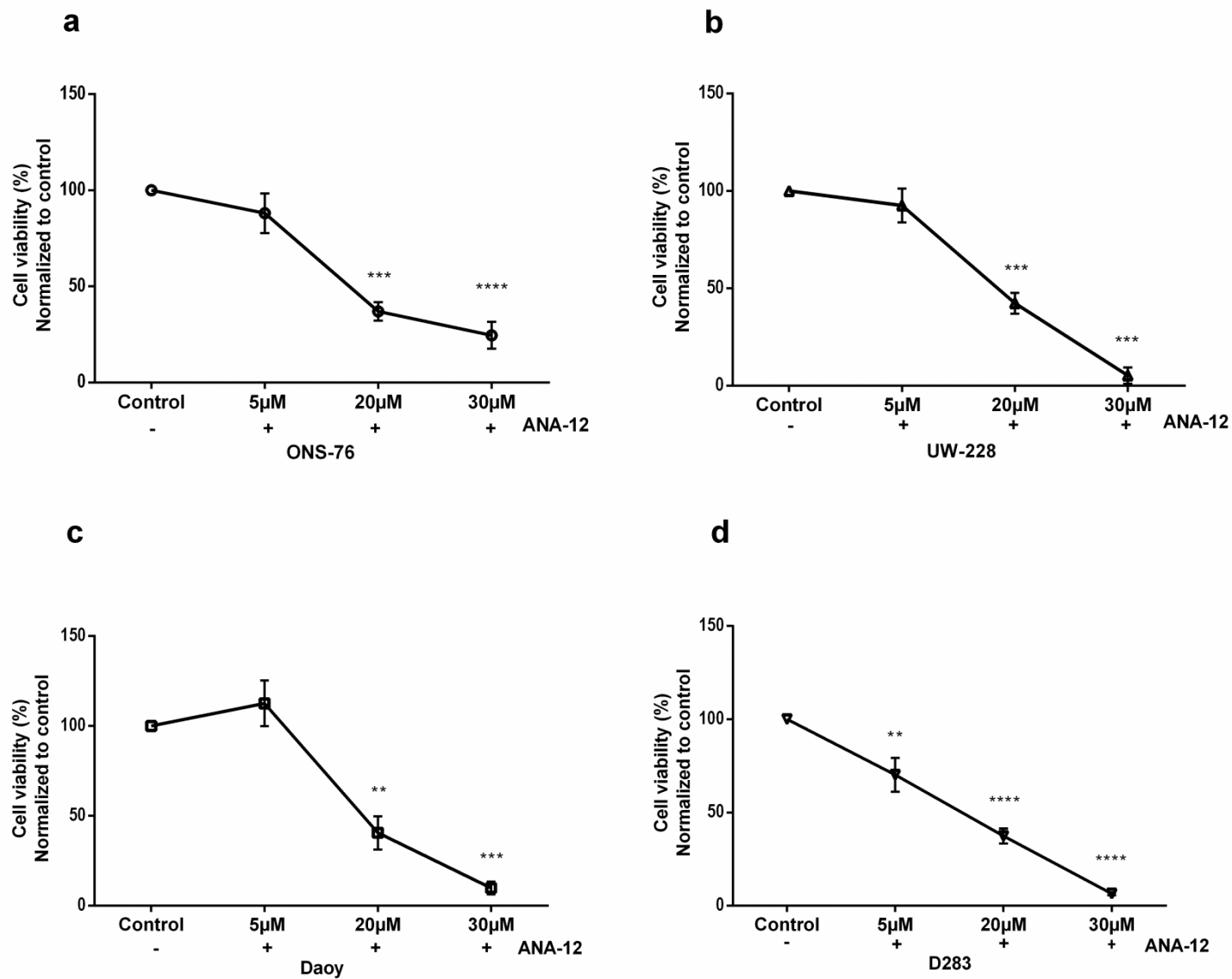


