

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

**Sinalização por neurotrofinas em meduloblastoma:  
efeitos do bloqueio seletivo de TrkB**

**Amanda Cristina Godot Thomaz**

Orientador: Profº. Dr. Rafael Roesler

Coorientador: Profº. Dr. Michael D. Taylor

Porto Alegre, agosto de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

**Sinalização por neurotrofinas em meduloblastoma:  
efeitos do bloqueio seletivo de TrkB**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular do Centro  
de Biotecnologia da UFRGS  
como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutora  
em Ciências

**Amanda Cristina Godot Thomaz**

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Rafael Roesler

Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Michael D. Taylor

Porto Alegre, agosto de 2019

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Câncer e Neurobiologia, localizado no Centro de Pesquisas Experimentais (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e no Centro de pesquisa Rafael Koff Acordi-Instituto do Câncer Infantil (ICI). Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq números: 303276/2013-4, 409287/2016-4 e 201001/2014-4); PRONON / Ministério da Saúde, Brasil (número 25000.162.034 / 2014-21); ICI; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; número de concessão 17 / 2551-0001 071-0); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisas e Eventos (FIPE) do HCPA. Este trabalho também foi realizado em colaboração com a University of Toronto e Hospital of Sick Children, Toronto, Canadá, William Donald Nash fellowship from the Brain Tumour Foundation, Canadá, Canadian Institutes for Health Research, American Brain Tumor Association, Brain Tumour Foundation, Canadá, National Institutes of Health, Pediatric Brain Tumour Foundation, Terry Fox Research Institute, Canadian Institutes of Health Research, Cure Search Foundation, b.r.a.i.n.child, Meagan's Walk, Genome Canada, Genome BC, Ontario Institute for Cancer Research, e Canadian Cancer Society Research Institute.

Dedico está tese a todas as pesquisadoras esquecidas e relegadas a segundo plano no relato da ciência.

*“You can not get through a single day without having an impact in the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference do you want to make.”*

*Jane Goodall*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Rafael Roesler**, por ter me dado a oportunidade e pela confiança no meu trabalho, por ter me concedido liberdade de desenvolver o meu projeto de doutorado e por estar aberto às minhas ideias. Muito obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio e paciência com as minhas questões pessoais. Eu fico feliz em ter feito parte da história do Laboratório de Câncer e Neurobiologia por esses 6 anos, e com certeza eu me tornei melhor pessoa e pesquisadora durante esse tempo devido à convivência com o grupo.

Ao meu coorientador, Dr. **Michael D. Taylor**, por ter aceitado colaborar nesta tese e por ser um grande exemplo de pesquisador que vem revolucionando a área de estudo de meduloblastomas.

Aos membros da banca examinadora, Guido Lenz, Timothy James Snape e Marco Antônio Stefani, pela enriquecedora discussão e sugestões para o aprimoramento desta tese.

A todos professores e funcionários do **PPG Biologia Celular e Molecular da UFRGS**; aos membros da comissão de acompanhamento, Prof. Dr. **Alexandre José Macedo** e Dra. **Caroline Brunetto de Farias**, à **CAPES**, pela bolsa de doutorado, e às demais agências financiadoras que proveram recursos para a realização desta tese.

Ao **Centro de Pesquisas Experimentais do HCPA**, que fornece excelente estrutura para o desenvolvimento de pesquisas de alta qualidade, especialmente a **UAMP**, **UEA** e **UPE**, onde eu realizei muitos dos experimentos que compõe este trabalho e pude contar com expertise e ajuda dos funcionários e pesquisadores.

A todos os colaboradores do trabalho, em especial à **Bárbara** e **Kelly**, pela imensa contribuição através de discussões e experimentos, pela convivência, risadas, almoços, cafezinhos e amizade.

Aos colegas de laboratório: **Livia Fratini**, **Bruno Tonson**, **Mariane Jaeger**, **Duda Battistella**, **Natália Freire**, **Carolina Zinn** e **Rafa Santos**; pela compreensão com a minha rotina de experimentos, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela convivência. Também agradeço a todos que passaram pelo lab e que hoje já não estão mais no grupo.

Ao **Victorio**, meu amor e companheiro de vida, com quem eu tenho o privilégio de conviver e aprender todos os dias. Obrigada por ter me apoiado nessa jornada de fazer doutorado, mesmo que isso tenha nos custado viver em continentes separados por bastante tempo. Obrigada também por me fazer acreditar no meu potencial e por ser uma fonte de inspiração diária profissionalmente.

A minha família que entendeu que fazer doutorado era um sonho e que abraçou esse sonho comigo: Minha mãe **Luzinete**, meu irmão **Artur**, minha avó **Olinda** e minha sogra **Iara**.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	17
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	19
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	20
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1. Tumores pediátricos.....	21
1.2. Tumores pediátricos do SNC.....	24
1.3. Meduloblastomas.....	27
1.3.1. Características gerais.....	27
1.3.2. Epidemiologia e fatores de risco.....	28
1.3.3. Subgrupos moleculares.....	29
• Subgrupo WNT.....	30
a. Características clínicas.....	30
b. Biologia molecular.....	31
c. Modelos de estudo.....	33
• Subgrupo SHH.....	34
a. Características clínicas.....	34
b. Biologia molecular.....	36
c. Modelos de estudo.....	37
• Grupo 3.....	39
a. Características clínicas.....	39
b. Biologia molecular.....	41
c. Modelos de estudo.....	43
• Grupo 4.....	45
a. Características clínicas.....	45
b. Biologia molecular.....	47
c. Modelos de estudo.....	48
1.3.4. Diagnóstico, estratificação de risco e tratamento.....	51
1.3.5. Avanços recentes e perspectivas terapêuticas.....	54
1.4. Neurotrofinas e seus receptores.....	55
1.5. Vias de sinalização moduladas por neurotrofinas.....	62
1.5.1. Sinalização MAPK.....	63
1.5.2. Sinalização PI3K.....	64
1.5.3. Sinalização PLC- $\gamma$ .....	65
1.5.4. Sinalização NF-KB.....	65
1.5.5. Sinalização JNK.....	65
1.6. Neurotrofinas e seus receptores em câncer.....	66
1.6.1. Fusões gênicas em NTRK.....	67
1.6.2. NGF/TrkA.....	68

1.6.3. BDNF/TrkB.....	69
1.6.4. NT-3/TrkC.....	71
1.6.5. P75NTR.....	73
1.7. Neurotrofinas e seus receptores em MB.....	74
1.8. Inibição de Trks como estratégia terapêutica em câncer.....	75
1.9. Inibidores seletivos de TrkB: ANA-12.....	77
2. <b>HIPÓTESES</b> .....	79
3. <b>OBJETIVOS</b> .....	80
4. <b>CAPÍTULOS</b> .....	82
4.1. Capítulo 1.....	83
4.2. Capítulo 2.....	94
5. <b>DISCUSSÃO</b> .....	162
6. <b>CONCLUSÕES</b> .....	175
7. <b>QUESTÕES EM ABERTO E PERSPECTIVAS</b> .....	178
8. <b>REFERÊNCIAS</b> .....	180
9. <b>CURRICULUM VITAE</b> .....	201



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AKT</b>	Proteína cinase B (do inglês; <i>Protein kinase B</i> )
<b>ALK</b>	Cinase de linfoma anaplásico (do inglês; <i>Anaplastic lymphoma kinase</i> )
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>APC</b>	Polipose adenomatosa coli (do inglês; <i>Adenomatous polyposis coli</i> )
<b>ASK1</b>	Cinase reguladora de sinais de apoptose 1 (do inglês; <i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i> )
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATOH1</b>	Atonal bHLH transcription factor 1 (ATOH1)
<b>Axina</b>	Axis inhibition protein
<b>BAD</b>	Proteína promotora de morte associada a BCL-2 (do inglês; <i>BCL-2-associated death promoter protein</i> )
<b>BAX</b>	Proteína X associada a BCL-2 (do inglês; <i>BCL-2-associated X protein</i> )
<b>BCL-2</b>	Linfoma de célula B-2 (do inglês; <i>B-cell lymphoma 2</i> )
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês; <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>BMI1</b>	Proteína oncogênica do complexo policombo BMI1 (do inglês; <i>BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger</i> )
<b>BMP5</b>	Proteína morfogênica óssea 5 (do inglês; <i>Bone morphogenetic protein 5</i> )
<b>BRCA2</b>	Proteína de susceptibilidade ao câncer de mama 2 (do inglês; <i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i> )
<b>BRMS1L</b>	Repressor transcricional similar ao supressor de metástase de câncer de mama (do inglês; <i>Breast cancer metastasis-suppressor 1 like transcriptional repressor</i> )
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CCND1</b>	Ciclina D1 (do inglês; <i>Cyclin D1</i> )
<b>CD133</b>	Prominina 1 (do inglês; <i>Prominin 1 [PROM1]</i> )

<b>CDK4</b>	Cinase dependente de ciclina 4 (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase 4</i> )
<b>CDK6</b>	Cinase dependente de ciclina 6 (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase 6</i> )
<b>CDKN1A</b>	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A, p21</i> )
<b>CDKN2A</b>	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A, IKNC4</i> )
<b>CDKN2C</b>	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2C (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2C</i> )
<b>CDKN1B</b>	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1B (do inglês; <i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1b [p27]</i> )
<b>CHRM2</b>	Receptor colinérgico muscarínico 2 (do inglês; <i>Cholinergic receptor muscarinic 2</i> )
<b>CNTLN</b>	Centlein
<b>COL9A3</b>	Cadeia de colágeno tipo IX alfa 3 (do inglês; <i>Collagen type IX alpha 3 chain</i> )
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento responsivo CAMP 1 (do inglês; <i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i> )
<b>CTDNEP1</b>	Fosfatase de envelope nuclear CTD 1 (do inglês; <i>CTD nuclear envelope phosphatase 1</i> )
<b>CTNNB1</b>	Beta catenina 1 (do inglês; <i>Catenin beta 1</i> )
<b>DAG</b>	D-1,2-Diacilglicerol
<b>DAPK2</b>	Proteína cinase associada à morte 2 (do inglês; <i>Death Associated Protein Kinase 2</i> )
<b>DBSCAN</b>	Density-based clustering of applications with noise
<b>DDX31</b>	Helicase de RNA dependente de ATP (do inglês; <i>Probable ATP-dependent RNA helicase</i> )
<b>DDX3X</b>	Helicase DEAD-box 3 ligado ao X (do inglês; <i>DEAD-box helicase 3 X-linked</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DSH</b>	Dishevelled

<b>E2F</b>	Fator de transcrição E2F (do inglês; <i>E2F transcription factor</i> )
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico (do inglês; <i>Epidermal growth factor</i> )
<b>EGFR</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês; <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ELK1</b> <i>ELK1</i> )	Fator de transcrição ETS ELK1 (do inglês; <i>ETS transcription factor ELK1</i> )
<b>ERK1/2</b>	Cinase reguladora de sinal extracelular 1/2 (do inglês; <i>Extracellular regulated kinase 1/2</i> )
<b>ESYT2</b>	Sinaptotagmina estendida 2 (do inglês; <i>Extended synaptotagmin 2</i> )
<b>ETV6</b>	ETS variante 6 (do inglês; <i>ETS variant 6</i> )
<b>EYA1</b>	Coativador de transcrição EYA e fosfatase 1 (do inglês; <i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1</i> )
<b>EZH2</b>	Reforçador do complexo repressivo policombo 2 (do inglês; <i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i> )
<b>FAM122B</b>	Família com similaridade de seqüência 122B (do inglês; <i>Family with sequence similarity 122B</i> )
<b>Fas</b>	Receptor de morte Fas (do inglês; <i>Fas cell surface death receptor</i> )
<b>FGD6</b>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico (do inglês; <i>Fibroblast growth factor</i> )
<b>FGFR</b>	Receptor do fator de crescimento fibroblástico (do inglês; <i>Fibroblast growth factor receptor</i> )
<b>FOXP1</b>	Forkhead box G1
<b>FOXO1</b>	Forkhead box O1
<b>Frs2</b>	Substrato do receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2 (do inglês; <i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i> )
<b>FZD</b>	Receptor Frizzled (do inglês; <i>Frizzled class receptor</i> )
<b>Gab1</b>	Proteína de ligação 1 associada a GRB2 (do inglês; <i>GRB2 associated binding protein 1</i> )
<b>GABRA5</b>	Receptor 5-alfa do Ácido gama-aminobutírico (do inglês; <i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5</i> )
<b>GFI1</b>	Repressor de transcrição independente do fator de crescimento 1 (do inglês; <i>Growth factor independent 1 transcription repressor</i> )

<b>GFI1B</b>	Repressor de transcrição independente do fator de crescimento 1B (do inglês; <i>Growth factor independent 1B transcriptional repressor</i> )
<b>GLI1</b>	Fator de transcrição GLI da família zinc finger 1 (do inglês; <i>GLI family zinc finger 1</i> )
<b>GLI2</b>	Fator de transcrição GLI da família zinc finger 2 (do inglês; <i>GLI family zinc finger 2</i> )
<b>GLI3</b>	Fator de transcrição GLI da família zinc finger 3 (do inglês; <i>GLI family zinc finger 3</i> )
<b>GLT1</b>	Transportador de glutamato 1 (do inglês; <i>Glutamate transporter solute carrier family 1</i> )
<b>Grb2</b>	Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (do inglês; <i>Growth factor receptor bound protein 2</i> )
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Gliocogênio sintase cinase 3- $\beta$ (do inglês; <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> )
<b>HCAR1</b>	Receptor do ácido hidroxicarboxílico 1 (do inglês; <i>Hydroxycarboxylic acid receptor 1</i> )
<b>HCAR2</b>	Receptor do ácido hidroxicarboxílico 2 (do inglês; <i>Hydroxycarboxylic acid receptor 2</i> )
<b>HDAC</b>	Histona desacetilase
<b>HDM</b>	Histona demetilase
<b>HER2</b>	Receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (do inglês; <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> )
<b>HHIP</b>	Proteína de interação da família Hedgehog (do inglês; <i>Hedgehog interacting protein</i> )
<b>HIF-1a</b>	Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia (do inglês; <i>Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i> )
<b>I17q</b>	Isocromossomo 17q
<b>IAP</b>	Inibidor de apoptose (do inglês; <i>Inhibitor of Apoptosis</i> )
<b>IC50</b>	Concentração inibitória média (do inglês; <i>The half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>IKB</b>	Cinase IKB (do inglês; <i>IKB kinase</i> )
<b>IKK</b>	Cinase IKK (do inglês; <i>IKK kinase</i> )