Figure 2

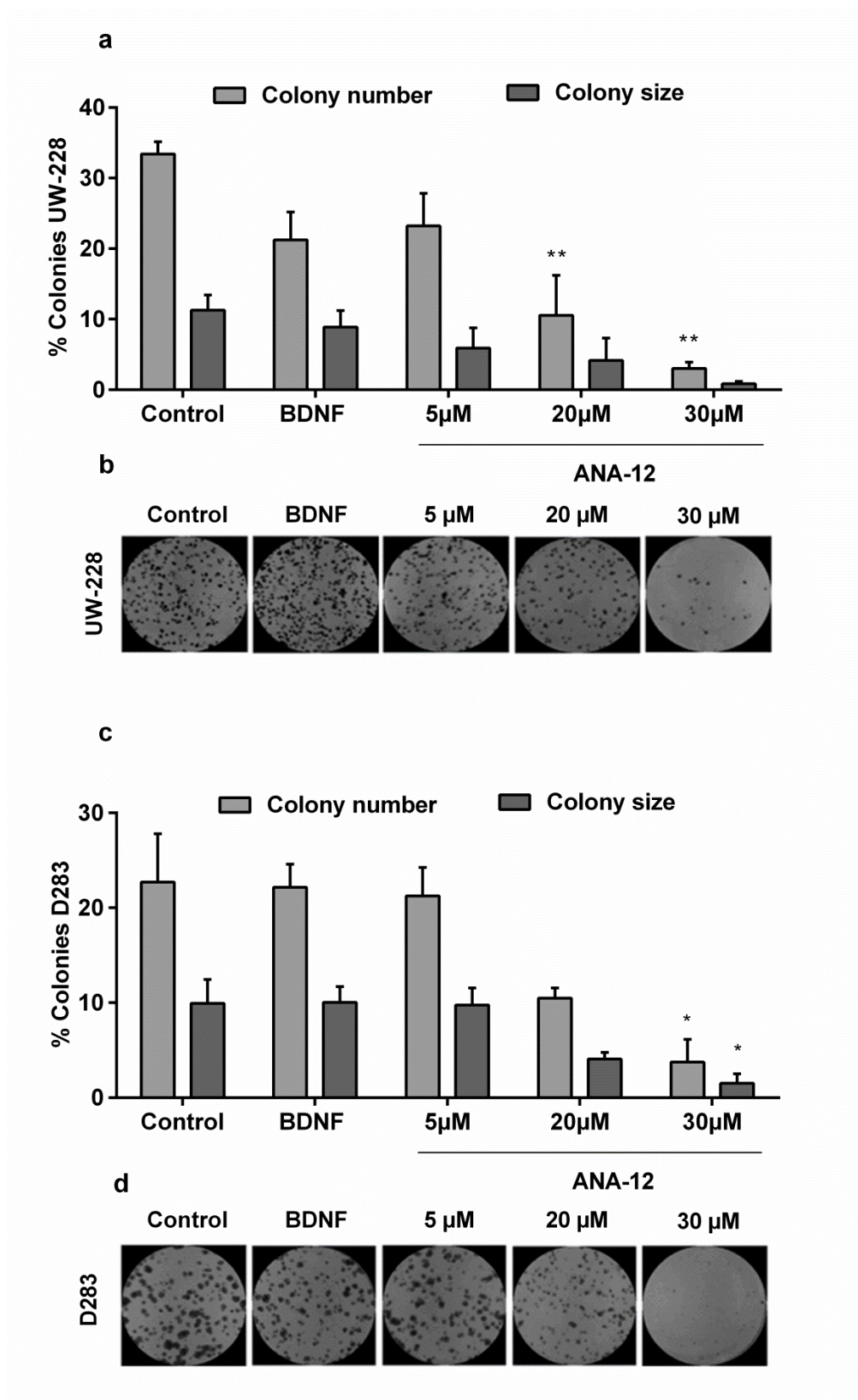