<b>JNK</b>	Cinase N-terminal c-Jun (do inglês; <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
<b>KBTBD4</b>	Kelch repeat and BTB domain containing 4
<b>KDM6A</b>	Lisina demetilase 6A (do inglês; <i>Lysine demethylase 6A</i> )
<b>KI67</b>	Antígeno KI-67 (do inglês; <i>Antigen KI-67</i> )
<b>KMT2C</b>	Lisina metiltransferase 2C (do inglês; <i>Lysine methyltransferase 2C</i> )
<b>KMT2D</b>	Lisina metiltransferase 2D (do inglês; <i>Lysine methyltransferase 2D</i> )
<b>LINGO-1</b>	Leucine rich repeat and Ig domain containing 1
<b>MAGIC</b>	Medulloblastoma Advanced Genomics International Consortium
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês; <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MBs</b>	Meduloblastoma (s)
<b>MDM2</b>	Mouse double minute 2 homolog
<b>MEK</b>	Cinase ativadora da MAP cinase (do inglês; <i>MAP kinase kinase</i> )
<b>MMP-3</b>	Metaloproteinase de matriz 3 (do inglês; <i>Matrix metalloproteinase 3</i> )
<b>MMP-7</b>	Metaloproteinase de matriz 7 (do inglês; <i>Matrix metalloproteinase 7</i> )
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina (do inglês; <i>Mammalian target of rapamycin</i> )
<b>MYC</b>	Fator de transcrição MYC (do inglês; <i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i> )
<b>MYCN</b>	Fator de transcrição MYCN (do inglês; <i>MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor</i> )
<b>NF-KB</b>	Fator nuclear kappa B (do inglês; <i>Nuclear factor kappa B</i> )
<b>NGF</b>	Fator de crescimento do nervo (do inglês; <i>Nerve growth factor</i> )
<b>NGFR</b>	Receptor de NGF (do inglês; <i>Nerve growth factor receptor-p75NTR</i> )
<b>NMRAL1</b>	NmrA like redox sensor 1
<b>NT-3</b>	Neurotrofina 3 (do inglês; <i>Neurotrophin 3</i> )
<b>NT-4/5</b>	Neurotrofina 4/5 (do inglês; <i>Neurotrophin 4/5</i> )
<b>NTRK</b>	Receptor neurotrófico de tirosina cinase (do inglês; <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase</i> )

<b>NTRK1</b>	Receptor neurotrófico de tirosina cinase 1 (do inglês; <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i> )
<b>NTRK2</b>	Receptor neurotrófico de tirosina cinase 2 (do inglês; <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i> )
<b>NTRK3</b>	Receptor neurotrófico de tirosina cinase 3 (do inglês; <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 3</i> )
<b>OTX2</b>	Orthodenticle homeobox 2
<b>p38</b>	Proteína cinase 38 ativada por mitógeno (do inglês; <i>Mitogen-activated protein kinase 38</i> )
<b>p53</b>	Proteína tumoral (do inglês; <i>Tumor protein p53 (TP53)</i> )
<b>P75NTR</b>	Receptor de neurotrofinas (do inglês; <i>Neurotrophin Receptor P75NTR [CD271]</i> )
<b>PALB2</b>	Partner and localizer of BRCA2
<b>PDK</b>	Piruvato desidrogenase cinase (do inglês; <i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i> )
<b>PDLIM1</b>	Proteína LIM 1 associada a Actina (do inglês; <i>PDZ and LIM domain 1</i> )
<b>PDLIM3</b>	Proteína LIM 3 associada a Actina (do inglês; <i>PDZ and LIM domain 3</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês; <i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i> )
<b>PIK3CA</b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
<b>PIP3</b>	Fosfatidil inositol trifosfato (do inglês; <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i> )
<b>PKC</b>	Proteína cinase C (do inglês; <i>Protein kinase C</i> )
<b>PLC- <math>\gamma</math></b>	Fosfolipase C gama (do inglês; <i>Phospholipase C-gamma</i> )
<b>PNETs</b>	Tumores neuroectodérmicos primitivos (do inglês; <i>Primitive neuroectodermal tumours</i> )
<b>PRDM6</b>	PR/SET domain 6
<b>PTB</b>	Domínio de ligação à fosfotirosina (do inglês; <i>Phosphotyrosine-binding domain</i> )
<b>PTCH1</b>	Patched 1
<b>PTEN</b>	Phosphatase and tensin homolog

<b>Puma</b>	Modulador de apoptose regulado positivamente por p53 (do inglês; <i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i> )
<b>PVT1</b>	Oncogene Pvt1
<b>Rac</b>	Rac (GTPase)
<b>Raf</b>	Raf cinase
<b>Ras</b>	Ras GTPase
<b>SOS</b>	Son of sevenless
<b>Ren</b>	Renina
<b>REV3L</b>	REV3 like, DNA directed polymerase zeta catalytic subunit
<b>Rho</b>	Rodopsina (do inglês; <i>Rhodopsin</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>ROS1</b>	ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase
<b>RUNX3</b>	RUNX family transcription factor 3
<b>SAPK</b>	Stress-activated protein kinase
<b>SB</b>	Sleeping Beauty
<b>Shc</b>	Src-homology collagen protein
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>SLFN11</b>	Schlafen family member 11
<b>SMARCA4</b>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
<b>SMO</b>	Smoothened
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNCAIP</b>	Synuclein alpha interacting protein
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>SOX10</b>	SRY-box transcription factor 10
<b>SPTLC3</b>	Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3
<b>SRC</b>	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
<b>SREBP1</b>	Sterol regulatory element binding transcription factor 1

<b>STAT1/3</b>	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 1/3 (do inglês; <i>Signal transducer and activator of transcription 1/3</i> )
<b>SUFU</b>	SUFU regulador negativo da sinalização hedgehog (do inglês; <i>SUFU negative regulator of hedgehog signaling</i> )
<b>SWI-SNF</b>	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
<b>TCF-LEF</b>	T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor
<b>TERT</b>	Transcriptase reversa de telomerase (do inglês; <i>Telomerase reverse transcriptase</i> )
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral (do inglês; <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>TRABD2A</b>	TraB domain containing 2A
<b>TRAP1</b>	Receptor de TNF associado a proteína 1 (do inglês; <i>TNF receptor associated protein 1</i> )
<b>Trk</b>	Receptor tropomiosina cinase (do inglês; <i>Tropomyosin-related kinase</i> )
<b>TrKA</b>	Receptor tropomiosina cinase A (do inglês; <i>Tropomyosin receptor kinase A</i> )
<b>TrkB</b>	Receptor tropomiosina cinase B (do inglês; <i>Tropomyosin receptor kinase B</i> )
<b>TrkC</b>	Receptor tropomiosina cinase C (do inglês; <i>Tropomyosin receptor kinase C</i> )
<b>TTC9</b>	Tetratricopeptide repeat domain 9
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotelial vascular (do inglês; <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>WDR60</b>	WD repeat domain 60
<b>WNT</b>	Wingless
<b>YAP1</b>	Yes associated protein 1
<b>ZIC5</b>	Zic family member 5
<b>ZMYM3</b>	Zinc finger MYM-type containing 3



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Porcentagem de incidência e sobrevivência de cânceres pediátricos mundialmente.

**Figura 2.** Porcentagem de incidência de cânceres pediátricos no Brasil.

**Figura 3.** Localização de diferentes tipos de tumores cerebrais em crianças.

**Figura 4.** Histopatologia de MB.

**Figura 5.** Sinalização WNT em MB.

**Figura 6.** Sinalização SHH em MB.

**Figura 7.** Resumo das alterações prevalentes em MBs do grupo 3.

**Figura 8.** Resumo das alterações prevalentes em MBs do grupo 4.

**Figura 9.** Resumo das características moleculares e clínicas de subgrupos e subtipos de MB.

**Figura 10.** Estrutura dos genes de neurotrofinas em mamíferos.

**Figura 11.** Estrutura dos genes NTRK.

**Figura 12.** Principais interações entre neurotrofinas e seus receptores.

**Figura 13.** Sinalização por neurotrofinas.

**Figura 14.** Fusões em genes NTRK.

**Figura 15.** Estrutura da pequena molécula ANA-12 e seu domínio de ligação em TrkB.

**Figura 16.** Hipótese 2.1.1 do estudo.

**Tabela 1.** Tumores do SNC comuns na população pediátrica.

**Tabela 2.** Características celulares e moleculares das linhagens de MB utilizadas neste estudo.

**Tabela 3.** Atual classificação de risco de MBs.

**Tabela 4.** Estadiamento de MBs de acordo com a classificação de Chang.

## RESUMO

As neurotrofinas são uma família de proteínas que atuam ligando-se aos receptores tropomiosina cinases para regular o desenvolvimento e a plasticidade do sistema nervoso. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, uma neurotrofina que atua se ligando no receptor tropomiosina cinase B (TrkB), tem sido implicado no desenvolvimento e progressão de diversos tipos tumorais. No entanto, o seu papel em meduloblastomas, tipo mais frequente de tumor cerebral pediátrico maligno, ainda permanece pouco estudado. Nós demonstramos que a inibição seletiva de TrkB, utilizando a pequena molécula ANA-12, reduziu a proliferação, viabilidade e induziu apoptose de linhagens celulares de meduloblastoma humano, além de retardar o crescimento de tumores subcutâneos xenográficos de meduloblastoma em camundongos nude. Estes efeitos foram acompanhados pela redução da atividade da cinase reguladora de sinal extracelular, aumento da expressão de RNA mensageiro da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 e modulação da expressão do inibidor de cinase dependente de ciclina 1A. Além disso, as células de meduloblastoma tratadas com ANA-12 mostraram alterações morfológicas consistentes com diferenciação, aumento dos níveis do marcador de diferenciação neural  $\beta$ -III Tubulina e expressão reduzida do marcador de pluripotência Nestina. Essas descobertas são consistentes com a possibilidade de que a inibição seletiva de TrkB possa exibir efeitos antitumorais em meduloblastoma, possivelmente pela modulação da sinalização intracelular e expressão gênica relacionada a progressão tumoral, apoptose e diferenciação. Nesta tese nós também resumizamos e discutimos o atual “estado da arte” de pesquisas experimentais sobre a sinalização por neurotrofinas e seus receptores em meduloblastoma. Adicionalmente, nós avaliamos o perfil de expressão dos componentes da sinalização por neurotrofinas a partir de dados de transcriptoma de amostras de subtipos e subgrupos de pacientes com meduloblastoma. Estes dados forneceram evidências de que estes genes possuem potencial para serem utilizados como marcadores diagnósticos, prognósticos e de sobrevivência em pacientes com meduloblastoma.

## ABSTRACT

Neurotrophins are a family of proteins that act by binding to tropomyosin receptor kinase receptors to regulate nervous system development and plasticity. Increasing evidence indicates that neurotrophins and their receptors expressed in cancer cells play a role in tumor growth and resistance to treatment. Brain-derived neurotrophic factor, a neurotrophin that acts by binding to the tropomyosin receptor kinase B receptor, has also been implicated in the progression of several types of cancer. However, its role in medulloblastoma, the most common type of malignant brain tumor afflicting children, remains unclear. Here we show that selective TrkB inhibition with the small molecule compound ANA-12 impaired proliferation and viability of human UW228 and D283 medulloblastoma cells and slowed the growth of medulloblastoma tumors xenografted into nude mice. These effects were accompanied by increased apoptosis, reduced extracellular regulated kinase activity, increased expression of signal transducer and activator of transcription 3, and differential modulation of cyclin dependent kinase inhibitor 1A expression dependent on the cell line. In addition, medulloblastoma cells treated with ANA-12 showed morphological alterations consistent with differentiation, increased levels of the neural differentiation marker  $\beta$ -III Tubulin, and reduced expression of the stemness marker Nestin. These findings are consistent with the possibility that selective TrkB inhibition can display consistent anticancer effects in medulloblastoma, possibly by modulating intracellular signaling and gene expression related to tumor progression, apoptosis, and differentiation. In this thesis we also summarize and discuss the current "state of the art" of experimental research on neurotrophin signaling and its receptors in medulloblastoma. Furthermore, we investigated the clinical relevance of the neurotrophins and their receptors in data sets derived from arrays and RNA-seq profiling across medulloblastoma subgroups and subtypes. These data provided evidence that these genes have the potential to be used as markers for diagnostic, prognostic and survival in medulloblastoma patients.

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está estruturada da seguinte maneira:

**Seção 1:** Apresenta a introdução na forma de revisão bibliográfica abrangendo sobre tumores pediátricos, tumores pediátricos do SNC, MBs e sinalização por neurotrofinas.

**Seção 2:** Descreve as principais hipóteses do presente trabalho.

**Seção 3:** Descreve os objetivos gerais e específicos.

**Seção 4:** Consiste em dois capítulos; um artigo de dados experimentais e um artigo de revisão com dados originais.

**Seção 5:** Contempla a discussão dos resultados apresentados na seção 4 e ressalta a importância destes estudos.

**Seção 6:** Apresenta as principais conclusões gerais e específicas deste estudo.

**Seção 7:** Apresenta alguns questionamentos remanescentes e levantados a partir do desenvolvimento deste trabalho, bem como perspectivas.

**Seção 8:** Exibe a lista de referências utilizadas na construção desta tese.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Tumores pediátricos

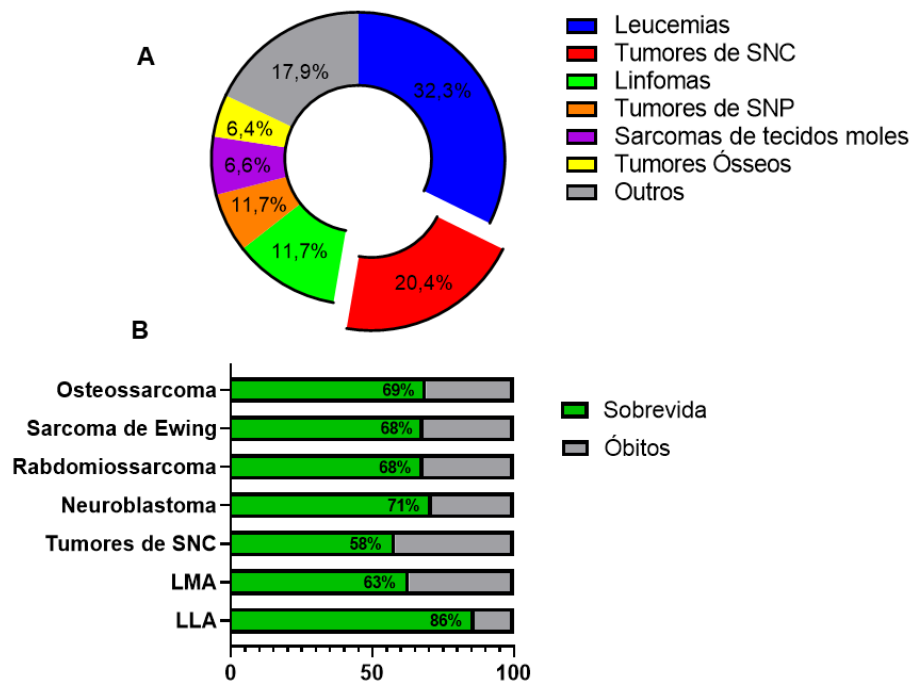
Os tumores pediátricos representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade de crianças e adolescente mundialmente e aproximadamente 300,000 crianças de 0 a 19 anos são diagnosticadas com câncer a cada ano (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). Os tipos de câncer mais comuns durante a infância incluem leucemias, tumores do sistema nervoso central (SNC), linfomas, sarcomas de osso e de tecido mole e tumores de sistema nervoso periférico (SNP) (figura 1A e figura 2) (FILBIN; MONJE, 2019).

As causas do câncer pediátrico ainda não são bem compreendidas (STEWART et al., 2016). Estes tumores são raros e heterogêneos, e diferente dos tumores em adultos, exibem baixas taxas de mutações, a proliferação das células tumorais é mais rápida e são pouco associados a fatores ambientais e estilo de vida (MURPHY et al., 2013). Além disso, poucas alterações genéticas são observadas em cânceres pediátricos (SPECTOR; PANKRATZ; MARCOTTE, 2015) e essas modificações surgem com frequência em células precursoras embrionárias que apresentam sinalização celular aberrante e alteram o desenvolvimento normal (MARSHALL et al., 2014). Devido à virtual impossibilidade de prevenção dos canceres pediátricos, as estratégias mais efetivas no controle desses casos são o diagnóstico precoce e terapias efetivas.

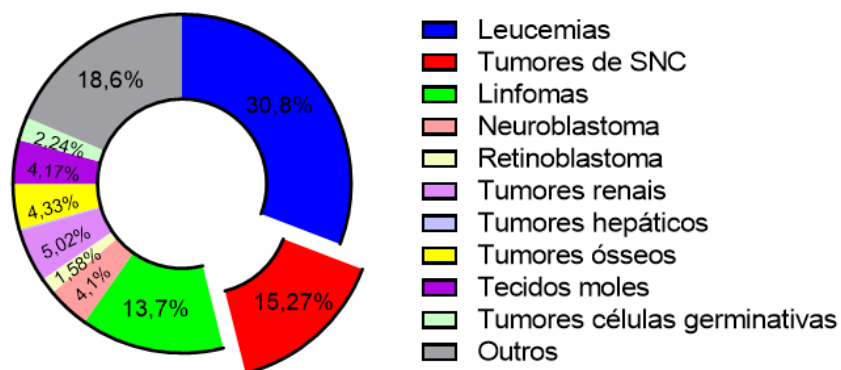
Nos últimos 50 anos houve um avanço no tratamento de tumores pediátricos proporcionando um aumento das taxas de sobrevida em até 80%, através da combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (SALETTA; SENG; LAU, 2014). Mas apesar dos avanços terapêuticos, está é uma realidade apenas para países desenvolvidos, que possuem acesso aos tratamentos modernos e cuidados paliativos, enquanto em países subdesenvolvidos apenas 20% dos casos são curados com sucesso (BHAKTA et al., 2019). Além disso, altas taxas de sobrevida são limitadas a alguns tipos tumorais, enquanto outros tipos, como tumores de SNC, apresentam menores taxas de sobrevivência (MARIN NAVARRO et al., 2018) (figura 1B). No Brasil, a incidência de tumores de SNC está aumentando e houve

pouco progresso em relação ao aumento de sobrevida, estimada em 42% (INCA, 2016). Este progresso ainda tem sido limitado seja devido ao desenvolvimento de resistência a terapias disponíveis ou pelo número reduzido de estudos clínicos realizados (PUI et al., 2011). Para os sobreviventes, permanecem como desafios os efeitos adversos a longo prazo como resultado do tratamento tóxico como radiação e quimioterapia que incluem comprometimento cognitivo, toxicidade em órgãos e tumores secundários (SMITH; REAMAN, 2015).

Apesar dos avanços nos últimos 50 anos, durante a última década não se observou aumento significativo no percentual de sobrevida e o câncer pediátrico ainda permanece como a segunda maior causa de óbito infantil (80,000 casos por ano), sugerindo que os tratamentos atuais atingiram os limites de cura (MARIN NAVARRO et al., 2018). Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias que sejam mais eficazes e menos tóxicas é essencial para aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida de pacientes com câncer pediátrico (NORRIS; ADAMSON, 2012).



**Figura 1. Porcentagem de incidência e sobrevivência de cânceres pediátricos mundialmente.** (A) Distribuição global da incidência de cânceres pediátricos em crianças na faixa etária de 0-14 anos durante os anos 2001-2010. (B) Percentual de sobrevivência em 5 anos das formas mais comuns de câncer pediátrico diagnosticados durante os anos 2000-2007. LLA: Leucemia Linfocítica Aguda; LMA: Leucemia Mielocítica Aguda. Adaptado de (MARIN NAVARRO et al., 2018).



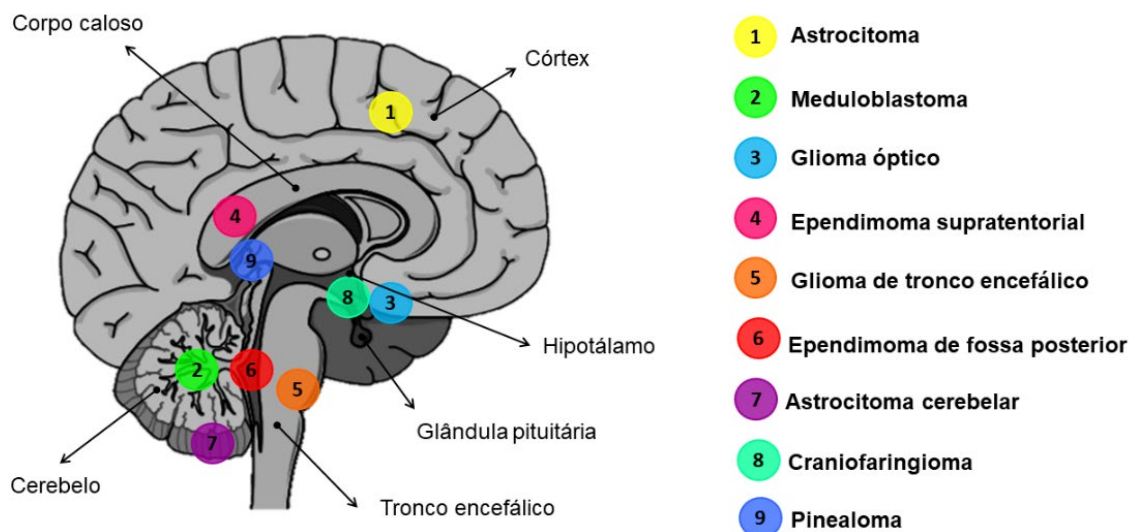
**Figura 2. Porcentagem de incidência de cânceres pediátricos no Brasil.** Distribuição da incidência de cânceres pediátricos em crianças na faixa etária de 0-19 anos no Brasil durante os anos 2000-2011 (Dados do Instituto Nacional de Câncer, INCA, 2016). Adaptado de: Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: Informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade, INCA, 2016.

## 1.2. Tumores pediátricos do SNC

Tumores cerebrais são um diverso grupo de doenças e constituem os tumores sólidos mais comuns em crianças, sendo a segunda principal causa de morte relacionada a câncer em pacientes com menos de 19 anos (VITANZA; CAMPEN; FISHER, 2018). Fatores como predisposição genética, idade e sexo são importantes para a classificação destes tumores que varia dependo do tipo e localização do tumor (figura 3) e histologia (BHATIA; PRUTHI, 2018). Diversas síndromes genéticas são associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de tumores neurológicos, como neurofibromatose 1 e 2, esclerose tuberosa, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Turcot e síndrome de Gorlin (FARRELL; PLOTKIN, 2007). Além disso, como causas ambientais sabe-se que a exposição à radiação aumenta as chances do desenvolvimento de tumores cerebrais (POLLACK; JAKACKI, 2011).

Avanços no entendimento de características moleculares de tumores cerebrais são resultado de estudos genéticos, epigenéticos e transcriptômicos, e têm fornecido a base para a melhor categorização destes tumores (POLLACK; AGNIHOTRI; BRONISCER, 2019). A última edição da classificação de tumores de SNC da Organização Mundial da Saúde (OMS; WHO 2016) utilizou características moleculares para classificação destes tumores incluindo parâmetros fenotípicos e genotípicos (LOUIS et al., 2016). A tabela 1 apresenta uma lista com a característica de tumores de SNC mais frequentes na população pediátrica. Os tumores de SNC mais comuns na população pediátrica são astrocitoma, meduloblastoma (MB) e ependimoma, sendo MB (WHO grau IV) o tumor maligno mais comum em crianças (SEGAL; KARAJANNIS, 2016).





**Figura 3. Localização de diferentes tipos de tumores cerebrais em crianças.** Figura criada na plataforma Mind the Graph ([www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)). **(1,7)** Astrocitomas podem ser encontrados em diferentes lugares do cérebro ou medula espinhal, no entanto a localização mais comum desses tumores se encontra no cerebelo, onde são denominados astrocitomas cerebelares (POLLACK; AGNIHOTRI; BRONISCER, 2019). **(2)** MBs são tumores embrionários localizados no cerebelo (HATTEN; ROUSSEL, 2011). **(3)** Gliomas ópticos surgem no nervo óptico, possuem baixa taxa de proliferação e raramente são fatais, no entanto podem comprometer a visão (FRIED et al., 2013). **(4,6)** Ependimomas são tumores de células gliais que podem ocorrer em sítios do sistema ventricular (WU; ARMSTRONG; GILBERT, 2016). **(5)** Gliomas de tronco encefálico se localizam na região do tronco encefálico e ocorrem quase exclusivamente em crianças. Dificilmente podem ser removidos cirurgicamente devido à complexidade desta região (GRIMM; CHAMBERLAIN, 2013). **(8)** Craniofaringiomas são tumores benignos que se desenvolvem acima da glândula pituitária, estes tumores se encontram próximos ao nervo óptico e hipófise estes podem causar problemas de visão e alterações hormonais (FERNANDEZ-MIRANDA et al., 2012). **(9)** Pinealomas ocorrem na glândula pineal e são tumores neuroectodérmicos primitivos (MOTTOLESE; SZATHMARI; BEURIAT, 2015).

**Tabela 1.** Tumores do SNC comuns na população pediátrica.

Tipos	Grau	% em relação a todos os tumores de SNC	Localização típica	Idade (anos)	Sobrevivência em 5 anos
<b><i>Gliomas</i></b>					
Astrocitoma pilocítico	I	15.6	Quiasma óptico e cerebelo	0-14	97%
Astrocitoma subependimário de células gigantes	II	*	Ventrículos	0-19	Excelente
Xantastrocitoma pleomórfico	II	<1	Hemisférios e córtex	0-19	Bom
Oligodendroma	II	1.1	Supratentorial	15-19	92%
Oligodendroma Anaplásico	III	0.13	Supratentorial	15-19	83%
Astrocitoma difuso	II	4.8	Supratentorial	0-19	*
Astrocitoma Anaplásico	III	1.5	Supratentorial	0-19	32%
Glioblastoma	IV	2.9	Supratentorial	0-19	18%
<b><i>Ependimomas</i></b>					
Subependimoma	I	Muito raro	Quarto ventrículo	0-19	Excelente
Ependimoma mixopapilar	I	Raro	Coluna espinhal	>5	Muito bom
Ependimoma	II	4 a 5	Fossa posterior	<6	Bom
Ependimoma anaplásico	III		Supratentorial	>5	Ruim
<b><i>Tumores embrionários</i></b>					
MB	IV	7.3	Cerebelo	0-14	Variável
Tumores neuroectodermiais primitivos	IV	1.6	Supratentorial	0-4	Ruim
Tumor teratóide rabdoíde atípico	IV	1.6	Supratentorial	0-4	Ruim

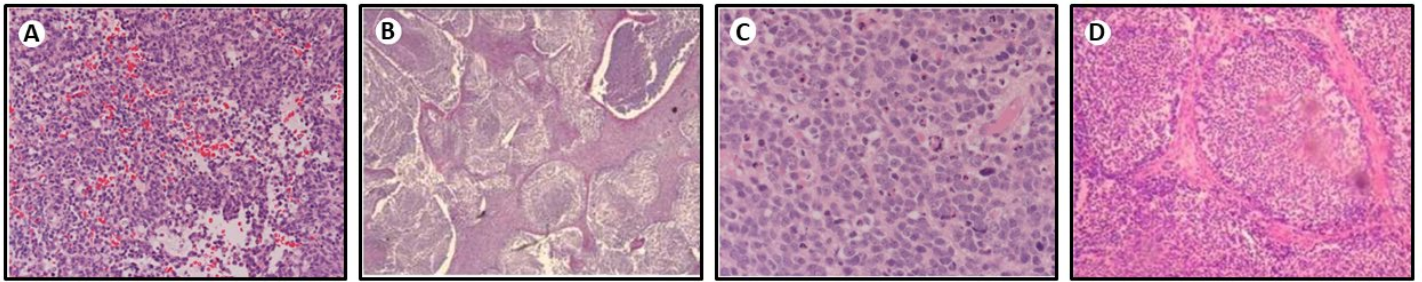
\*Dados não disponíveis. Revisado de: (SEGAL; KARAJANNIS, 2016).