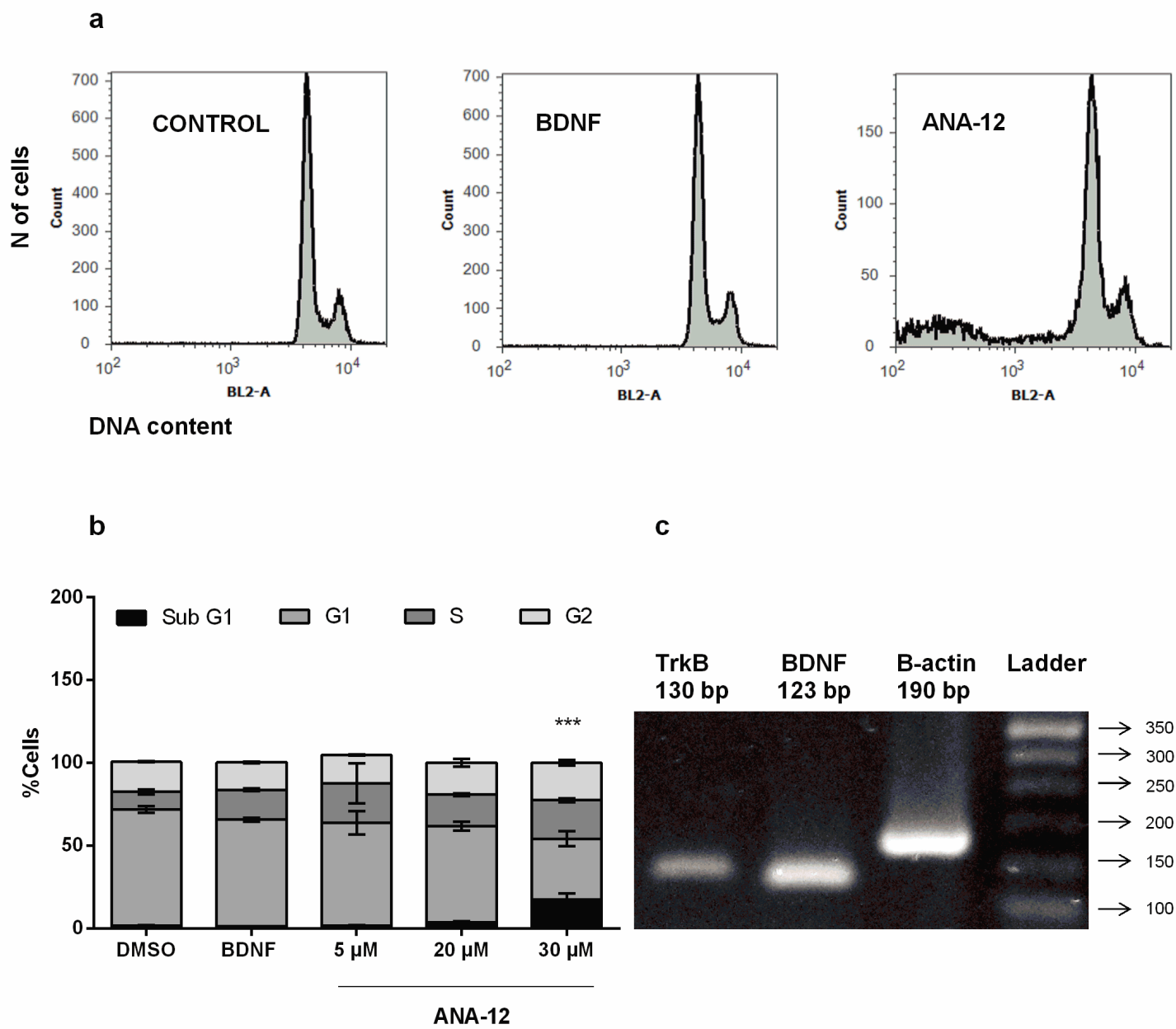