## 1.3. Meduloblastomas

### 1.3.1. Características gerais

MBs são tumores embrionários extremamente heterogêneos que se originam no cerebelo em desenvolvimento (TAYLOR et al., 2012). Inicialmente foram descritos por Cushing e Bailey em 1925, com o objetivo de caracterizar tumores que se localizam no cerebelo e que apresentam características de células imaturas (HAYAT, 2012). Durante os anos 1980 estes tumores foram agrupados em conjunto com outros tumores neuroectodérmicos primitivos (PNETs) que se originavam em outras regiões que não a fossa posterior, devido a sua similaridade histológica (MASSIMINO et al., 2011). No entanto, estudos recentes sugerem que os tumores da fossa posterior são molecularmente distintos de tumores que se originam no córtex ou região pineal. A mais recente classificação de tumores cerebrais da OMS distingue MB e seus subtipos de outros tumores PNETs, pineoblastomas e tumores teratóides-rabdóides atípicos (LOUIS et al., 2016).

MBs são atualmente classificados de acordo com características histológicas e moleculares (TAYLOR et al., 2012). A classificação histológica divide MBs em 4 subtipos histológicos: clássico, desmoplásico-nodular, anaplásico de células grandes e extensa nodularidade (figura 4). Grande parte dos MBs apresenta histologia clássica. MBs de extensa nodularidade são restritos à crianças e MBs desmoplásico-nodular podem ocorrer em crianças e adultos (NORTHCOTT et al., 2019). A classificação genética divide os tumores nos subgrupos: Wingless (WNT) ativado, Sonic Hedghog (SHH) ativado e proteína tumoral p53 (*TP53*) normal, SHH ativado e *TP53* mutado, não-WNT/não-SHH grupo 3, não-WNT/não-SHH grupo 4 (LOUIS et al., 2016). Existem sobreposições entre as classificações histológicas e moleculares, no entanto a classificação molecular têm demonstrado ser mais confiável e robusta (RAMASWAMY; TAYLOR, 2017).



**Figura 4. Histopatologia.** (A) MB clássico consiste em células indiferenciadas com polimorfismo nuclear de médio a moderado. (B) MB desmoplásico-nodular apresenta nódulos de células neurocíticas e desmoplasia internodular mostrando pleomorfismo nuclear variado. (C) MB anaplásico de células grandes exibe marcado pleomorfismo nuclear acompanhado de elevada contagem mitótica, apoptose abundante e fenótipo de células grandes. (D) MB de extensa nodularidade é caracterizado por grandes nódulos com diferenciação neurocítica. Adaptado de: (DESOUZA et al., 2014; NORTHCOTT et al., 2019).

Pacientes com MB tratados com terapia multimodal padrão, que consiste em cirurgia para retirada do tumor, quimioterapia não-específica e radioterapia cranioespinhal, apresentam sobrevida livre de doença após 5 anos que varia entre 60 e 70% (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002). No entanto, muitos pacientes padecem com os efeitos adversos deste tratamento. Além disso, metástases são identificadas em até 40% durante o diagnóstico, e quase todos os pacientes que apresentam recorrência também apresentam doença metastática (KHATUA et al., 2018). A doença metastática ainda permanece incurável e compreende a principal causa de morte em crianças com MB (KUZAN-FISCHER; JURASCHKA; TAYLOR, 2018).

### 1.3.2. Epidemiologia e fatores de risco

MBs representam cerca de 63% dos tumores de SNC embrionários e apresentam incidência anual de 5 casos a cada 1 milhão de indivíduos (OSTROM et al., 2018). Raros são os casos de MB diagnosticados em adultos e estes possuem incidência de 0.5 casos a cada 1 milhão de indivíduos e são geralmente diagnosticados antes dos 40 anos de idade (SMOLL; DRUMMOND, 2012). A

incidência de MBs é maior na primeira década de vida, surgindo entre a faixa etária de 1-4 anos e de 5-9 anos de idade. No geral MBs são mais comuns no sexo masculino com as taxas de 1.8 meninos para cada 1 menina (JOHNSTON et al., 2014; KHANNA et al., 2017). Além disso, a incidência de MBs não parece estar relacionada a fatores como etnicidade ou regiões geográficas (EZZAT et al., 2016).

Entre os fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de MBs estão mutações em células germinativas de genes envolvidos em sinalização celular relacionada ao desenvolvimento (SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015). Mutações em 6 genes têm sido associadas com aumento do risco de desenvolvimento de MB; mutações no gene *TP53* associadas com a síndrome de Li-Fraumeni, mutações em Patched 1 (*PTCH1*) e regulador negativo da sinalização hedgehog (*SUFU*) associadas a síndrome de Gorlin, mutações em polipose adenomatosa coli (*APC*) associadas à síndrome polipose adenomatosa familiar e mutações em “partner and localizer of BRCA2” (*PALB2*) e proteína de susceptibilidade ao câncer de mama 2 (*BRCA2*) associadas com anemia Fanconi (BOURDEAUT; DELATTRE, 2018).

### **1.3.3. Subgrupos moleculares**

Em 2012, um consenso internacional identificou que MBs compreendem 4 subgrupos moleculares: WNT, SHH, grupo 3 e grupo 4. Cada subgrupo apresenta características genéticas particulares, diferentes perfis de expressão molecular, variado padrão de metilação de DNA, e características clínicas e epidemiológicas diversas (TAYLOR et al., 2012). A descoberta de subgrupos moleculares representam o principal avanço no entendimento de MBs (SCHWALBE et al., 2017). Além disso, estudos mais recentes têm detalhado a heterogeneidade intra-tumoral e inter-tumoral de cada subgrupo, representando uma segunda geração de subtipos moleculares.

Em 2017, três estudos independentes investigaram características moleculares e clínicas em grandes coortes de amostras de MB utilizando técnicas de alta resolução genômica (CAVALLI et al., 2017; NORTHCOTT et al., 2017; SCHWALBE et al., 2017). Schwalbe em 2017 publicou um estudo avaliando 428

MBs primários coletados no Reino Unido. Através do método de fatoração em matrizes não negativas (NMF) de perfis de metilação de DNA foram identificados sete subtipos moleculares de MB: um subtipo do grupo WTN, dois subtipos do grupos SHH, dois do grupo 3 e dois do grupo 4 (SCHWALBE et al., 2017). Cavalli em 2017 analisou 763 amostras de MB, coletadas pelo banco de dados “Medulloblastoma Advanced Genomics International Consortium (MAGIC)”, através do método de fusão de redes de semelhança em dados de expressão gênica e metilação do DNA onde foram identificados doze subtipos diferentes de MB: dois tipos WNT, quatro tipos SHH, três tipos grupo 3 e três tipos grupo 4 (CAVALLI et al., 2017). Northcott *et al.* publicou um estudo com uma coorte de 1256 MBs avaliados por perfis de metilação de DNA utilizando o algoritmo DBSCAN, onde foi identificada a existência de oito subtipos entre os grupos 3/4 (Tipos I-VIII) (NORTHCOTT et al., 2017; SHARMA et al., 2019). As particularidades de cada subgrupo e subtipos serão detalhadas nas seções seguintes (figura 9). A tabela 2 resume as características moleculares das linhagens utilizadas neste estudo.

- **Subgrupo WNT**

- a. Características clínicas**

O subgrupo WNT representa cerca de 10% de todos os casos diagnosticados de MB. Frequentemente surgem após os 4 anos de idade e podem ocorrer em adultos, acometendo pacientes do sexo feminino e masculino em proporção similar. Este subgrupo apresenta o melhor prognóstico, com sobrevida de 95%, possuem baixas taxas de metástase e a maioria dos tumores apresenta histologia clássica. No entanto, adultos com este subtipo apresentam pior prognóstico (SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015).

Os tumores WNT se localizam principalmente na parte dorsal do tronco encefálico e são caracterizados por mutações somáticas que ativam o éxon 3 do gene beta catenina 1 (*CTNNB1*). Outra característica marcante desses tumores é a monossomia do cromossomo 6, que é encontrada em cerca de 80-85% dos pacientes e ocorre juntamente com mutações em *CTNNB1*. Estes tumores

apresentam imunohistoquímica positiva para  $\beta$ -catenina nuclear (NORTHCOTT et al., 2012).

Schwalbe identificou apenas um subgrupo molecular de tumores WNT. Metástases foram identificadas em 3% dos pacientes, sobrevida de 72% em 10 anos, mutações em *CTNNB1* e *TP53*, monossomia do cromossomo 6 e metilação do DNA reduzida em relação ao cerebelo normal (SCHWALBE et al., 2017). Cavalli descreveu os subtipos WNT: WNT- $\alpha$  e WNT- $\beta$ , sendo o subtipo alfa mais comum (70%). O subtipo WNT- $\alpha$  é prevalente em crianças e apresenta monossomia do cromossomo 6, enquanto WNT- $\beta$  também ocorrem em adultos. Metástases são encontradas em 8.6% dos tumores WNT- $\alpha$  e 21.5% dos tumores WNT- $\beta$ , com sobrevida de 97% e 100% respectivamente (CAVALLI et al., 2017).

### ***b. Biologia molecular***

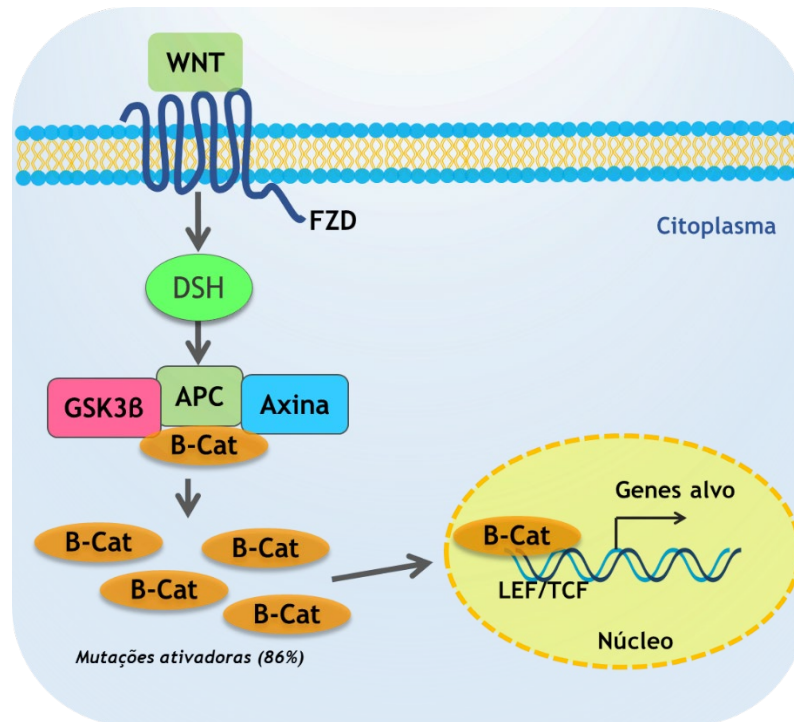
A sinalização WNT constitui uma grande família de glicoproteínas secretadas que apresentam papel fundamental durante a embriogênese, diferenciação, motilidade celular, proliferação celular e homeostase do tecido adulto. No cérebro em desenvolvimento, a sinalização WNT é responsável pela regulação da maturação neuronal e formação de sinapses (PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2000). Esta sinalização é ativada por receptores Frizzled (FZD) após a ligação de WNT, ativando uma cascata de sinalização intracelular que culmina com o aumento dos níveis de  $\beta$ -catenina no citoplasma, levando também a estabilização desta proteína no núcleo que vai atuar como co-ativador de fatores de transcrição como “T-cell factor/lymphoid enhancer-binding fator” (TCF-LEF), aumentando a expressão de genes que regulam o crescimento e proliferação celular (figura 5). Os principais reguladores negativos desta sinalização são *APC* e *SUFU*, que previnem a acumulação de *CTNNB1* no núcleo (GUESSOUS; LI; ABOUNADER, 2008).

As células de origem dos tumores WNT são progenitores neuronais do lábio rômbo inferior do tronco encefálico (GIBSON et al., 2010). Cerca de 90% dos pacientes com tumores WNT apresentam mutações em *CTNNB1* que codifica  $\beta$ -catenina, levando a ativação aberrante desta via de sinalização através da

estabilização desta proteína. Pacientes com tumores WNT que não apresentam mutação em *CTNNB1* frequentemente apresentam mutações com perda de função do gene *APC*, o que também leva à ativação constitutiva da sinalização WNT (HUANG et al., 2000).

Outras mutações comuns em tumores WNT foram identificadas nos genes da helicase DEAD-box 3 ligado ao X (*DDX3X*) (em 36% dos pacientes), “SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4” (*SMARCA4*) (19%), *TP53* (14%) (NORTHCOTT et al., 2019). Mutações em *DDX3X* podem contribuir para a tumorigênese pelo aumento da proliferação de células progenitoras lábio rômico inferior e através da desregulação da tradução de proteínas (OH et al., 2016). *SMARCA4* codifica a subunidade central do complexo regulador da cromatina “SWItch/Sucrose Non-Fermentable” (SWI-SNF) que regula a transcrição através de alterações na estrutura da cromatina. A prevalência de mutações em *SMARCA4* em tumores WNT, juntamente com mutações no complexo SWI-SNF sugerem que essas alterações são importantes para o desenvolvimento destes tumores. Em contraste aos tumores SHH, a presença de mutações em *TP53* em tumores WNT não promove impacto no prognóstico.





**Figura 5. Sinalização WNT em MB.** Na ausência do sinal WNT a  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -Cat) se encontra ligada ao complexo de degradação APC-Axina-GSK3 $\beta$ . Neste complexo a  $\beta$ -catenina é fosforilada por GSK3 $\beta$ , o que desencadeia a sua ubiquitinação e degradação nos proteassomos. A ligação de WNT a Frizzled (FZD) ativa Dishevelled (DSH) levando a inativação de GSK3 $\beta$  no complexo de degradação. Como resultado a fosforilação e degradação da  $\beta$ -catenina são inibidas e está se acumula no citoplasma e no núcleo. No núcleo a  $\beta$ -catenina se liga ao LEF/TCF e atua como co-ativador na transcrição dos genes alvo de WNT.

### c. Modelos de estudo

Embora considerados tumores de cerebello, modelos animais do subgrupo WNT sugerem que estes tumores podem se originar de células progenitoras que estão fora do cerebello. Foram gerados camundongos transgênicos contendo um alelo mutante de *CTNNB1* humano em células do lábio rômbo inferior. A indução da ativação de  $\beta$ -catenina nessas células combinado a deleção de *TP53* levou a formação de tumores WNT com histologia clássica e localizados ao mesencéfalo dorsal, com elevada latência (10 meses) e baixa penetrância (4-15%) (GIBSON et al., 2010). Um trabalho adicional demonstrou que a adição de um alelo mutante ativo de “phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha” (*Pik3ca*) a este modelo elevou a incidência de tumores WNT de 15% para 100% e reduziu a latência de iniciação tumoral para 3 meses. Atualmente, os modelos

animais para tumores WNT geneticamente induzidos se limitam a mutações concomitantes em *CTNNB1* e *TP53* (ROBINSON et al., 2012).

Para estudos *in vitro*, apenas duas linhagens celulares estabelecidas são conhecidas por apresentarem características moleculares em comum com tumores do subgrupo WNT. Como exemplos estão as linhagens MED5R e MED6 (OTHMAN et al., 2014). A linhagem MED5R apresenta mutação em *CTNNB1* e imunohistoquímica positiva para  $\beta$ -catenina. A linhagem MED6, no entanto, provavelmente sofreu seleção *in vitro* não intencional, pois o tumor que deu origem a esta linhagem apresentava mutação em *CTNNB1*, porém estas células apresentam apenas cópias normais deste gene, limitando a utilização destas como modelo representativo para este subgrupo (IVANOV et al., 2016).

- **Subgrupo SHH**

- a. Características clínicas**

O subgrupo SHH representa 30% dos casos de MBs. São frequentemente diagnosticados em crianças menores de 4 anos e em adultos (RUSERT et al., 2014). Pacientes deste subgrupo possuem prognóstico intermediário, com sobrevida variando de 60% a 80%. A classificação histológica pode ser variável neste subgrupo, entretanto a maioria dos tumores apresenta histologia desmoplásica. Este subgrupo possui diversas alterações genéticas, e a maior parte dos pacientes apresentam mutações somáticas ou germinativas com alterações no número de cópias em genes críticos da sinalização SHH (*PTCH1*, *smoothed* [*SMO*], *SUFU*, fatores de transcrição GLI da família zinc finger 1 e 2 [*GLI1* e *GLI2*]), devido a isso apresentam características clínicas bastante heterogêneas (DOUSSOUKI; GAJJAR; CHAMDINE, 2019).

Schwalbe identificou 2 subtipos de tumores SHH, que foram divididos de acordo com a idade dos pacientes em “SHH-infant” (crianças <4.3 anos) e “SHH-child” (crianças  $\geq$ 4.3 anos). Pacientes com MB “SHH-infant” apresentam metástases em 16% dos casos e sobrevida em 10 anos de 48%. Estes tumores

exibem mutações nos genes *TP53*, transcriptase reversa de telomerase (*TERT*), *SUFU*, *PTCH1*, apresentam aberrações cromossômicas (9p+, 17p-, 9q-), amplificação do fator de transcrição *MYCN* e *GLI2* e elevada expressão dos genes “RUNX family transcription factor 3” (*RUNX3*), receptor do ácido hidroxicarboxílico 1 e 2 (*HCAR1* e *HCAR2*) e “forkhead box G1” (*FOXG1*). Pacientes com “SHH-child” demonstram metástases em 26% dos casos e sobrevida de 58% em 10 anos. Estes tumores exibem mutações nos genes *SUFU* e *PTCH1*, deleção no cromossomo 9q- e elevada expressão dos genes: “TraB domain containing 2A” (*TRABD2A*), “tetratricopeptide repeat domain 9” (*TTC9*), “schlafen family member 11” (*SLFN11*) e receptor colinérgico muscarínico 2 (*CHRM2*). Além disso pacientes com tumores “SHH-child” apresentam níveis de metilação do DNA aumentados em relação aos tumores “SHH-infant” (SCHWALBE et al., 2017).

Cavalli identificou 4 subtipos de tumores SHH (SHH- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ). Tumores SHH- $\alpha$  afetam pacientes na faixa etária de 3-18 anos e apresentam sobrevida de 69.8%, as metástases são frequentes em 20% dos casos. Estes tumores também apresentam amplificação dos genes *MYCN*, *GLI2* e “yes associated protein 1” (*YAP1*), mutações em *TP53* e reduzido número de cópias nos cromossomos 9q, 10q, 17p. Tumores SHH- $\beta$  e SHH- $\gamma$  acometem especialmente pacientes menores de 3 anos, no entanto apresentam prognóstico bastante variado. Um terço dos pacientes com tumores SHH-  $\beta$  apresentam metástases e a sobrevida é apenas de 67.3%, além de apresentarem deleção de “phosphatase and tensin homolog” (*PTEN*). Pacientes com tumores SHH- $\gamma$  apresentam metástases em apenas 8.9% dos casos e possuem sobrevida de 88%. O subtipo SHH-  $\delta$  acomete principalmente a população adulta acima de 17 anos. 9.4% dos pacientes apresentam metástases e a sobrevida é de 88.5%, neste subtipo são comuns mutações no promotor *TERT* (CAVALLI et al., 2017; DOUSSOUKI; GAJJAR; CHAMDINE, 2019).

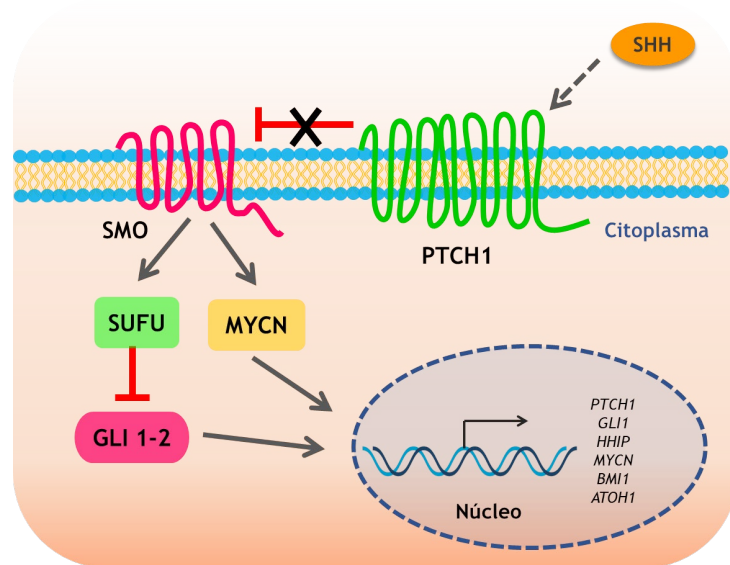
## **b. Biologia molecular**

A sinalização SHH é essencial durante o desenvolvimento embrionário, atuando na regulação da proliferação e diferenciação celular, manutenção de células tronco e polaridade tecidual. Além disso, é importante para a manutenção, renovação e regeneração do tecido adulto (CHOUDHRY et al., 2014). A cascata de sinalização celular é iniciada quando a proteína SHH se liga ao receptor transmembrana Patched (PTCH). PTCH inibe constitutivamente o receptor SMO, quando SHH se liga à PTCH ocorre alteração das interações entre PTCH e SMO, dessa forma SMO fica livre para promover a transdução de sinal para ativação da família de fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2). Como genes alvos dessa sinalização estão: *GLI1*, *PTCH1*, proteína de interação da família Hedghog (*HHIP*), ciclina D1 (*CCND1*), fator de transcrição *MYC*, proteína oncogênica do complexo policombo (*BMI1*), Linfoma de célula B-2 (*BCL2*) e fator de crescimento do endotelial vascular (VEGF) (figura 6). A ativação de GLI é regulada através de fosforilação pelos inibidores SUFU, renina (Ren), proteína cinase A (PKA) e gliocogênio sintase cinase 3-  $\beta$  ( $GSK3\beta$ ) (CARBALLO et al., 2018).

Durante o desenvolvimento do cerebelo, células de purkinge secretam a proteína SHH, que atua na proliferação e migração de células granulares para a camada interna do cerebelo (GILBERTSON; ELLISON, 2008). Recentemente foi confirmado que tumores SHH apresentam similaridades com células precursoras granulares do cerebelo, sendo estas as prováveis células de origem destes tumores (GIBSON et al., 2010; VLADOIU et al., 2019). Mutações germinativas ou somáticas com perda de função ou deleção de *PTCH1* (43%) e *SUFU* (10%) e mutações ativadoras de *SMO* (9%) são as principais alterações genéticas observada em tumores SHH, assim como amplificação de *GLI2* (9%) e *MYCN* (7%). A ativação excessiva da sinalização SHH leva ao aumento da transcrição de genes regulados por *GLI2* induzindo a proliferação excessiva de células granulares e levando a formação do tumor (NORTHCOTT et al., 2019; SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015).

Outras alterações podem ser observadas em *TP53* e na sinalização através de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Em geral, alterações em p53 levam a

desregulação do ciclo celular, apoptose e reparo ao dano no DNA. Pacientes que apresentam mutações em *TP53* são classificados em grupos de alto risco e possuem prognóstico ruim. A sinalização aberrante de PI3K promove crescimento celular, proliferação e sobrevivência de células tumorais (NORTHCOTT et al., 2012). Mutações em *TERT* são identificadas em 39% dos pacientes com tumores SHH, porém as implicações destas mutações para estes tumores ainda permanecem desconhecidas (REMKE et al., 2013).



**Figura 6. Sinalização SHH em MB.** Na ausência do ligante SHH o receptor PTCH1 inibe o receptor SMO resultando na inibição de GLI no citoplasma pela proteína SUFU. A ligação de SHH a PTCH1 libera a inibição de SMO que sinaliza para ativação de GLI e MYCN resultando na transcrição de genes alvo no núcleo. Mutações em diferentes componentes da sinalização SHH podem contribuir para o surgimento de MB, promovendo o bloqueio da inibição de SMO por PTCH1 mesmo na ausência do ligante SHH e causando a ativação constitutiva desta via de sinalização.

### c. Modelos de estudo

Diversos modelos de camundongos transgênicos foram desenvolvidos para o estudo de tumores SHH. O primeiro modelo animal de MB utilizou a deleção do gene *Ptch1*. Camundongos homocigotos (*Ptch1<sup>-/-</sup>*) resultam em letalidade embrionária, no entanto, camundongos heterocigotos (*Ptch1<sup>+/-</sup>*) são viáveis e cerca de 14-19% desses animais desenvolve MB aos 10 meses de idade (GOODRICH et al., 1997). Deleções de *TP53* em camundongos *Ptch<sup>+/-</sup>* aumentam a incidência dos

tumores em 95-100% dos animais, com latência de 3 meses. A combinação da deleção em *PTCH1* com deleções no inibidor de cinase dependente de ciclina 2C (*CDKN2C*) e inibidor de cinase dependente de ciclina 1B (*CDKN1B*) conferiu um fenótipo celular mais agressivo a esses tumores (AYRAULT et al., 2009; UZIEL et al., 2005). Outros modelos foram desenvolvidos através da ativação constitutiva de *SMO* (HATTON et al., 2008), superexpressão de *MYCN* (SWARTLING et al., 2010) e deleção de *SUFU* (LEE et al., 2007), entre outros .

O modelo animal de MB “*Sleeping Beauty*” (SB) utiliza a integração de transposons aleatórios para o desenvolvimento tumoral (GENOVESI et al., 2013). Os transposons contém elementos que são capazes de superexpressar genes de interesse, dependendo da localização e orientação da inserção. A inserção de eventos é mediada através de transposases, que são limitadas as células precursoras granulares através do uso do promotor “*atonal bHLH transcription factor 1*” (*ATOH1*). A taxa de desenvolvimento de tumores nesse modelo é elevada, e frequentemente os camundongos também apresentam metástases aos 3 meses de idade (WU et al., 2012).