Figure 3



Journal of Molecular Neuroscience

Supplemental Information

BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells

Amanda Thomaz a, b, Mariane Jaeger a, b, Marienela Buendia a, b, Victorio Bambini-Junior c, Lauro José Gregianin a, d, Algemir Lunardi Brunetto a, e, André T. Brunetto a, e, Caroline Brunetto de Farias a, e, Rafael Roesler a, b,*

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURE

Cell Apoptosis and Necrosis

Annexin V-FITC was used to detect apoptosis and PI to cell death. UW-228 cells were plated at 15×10^3 cells per well in 24-well plate (NEST®, China), cells were treated with ANA-12 or BDNF. Cells were treated with 30 μM and 160 μM of cisplatin to use as a positive control for apoptosis or necrosis, respectively [24]. After 48 h of treatment, both floating and attached cells were harvested and washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 1 \times binding buffer, and stained with Annexin V-FITC and PI for 15 min, in the dark, at room temperature. Percentage of Annexin V-FITC-positive and PI-positive cells was determined from

the fluorescence of 10,000 events for each sample in a flow cytometer (Attune® applied biosystems).

SUPPLEMENTAL DATA

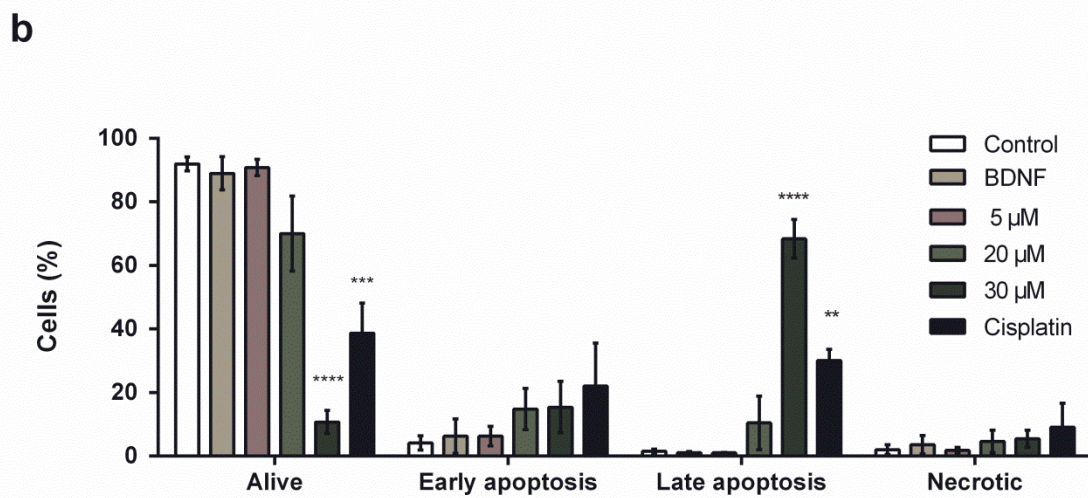
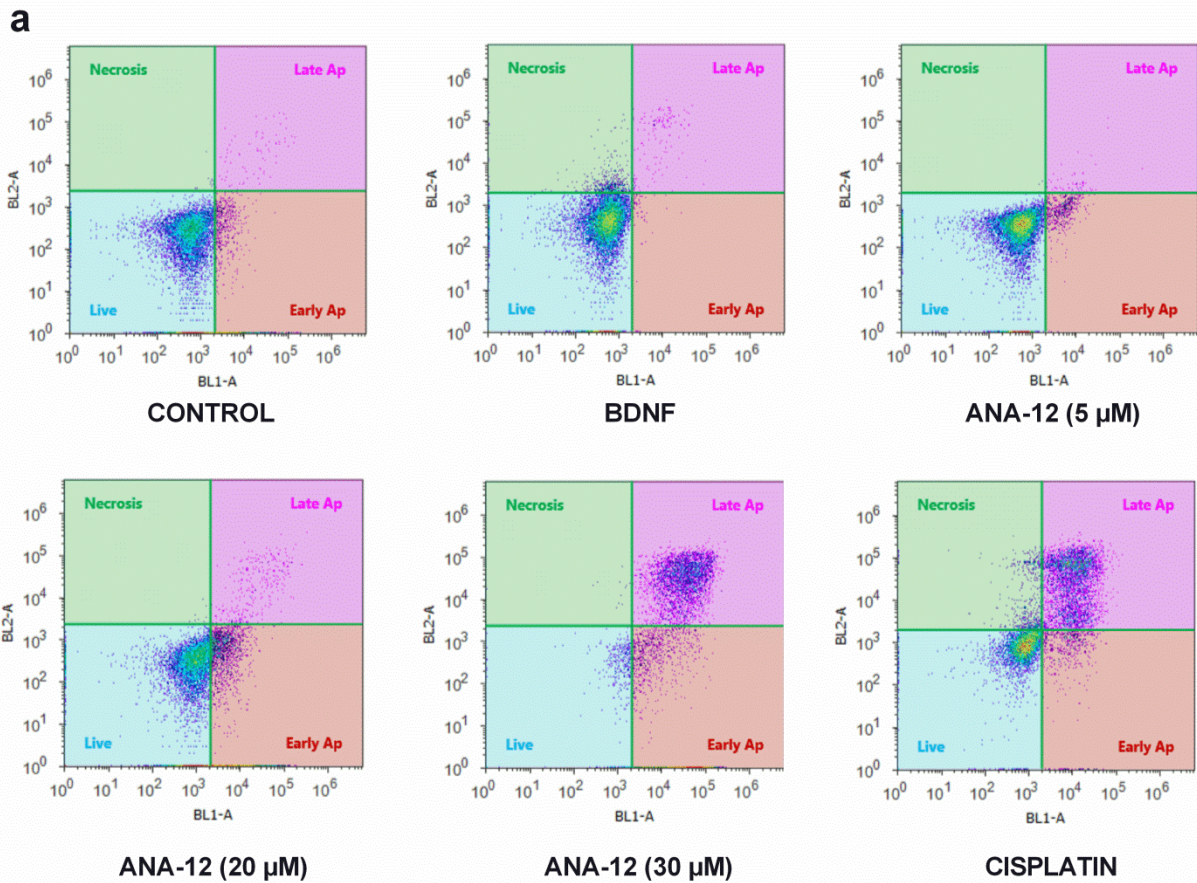