Algumas linhagens celulares foram identificadas com características similares aos tumores SHH como: Daoy, ONS-76, UW228 e UW426. Todas essas linhagens possuem o perfil transcricional similar a tumores SHH primários. A linhagem Daoy (JACOBSEN; JENKYN; PAPANIMITRIOU, 1985) é a linhagem celular mais utilizada, sendo citada em 45% dos trabalhos publicados. Está linhagem é tetraploide e possui mutações em *TP53* e deleção do inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*). A linhagem UW228, são na verdade 3 sublinhagens celulares (UW228-1, UW228-2 e UW228-3, possuindo características similares) isoladas da mesma amostra tumoral (KELES et al., 1995), é a segunda linhagem mais utilizada com características do subgrupo SHH, com 7% das citações, são aneuploides e também apresentam mutações em *TP53*. A evidência molecular para a linhagem UW228 pertencer ao subgrupo Shh tem como base a aplicação do painel com 22 genes do NanoString, que foi desenvolvido para a classificação molecular de amostras de MB (NORTHCOTT et al., 2012). A linhagem UW228 apresenta elevada expressão de dois dos cinco genes selecionados para a identificação do subgrupo SHH: Proteína LIM3 associada a Actina (*PDLIM3*) e

coativador de transcrição EYA e fosfatase 1 (*EYA1*), ambos genes são associados a ativação da sinalização SHH (TRISCOTT et al., 2013). *EYA1* é um regulador transcricional positivo da sinalização SHH e é necessário para a proliferação e morfogênese regulada por SHH durante o desenvolvimento (EISNER et al., 2015). Este gene promove o crescimento de MBs SHH. *PDLIM3* é importante para processos de diferenciação muscular e sua expressão é regulada positivamente através da ativação de SHH durante o desenvolvimento do SNC (WU et al., 2017). As linhagens ONS-76 (YAMADA et al., 1989) e UW426 também são utilizadas como modelo para estudo de tumores SHH, sendo que ONS-76 apresenta *TP53* normal e não se tem informações sobre o status de *TP53* para a linhagem UW426 (IVANOV et al., 2016).

- **Grupo 3**

- a. Características clínicas**

O subgrupo grupo 3 representa cerca de 20-25% de todos os pacientes com MB, sendo mais prevalente durante a primeira e segunda infância, e acometem duas vezes mais pacientes do sexo masculino em relação ao feminino (SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015). O grupo 3 é considerado o subgrupo mais agressivo e apresenta sobrevida de ~60% em cinco anos. A doença metastática é comum em 45% dos casos ao diagnóstico e representa prognóstico ruim aos pacientes deste subgrupo. Estes tumores são frequentemente localizados no quarto ventrículo próximo ao tronco encefálico (RAYBAUD et al., 2015).

Schwalbe *et al.* identificou dois subtipos grupo 3 e os subcategorizou em grupo 3-LR (baixo risco) e grupo 3-HR (alto risco). Pacientes com tumores grupo 3-LR apresentam metástases em 41% dos casos e sobrevida de 69% em 10 anos. Estes tumores apresentam elevado número de aberrações citogenéticas (7+, 14+, 18+, 4-,8-, 10-, 11-, 13-,15-, 16- e 21-) e exibem elevada expressão dos genes “FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6” (*FGD6*), repressor transcricional similar ao supressor de metástase de câncer de mama (*BRMS1L*), família com similaridade de sequência 122B (*FAM122B*) e “REV3 like, DNA directed polymerase zeta catalytic subunit” (*REV3L*). Pacientes do grupo 3-HR apresentam metástases em

33% dos casos e sobrevida global de 22% em 10 anos. Estes tumores exibem mutações no repressor de transcrição independente do fator de crescimento 1 (*GFI1*), amplificação de *MYC*, alterações cromossômicas (5+, 8+, 13+, isocromossomo [i17q] e 16q-) e aumento da expressão dos genes: onogene *PVT1* (*PVT1*), receptor de TNF associado a proteína 1 (*TRAP1*), “NmrA like redox sensor 1” (*NMRAL1*), centlein (*CNTLN*) e genes relacionados a biogênese de ribossomos (SCHWALBE et al., 2017).

Cavalli *et al.* subcategorizou o grupo 3 em três subtipos moleculares: Grupo 3- $\alpha$  (47%), grupo 3- $\beta$  (26%) e grupo 3- $\gamma$  (28%). Tumores grupo 3- $\alpha$  afetam crianças até os 10 anos de idade, estes pacientes apresentam metástases em 43.4% dos casos, no entanto apresentam o melhor prognóstico deste subgrupo, com sobrevida de 66.2% em cinco anos. Possuem diversas alterações cromossômicas como perdas nos cromossomos 8, 10 e 11 e ganho nos cromossomos 7 e i17q. Tumores grupo 3- $\beta$  acometem crianças mais velhas, apresentam poucos casos de metástases e sobrevida de 55.8% em cinco anos. As alterações moleculares mais comuns são: Elevada expressão de *GFI1/1B*, ganho de “orthodenticle homeobox 2” (*OTX2*) e perda da helicase de RNA dependente de ATP (*DDX31*) no cromossomo 9. Os tumores do grupo 3- $\gamma$  apresentam o pior prognóstico com sobrevida de 41.9%, 39.4% de metástases ao diagnóstico e são mais comuns em crianças mais novas. Estes tumores frequentemente apresentam amplificação de *MYC* e enriquecimento de i17q (CAVALLI et al., 2017). Metástases e amplificação de *MYC* conferem o pior prognóstico para pacientes do grupo 3, porém a influência da amplificação de *MYC* em pacientes não metastáticos ainda precisa ser determinada. Ganho no cromossomo i17q é encontrado em cerca de 40% dos pacientes desse subgrupo e apresentam prognóstico ruim (RAMASWAMY; TAYLOR, 2017).

Northcott *et al.* demonstrou a possibilidade da existência de oito subgrupos 3/4 sendo três destes caracterizados exclusivamente como grupo 3 (subtipos II, III e IV). Grupo 3-II correspondem e ~13% dos casos, acometem pacientes entre 3-16 anos e são mais comuns no sexo masculino (4:1). Metástases são frequentes em 57% dos casos e são observadas amplificação de *MYC*, ativação de *GFI1* e do repressor de transcrição independente do fator de crescimento 1B (*GFI1B*) e



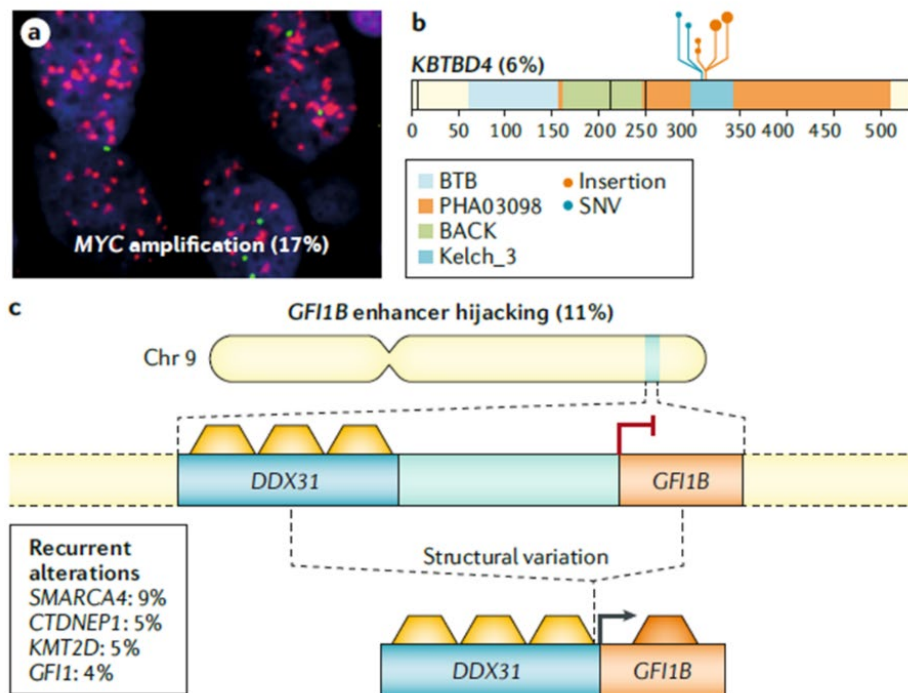
mutações nos genes “kelch repeat and BTB domain containing 4” (*KBTBD4*), *SMARCA4*, fosfatase de envelope nuclear CTD1 (*CTDNEP1*) e lisina metiltransferase 2D (*KMT2D*). O subtipo Grupo 3-III representa ~9% dos casos, também comum a faixa etária de 3-16 anos e mais frequentes no sexo masculino (4:1), possuem metástases em ~56% dos casos. Apresentam amplificação de *MYC* e *MYCN*. Tumores do grupo 3-IV acometem a faixa etária de >3 anos a 16 anos, são mais comuns no sexo masculino (3:2) e metástases são reportadas em 58% dos pacientes. Amplificação de *MYC* é uma das características observadas. Uma das características comuns a estes subtipos é que todos apresentam i17q (NORTHCOTT et al., 2017; SHARMA et al., 2019).

### **b. Biologia molecular**

O grupo 3 pode ser caracterizado transcricionalmente por ativação das vias de sinalização gabaérgica e de fotorreceptores (NORTHCOTT et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). Além disso, as assinaturas transcricionais e proteômicas deste grupo são associadas com a ativação de *MYC* (KOOL et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012). A amplificação deste oncogene também representa a alteração citogenética mais comum, que ocorre em 17% dos pacientes, no entanto é rara em outros subgrupos moleculares (NORTHCOTT et al., 2017). Em muitos casos pode ocorrer uma fusão entre o promotor *PVT1* e o segundo éxon do gene *MYC*. É provável que esta fusão crie uma loop de feedback positivo devido o promotor *PVT1* possuir sequências e-boxes que são ativadas pela proteína *MYC* (JONES et al., 2012; NORTHCOTT et al., 2012).

Outra característica molecular importante ao subgrupo 3 é a amplificação do fator de transcrição *OTX2*, que ocorre em 10% dos pacientes deste subgrupo, sendo mutuamente exclusiva à amplificação de *MYC* (BOULAY et al., 2017). *OTX2* é conhecido por seu papel no controle de diferenciação de várias células progenitoras durante o neurodesenvolvimento (BEBY; LAMONERIE, 2013). Em MB, *OTX2* é capaz de suprimir a diferenciação miogênica de células cancerosas, mantendo estas células em estado progenitor e promovendo a modulação do ciclo celular através de regulação gênica (BAI et al., 2012).

A regulação positiva de *GFI1* e *GFI1B* ocorre em 15-20% dos casos de MB do subgrupo 3 e sua expressão é mutuamente exclusiva (NORTHCOTT et al., 2019a). *GFI1* e *GFI1B* são fatores de transcrição repressores que atuam em diversos processos do desenvolvimento, principalmente na regulação do sistema hematopoiético. Estes fatores de transcrição são identificados como proto-oncogenes em diversos tipos de leucemia e linfoma (VAN DER MEER; JANSEN; VAN DER REIJDEN, 2010). Em MB, a ativação de *GFI1/GFI1B* não parece depender de rearranjos na região codificadora destes genes mas a justaposição destes fatores de transcrição em elementos do DNA não codificante, promovendo rearranjos regulatórios nos cromossomos 1 e 9 em diversos locus proximais ou distais e podem regular a ativação de *GFI1/GFI1B* (NORTHCOTT et al., 2014). Mutações somáticas neste subgrupo são menos comuns e são observadas em menos de 5% dos pacientes, entre os genes mutados estão *SMARCA4* (9% dos pacientes), *KBTBD4* (6%), *CTDNEP1* (5%) e *KMT2D* (5%) (figura 7) (NORTHCOTT et al., 2017). O grupo 3 apresenta extensiva aneuploidia, caracterizada frequentemente pelo i17q (quando o braço longo (q) é duplicado e o braço curto (p) é deletado). Além disso, também ocorre ganhos nos cromossomos 1q e 7, e perdas nos cromossomos 8, 10q e 16q (SHIH et al., 2014).



**Figura 7. Resumo das alterações prevalentes em MBs do grupo 3.** (a) Hibridização in situ de uma amostra de MB contendo elevados níveis de *MYC*. (b) “Hotspots” de mutações somáticas em *KBTBD4*. Os símbolos em pirulito indicam as posições de mutações recorrentes observadas em pacientes do grupo 3. (c) O esquema descreve as variantes estruturais recorrentes no cromossomo 9q que reposicionam intensificadores altamente ativos presentes em *DDX31* proximal ao *GFI1B*, levando a superexpressão de *GFI1B*. Obtido de: (NORTHCOTT et al., 2019).

### c. Modelos de estudo

Os principais modelos animais para o estudo de tumores do grupo 3 se baseiam na superexpressão do oncogene *MYC* (SWARTLING et al., 2010). A expressão condicional de *MYC* e deleção ou perda de função de *TP53* em modelos murinos induzem diferentes tipos de tumores a partir de diferentes células progenitoras embrionárias do cerebelo (PEI et al., 2012). Além disso, a amplificação de *MYC* em células progenitoras cerebelares com características de células tronco assim como progenitores neuronais gabaérgicos promovem a formação de tumores grupo 3 em camundongos. Estes modelos exibem tumores que se localizam próximo ao quarto ventrículo e apresentam histopatologia de células grandes/anaplásica, que

expressam características moleculares de tumores do grupo 3 (KAWAUCHI et al., 2017).

Modelos *in vivo* que promovem a ativação de *GFI1* e *GFI1B* também têm sido utilizados para o estudo do subgrupo 3. Estes animais geram tumores com elevada penetrância, que recapitulam características moleculares e fenotípicas de MBs do grupo 3 (NORTHCOTT et al., 2014; VO et al., 2017). Além disso, a superexpressão de *MYCN* em modelos transgênicos também produzem tumores molecularmente similares ao subgrupo 3 ou subgrupo SHH (PÖSCHL et al., 2014). Atualmente, modelos espontâneos que recapitem o desenvolvimento de tumores grupo 3 ainda não foram desenvolvidos e a maioria dos modelos disponíveis dependem da amplificação de *MYC*, o que não representa adequadamente a heterogeneidade molecular e clínica deste subgrupo, sendo ainda necessário o desenvolvimento de novos modelos (NORTHCOTT et al., 2019). Estudo recente aponta para uma provável origem de tumores de subgrupo 3 nas células tronco Nestina positivas do cerebelo (VLADOIU et al., 2019).

Existem diversas linhagens celulares disponíveis que foram classificadas molecularmente como grupo 3. Assim como os modelos animais, a maioria destas linhagens apresentam pouca heterogeneidade genética (IVANOV et al., 2016). As linhagens D341, D384, D458, D556, MHH-MED-2 e HD-MB03 apresentam amplificação de *MYC* e status de *TP53* normal (ALDOSARI et al., 2002; BIGNER et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1988; MILDE et al., 2012; PIETSCH et al., 1994). As linhagens D425, MB002, MB004 também apresentam amplificação de *MYC*, porém possuem status de *TP53* mutado ou não identificado (BANDOPADHAYAY et al., 2014; BIGNER et al., 1990). Algumas linhagens além de apresentarem amplificação de *MYC* também exibem a amplificação de *OTX2* ou fusão de *MYC-PVT1*, como no caso das células D487 e MED8A, respectivamente (IVANOV et al., 2016; LINDSEY et al., 2003; NORTHCOTT et al., 2012).

A linhagem D283 representa uma das linhagens celulares de MB mais antigas, tendo sido estabelecida em 1985 (FRIEDMAN et al., 1985), e são utilizadas em cerca de 19% dos estudos de MB. As principais características moleculares desta linhagem que estão associadas ao grupo 3 são a elevada expressão do receptor 5-

alfa do ácido gama-aminobutírico (GABRA5), e elevada expressão de c-MYC e OTX2. A expressão de GABRA 5 apresenta-se elevada em todos os subtipos do subgrupo 3, especialmente no subtipo 3- $\gamma$  que apresenta o pior prognóstico deste subgrupo (KALLAY et al., 2019). A linhagem D283 é provavelmente representativa dos grupos 3- $\beta$  ou 3- $\gamma$ , devido a elevada expressão de OTX2 e c-MYC, no entanto, esta linhagem não apresenta a amplificação de MYC, que representa assinatura característica do subtipo 3- $\gamma$ . Devido a isso, esta linhagem atualmente encontra-se classificada molecularmente como grupo 3/4 (IVANOV et al., 2016).

- **Grupo 4**

- a. Características clínicas**

O grupo 4 é o subgrupo molecular mais prevalente e representa cerca de 35% de todos os MBs, são mais comuns na população pediátrica entre 3 a 16 anos e apresentam histologia clássica (RUSERT et al., 2014; WANG et al., 2018). Tumores grupo 4 são frequentemente metastáticos ao diagnóstico e possuem prognóstico intermediário com sobrevida global de 75%. Similar aos tumores de grupo 3, tumores de grupo 4 são mais comuns no sexo masculino, apresentam-se localizados no quarto ventrículo próximo ao tronco encefálico e exibem alterações cromossômicas como i17q em 80% dos casos. No entanto, diferente do subgrupo 3, lesões com a presença de i17q não se correlacionam com prognóstico clínico (RAMASWAMY; TAYLOR, 2017; SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015).

Assim como os demais subgrupos moleculares, tumores de subgrupo 4 também apresentam heterogeneidade intra-tumoral. Schwalbe *et al.* categorizou o subgrupo 4 em dois subtipos assim como os tumores de grupo 3: Grupo 4-LR (baixo risco) e grupo 4-HR (alto risco). Pacientes com tumores grupo 4-LR apresentam sobrevida de 72% e metástases em 23% dos casos. Também apresentam amplificação de *MYCN* e elevada expressão dos genes: Proteína morfogênica óssea 5 (*BMP5*), “serine palmitoyltransferase long chain base subunit 3” (*SPTLC3*), cadeia de colágeno tipo IX alfa 3 (*COL9A3*) e “Zic family member 5” (*ZIC5*). Em pacientes do subtipo grupo 4-HR, a sobrevida é de 36% e metástases observadas em 30% dos casos. Este subtipo apresenta aumento da expressão dos genes

sinaptotagmina estendida 2 (*ESYT2*), “WD repeat domain 60” (*WDR60*), proteína cinase associada à morte 2 (*DAPK2*) e “PR/SET domain 6” (*PRDM6*). Ambos subtipos exibem i17q (SCHWALBE et al., 2017).

Cavalli et al. subdividiu o grupo 4 em 3 subtipos moleculares: Grupo 4- $\alpha$  (30%), grupo 4- $\beta$  (36%) e grupo 4- $\gamma$  (37%). Tumores grupo 4  $\alpha$  apresentam metástases em 40% dos casos e sobrevida global de 66.8%. As principais características moleculares são amplificação de *MYCN* e da cinase dependente de ciclina 6 (*CDK6*), também apresentam alterações cromossômicas como perda de 8p e ganho no cromossomo 7q. A amplificação de *MYCN* não está relacionada a pior prognóstico. Tumores grupo 4  $\beta$  exibem metástases em 40.7% dos casos, sobrevida em 5 anos de 75.4%, são enriquecidos em  $\alpha$ -sinucleína e possuem duplicação de “synuclein alpha interacting protein” (*SNCAIP*). No grupo 4  $\gamma$  as metástases ocorrem em 38.7% dos casos sendo a sobrevida estimada em 82.5%. Semelhante ao grupo  $\alpha$ , estes tumores também possuem alterações como deleção de 8p e ganho no cromossomo 7q, assim como amplificação de *CDK6*. O i17q encontra-se presente em todos os subtipos (CAVALLI et al., 2017; DOUSSOUKI; GAJJAR; CHAMDINE, 2019).

Northcott et al. subcategorizou exclusivamente como grupo 4 os subtipos grupo 4-VI (9%) e VIII (22%). Ambos subtipos são comuns na faixa etária de 3-16 anos, e metástases são frequentes em ~45-50% dos casos. No grupo 4-VI são observadas amplificação de *MYCN* e ativação de *PRDM6*, enquanto o grupo 4-VIII apresenta mutações na lisina demetilase 6A (*KDM6A*), “zinc finger MYM-type containing 3” (*ZMYM3*) e na lisina metiltransferase 2C (*KMT2C*) e ativação de *PRDM6* (NORTHCOTT et al., 2017; SHARMA et al., 2019). Os subtipos I (4%), V (8%) e VII (22%) deste estudo foram classificados como grupo 3/4 o que demonstra a biologia compartilhada destes tumores.

## **b. *Biologia molecular***

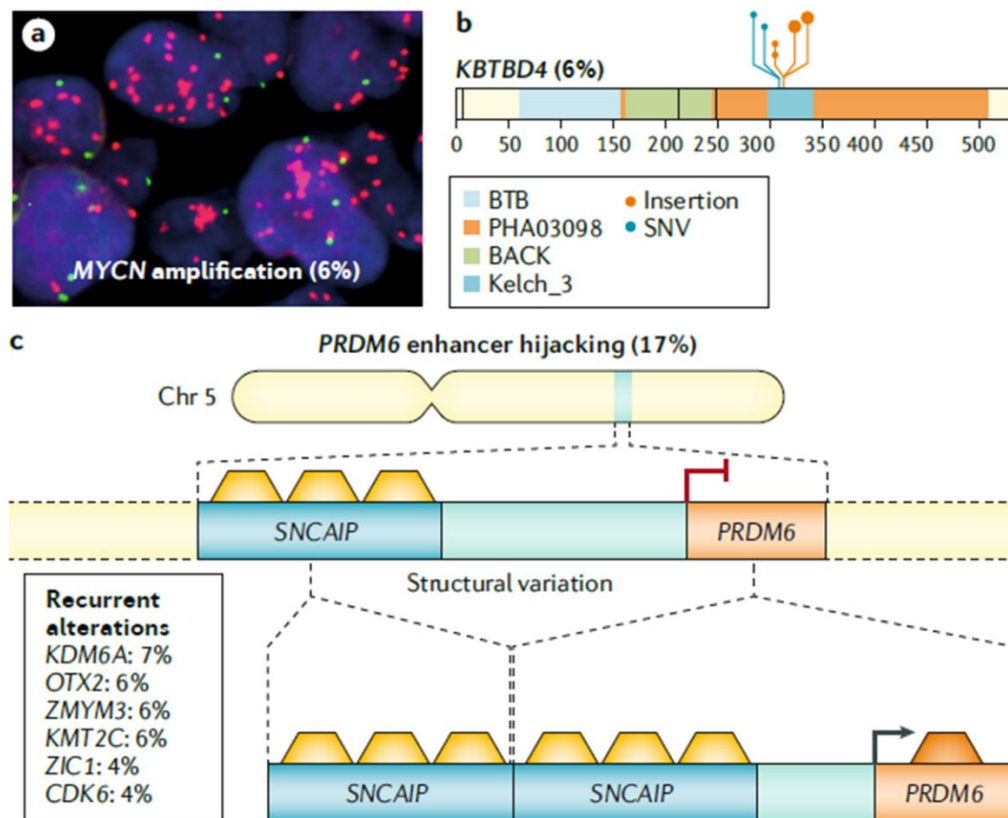
Os tumores do grupo 4 podem ser caracterizados transcricionalmente pela expressão de vias de sinalização neuronais e glutaminérgicas. As mutações somáticas em tumores deste subgrupo são pouco observadas, no entanto, algumas das alterações são observadas em genes modificadores de histonas (RAMASWAMY; TAYLOR, 2017). Os genes *KDM6A* (9%), *ZMYM3* (6%) e *KMT2C* (6%) apresentam mutações com perda de função, são geralmente mutuamente exclusivas no grupo 4 e raramente são encontradas em outros subgrupos. Estes 3 genes codificam proteínas modificadoras de cromatina, sugerindo que estas vias são importantes para a patogênese deste subgrupo, embora novos estudos ainda sejam necessários para a confirmação desta hipótese (NORTHCOTT et al., 2019).

Amplificações nos genes *MYCN* e *CDK6* são também observadas (SWARTLING et al., 2010; TIGAN et al., 2016). *CDK6* é um regulador do ciclo celular que juntamente com a cinase dependente de ciclina 4 (*CDK4*) promove a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular (LIM; KALDIS, 2013). O tratamento de modelos de MB com inibidores de CDK4-CDK6 demonstraram resultados promissores em estudos pré-clínicos (COOK SANGAR et al., 2017) e agora estão sendo testados em ensaios clínicos para pacientes com recidiva (NCT03434262).

Duplicações em tandem foram encontradas no gene *SNCAIP* que codifica a proteína alfa-sinucleína, esta proteína também se encontra envolvida na patogênese da doença de Parkinson, mas o seu papel em MB ainda precisa ser elucidado (NORTHCOTT et al., 2012, 2017). Estudos recentes demonstraram a superexpressão de *PRDM6* como um possível evento driver na patogênese do subgrupo 4, que ainda precisa ser futuramente investigado (NORTHCOTT; PFISTER; JONES, 2015; ROUSSEL; STRIPAY, 2018). *PRDM6* é uma proteína modificador da cromatina, que atua como repressor da transcrição em células progenitoras musculares e vasculares. Interessantemente, a superexpressão de *PRDM6* é bastante associada a duplicação de *SNCAIP*, que se encontra localizado a ~500 kb a montante do promotor de *PRDM6* (figura 8) (NORTHCOTT et al., 2019).

Alterações cromossômicas são também comuns ao subgrupo 4, especialmente ganhos nos cromossomos 7 (40-50% dos pacientes) e i17q (~80%), e deleções nos

cromossomos 8 (40–50%), 11 (>30%) e 17p (>75%) (NORTHCOTT et al., 2012c). Além disso, a sinalização por ERBB4-SRC tem sido proposta como uma nova assinatura para o subgrupo 4 (FORGET et al., 2018).



**Figura 8. Resumo das alterações prevalentes em MBs do grupo 4.** (a) Hibridização in situ em amostra de MB contando elevada expressão de MYCN. (b) “Hotspots” de mutações somáticas em KBTBD4. Os símbolos em pirulito indicam as posições de mutações recorrentes observadas em pacientes do grupo 4. (c) O esquema descreve as variantes estruturais recorrentes no cromossomo 5q que reposicionam intensificadores altamente ativos presentes em *SNCAIP* proximal ao *PRDM6*, levando a superexpressão de *PRDM6*. Obtido de: (NORTHCOTT et al., 2019).