Figure S1. TrkB inhibition reduces cell viability in UW-228 cells. a Representative dot plots of flow cytometry. b Cells were exposed to BDNF (50 ng/ml), ANA-12 (5, 20 and 30 μ M) or cisplatin (30 μ M) for 48 hours and the percentage of cells alive, in early apoptosis, late apoptosis, or in necrosis was determined by an annexin assay. Data are mean \pm SEM. Statistically significant differences are marked by asterisks as follow: *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$. The data represents four independent experiments; b UW-228 MB cells express TrkB and BDNF.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a sinalização BDNF/TrkB está envolvida em processos de manutenção da viabilidade e sobrevivência celular de MB. A inibição de TrkB em células de MB tratadas com ANA-12 reduziu a viabilidade e sobrevivência celular de linhagens de dois subgrupos moleculares de MB, grupo SHH e grupo 3, sendo que o último apresenta características de tumor mais agressivo, com tendência a formação de metástases e com pior prognóstico clínico. Também observamos que ANA-12 aumentou a população sub-G1 do ciclo celular nas células UW-228, que pertencem ao grupo molecular SHH e que estas células expressam RNAm de TrkB e BDNF. Os resultados demonstraram a primeira evidência de que a inibição de TrkB por ANA-12 pode ser uma possível alternativa de tratamento em MB. Devido a isso, estudos futuros são necessários para elucidar a relação do bloqueio de TrkB com as vias de sinalização intracelulares responsáveis pela manutenção da sobrevivência e proliferação de MB.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nessa dissertação, definem um papel central da sinalização BDNF/TrkB em MB. Dados na literatura têm demonstrado que BDNF está associado à proliferação, sobrevivência e neurogênese de células tronco neurais (Islam et al. 2009). Devido à importância do estudo de células tronco tumorais em MB e considerando seu papel na progressão tumoral, se torna evidente a importância da avaliação de mecanismos envolvidos na manutenção destas células, bem como na necessidade de novas terapias que tenham como alvo as células tronco tumorais, a fim de melhorar o desfecho de pacientes de MB. Dessa forma o estudo da sinalização BDNF/TrkB em células tronco tumorais de MB e da inibição desta sinalização em modelos *in vitro* e *in vivo* poderá contribuir para o conhecimento da tumorigênese e apontar um possível alvo terapêutico em MB. Além disso, analisar os efeitos do bloqueio desta sinalização *in vivo*, em modelo animal de meduloblastoma, poderá reforçar os presentes achados sob a ótica de um modelo biológico mais complexo e similar à patologia do MB.