### c. Modelos de estudo

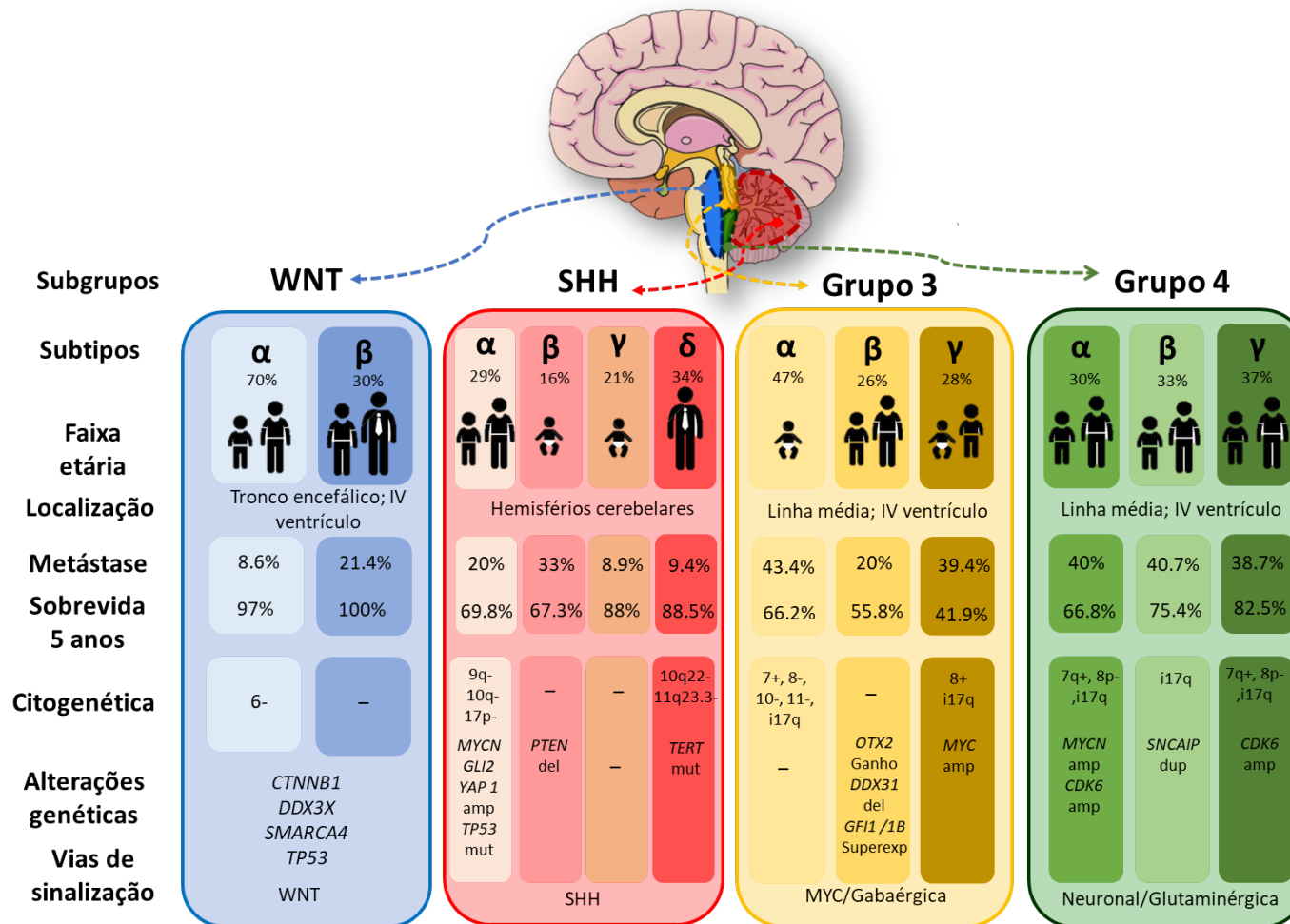
Embora o subgrupo 4 seja o mais prevalente dentre MBs, modelos transgênicos que representem estes tumores têm sido difíceis de desenvolver, principalmente devido ao conhecimento limitado de genes “drivers” e possíveis células de origem envolvidas na patogênese deste subgrupo (NORTHCOTT et al., 2019; SKOWRON; RAMASWAMY; TAYLOR, 2015). Recentemente foi demonstrado que as células de



tumores do subgrupo 4 são transcricionalmente similares a células unipolares em escova do cerebelo, que são interneurônios glutamatérgicos (VLADOIU et al., 2019).

Um dos modelos desenvolvidos que relembra características do grupo 4 foi criado por Swartling et al. Este camundongo expressa MYCN sobre controle do promotor transportador de glutamato 1 (Glt1) e um elemento de resposta a tetraciclina. Glt1 se encontra expresso no rombencéfalo em desenvolvimento, quando na presença de doxiciclina, MYCN é ativado e promove a formação de tumores em 75% dos camundongos (SWARTLING et al., 2010). No entanto, estes tumores também compartilham características moleculares do grupo 3, logo, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de modelos animais com características exclusivas ao subgrupo 4 (WANG et al., 2018).

Assim como os tumores em pacientes e modelos animais, muitas das linhagens celulares utilizadas para estudo do subgrupo 4 também apresentam características moleculares do subgrupo 3, e atualmente são classificadas como subgrupo 3/4. Como exemplos podem ser citadas as linhagens D283 (FRIEDMAN et al., 1985), D721 (ALDOSARI et al., 2002) e USP-13-MED (SILVA et al., 2016). As linhagens D283 e D721 apresentam superexpressão de MYC e exibem também superexpressão de OTX2, assim como a linhagem USP-13-MED (IVANOV et al., 2016). As linhagens CHLA-01-MED e CHLA-01RMED foram isoladas do mesmo paciente, são classificadas exclusivamente como grupo 4 e apresentam amplificação de MYC e mutações em *BRCA2* (XU et al., 2015).



**Figura 9. Resumo das características moleculares e clínicas de subgrupos e subtipos de MB.** Adaptado de: (CAVALLI et al., 2017). Amp: amplificado; mut: mutado; del: deletado; dup: duplicado.

**Tabela 2.** Características celulares e moleculares das linhagens de MB utilizadas neste estudo.

Características	UW228	D283
<b>Morfologia</b>	Epitelial <sup>1</sup>	Epitelial <sup>2</sup>
<b>Tecido de origem</b>	Cerebelo (9 anos, XX) <sup>1</sup>	Sítio metastático peritônio (6 anos, XY) <sup>2</sup>
<b>Tempo de duplicação</b>	33 horas <sup>1</sup>	52 horas <sup>2</sup>
<b>Subgrupo Molecular</b>	SHH <sup>3</sup>	Grupo 3/4 <sup>3</sup>
<b>Características moleculares</b>	↑PDLIM3 <sup>4</sup>	↑GABRA5 <sup>3</sup>
<b>Expressão de neurotrofinas e receptores</b>	↑EYA1 <sup>4</sup>	OTX2 <sup>5</sup>
	NGF, BDNF, TrkA, TrkB, TrkC <sup>6</sup>	NGF, BDNF, NT-3, TrkA, TrkB, TrkC <sup>6</sup>
<b>Status de p53</b>	Mutado (mutação AA T155N Substituição) <sup>7</sup>	Normal <sup>3</sup>
<b>Referências:</b> <sup>1</sup> Cellosaurus, <sup>2</sup> ATCC, <sup>3</sup> Ivanov <i>et al.</i> , 2016, <sup>4</sup> Triscott <i>et al.</i> , 2013, <sup>5</sup> Stromecki <i>et al.</i> , 2018, <sup>6</sup> Chiappa <i>et al.</i> , 1999, <sup>7</sup> Kunkele <i>et al.</i> , 2012.		

#### 1.3.4. Diagnóstico, estratificação de risco e tratamentos

Pacientes com MB podem apresentar sintomas inespecíficos e são frequentemente difíceis de diagnosticar. Os principais sintomas observados são dores de cabeça, mal-estar geral, falta de apetite, náusea e vômitos, tontura, cansaço ou baixo desempenho escolar, que pode ser associado ao aumento da pressão intracranial ou efeito direto do tumor (MILLARD; DE BRAGANCA, 2016; WILNE *et al.*, 2007). Estes sintomas podem ser intermitentes no início, mas tendem a intensificar em semanas ou poucos meses. Sintomas mais específicos ao MB são ataxia, dificuldades motoras, problemas de visão ou estrabismo. Pacientes com metástase leptomeníngea ao diagnóstico podem apresentar sintomas adicionais como dores nas costas e dificuldades de locomoção. Devido ao crescimento acelerado do tumor, os sintomas podem piorar rapidamente (WILNE *et al.*, 2012).

O diagnóstico de MBs é baseado nos sintomas clínicos, ressonância magnética do cérebro e coluna vertebral, para a investigação do tumor primário e potenciais sítios metastáticos, citologia do líquido cefalorraquidiano (LCR) para detecção de metástases microscópicas assim como histologia e análises moleculares da massa tumoral (CASSIA et al., 2018). Os MBs foram historicamente categorizados clinicamente como risco intermediário ou alto risco, no entanto, um consenso foi estabelecido em uma reunião em Heidelberg em 2015 e uma nova estratificação considerando características moleculares e critérios prognósticos foi estabelecida para pacientes de 3 a 17 anos (tabela 3) (RAMASWAMY et al., 2016). Esta nova estratificação de risco permite o escalonamento da terapia em pacientes de baixo risco. Além disso, a classificação de Chang (CHANG; HOUSEPIAN; HERBERT, 1969) fornece o estadiamento de doença metastática (tabela 4).

**Tabela 3.** Atual classificação de risco de MBs.

Subgrupos	Estratificação de Risco (% de sobrevivência)			
	Baixo (<90%)	Intermediário (70-90%)	Alto (50-75%)	Muito alto (<50%)
<b>WNT</b>	Não metastático			
<b>SHH</b>		Não metastático, <i>TP53</i> normal e sem amplificação de <i>MYC</i>	Metastático e <i>TP53</i> normal ou não metastático e com amplificação de <i>MYC</i>	<i>TP53</i> mutado
<b>Grupo 3</b>		Não metastático e sem amplificação de <i>MYC</i>		Metastático e com amplificação de <i>MYC</i>
<b>Grupo 4</b>	Não metastático e com deleção do cromossomo 11	Não metastático e sem deleção do cromossomo 11	Metastático	

Revisado de: (KUZAN-FISCHER; JURASCHKA; TAYLOR, 2018; RAMASWAMY et al., 2016)

**Tabela 4.** Estadiamento de MBs de acordo com a classificação de Chang.

Classificação de Chang				
M0	M1	M2	M3	M4
Sem evidência de metástases em MRI e LCR	Tumores microscópicos são detectados em LCR	Lesão metastática intracranial pode ser observada fora do sítio primário por MRI	Lesão metastática no espaço subaracnóide	Metástase fora do eixo cérebro-espinhal

Revisado de: (NORTHCOTT et al., 2019).

O tratamento para MBs se baseia em cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia. A ressecção cirúrgica total ou parcial é o primeiro passo no tratamento de todos os casos de MB, antes de radioterapia e quimioterapia adjuvante (PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002). A extensão da ressecção cirúrgica é também considerada um fator prognóstico, sendo a ressecção parcial consistentemente associada com pior prognóstico quando comparada a ressecção total ou quase completa (THOMPSON et al., 2018). Cirurgias secundárias também devem ser consideradas sempre que possível, no entanto, ressecção excessiva deve ser evitada devido ao alto risco de danos as estruturas como nervos craniais e tronco cerebral, assim como risco de mutismo cerebelar (SCHREIBER et al., 2017).

Devido a propensão de metástases dentro do sistema nervoso central, pacientes com MB recebem irradiação completa do eixo cranioespinhal com impulso focal na localização primária do tumor. Anteriormente ao uso de radioterapia cranioespinhal, MBs eram doenças incuráveis. Entretanto, devido à efeitos adversos permanentes como; problemas neurocognitivos, disfunções neuroendocrinológicas, alterações no crescimento, infertilidade e tumores secundários, a redução da radioterapia têm sido constantemente proposta, especialmente em crianças menores de 3 anos (DESOUZA et al., 2014; NORTHCOTT et al., 2019).

Pacientes de risco intermediário recebem radioterapia cranioespinhal (23.4 Gy) seguida pulsos na fossa posterior (54 Gy, por mais de 6 semanas) com ou

sem quimioterapia com vincristina. Após a radioterapia, crianças maiores de 3 anos sem doença metastática recebem de 4 a 9 ciclos de vincristina, cisplatina e dois agentes alquilantes (ciclofosfamida ou lomustina) por aproximadamente 1 ano. Estes pacientes apresentam sobrevida de ~80% (PACKER et al., 2006). Pacientes de risco alto recebem doses mais altas de radioterapia (36-39 Gy) seguida de pulsos na fossa posterior (50-54 Gy, por mais de 6 semanas) e quimioterapia (agentes utilizados incluem cisplatina, ciclofosfamida e vincristina) (LANNERING et al., 2012). Em caso de recorrência após terapia inicial, o prognóstico de pacientes com MB permanece muito ruim, com sobrevida de 10% em cinco anos após recorrência, incluindo pacientes de risco intermediário (JOHNSTON et al., 2018; SABEL et al., 2016).

A qualidade de vida de sobreviventes de longo prazo de MB também é uma questão importante, e a maioria dos pacientes que sobrevivem apresentam sequelas neurológicas e cognitivas substanciais em decorrência do tratamento multimodal (PACKER; VEZINA, 2008). Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias ainda se faz extremamente necessário.

### **1.3.5. Avanços recentes e perspectivas terapêuticas**

O recente entendimento da complexa biologia molecular dos MBs tem proporcionado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e ensaios clínicos condizentes com a heterogeneidade destes tumores. Novos protocolos de tratamento para pacientes do subgrupo WNT estão sendo desenvolvidos com o objetivo de reduzir as doses de radioterapia e quimioterapia nestes casos (NCT01878617). Além disso, a utilização de inibidores de histonas desacetilases (HDAC) como pabinostate têm sido considerados em investigações pré-clínicas em tumores WNT (NORTHCOTT et al., 2012).

Estudos clínicos de fase I e II têm sido realizados para avaliar a utilização de vismodegibe (GDC-0449, inibidor de SMO) em pacientes pediátricos e adultos com MB SHH recorrentes. Foi observado que este tratamento foi eficaz apenas em pacientes SHH recorrentes, no entanto, esta resposta foi de curta

duração, pois os pacientes desenvolveram resistência a esta terapia alvo. Pacientes com mutações em SUFU e GLI2 não se beneficiaram desta terapia (GAJJAR et al., 2013; ROBINSON et al., 2015). Além disso, inibidores de SMO são recomendados apenas para pacientes com esqueleto ósseo maduro, já que pacientes com esqueleto ósseo imaturo desenvolveram fusões prematuras das epífises com o uso deste fármaco (DOUSSOUKI; GAJJAR; CHAMDINE, 2019). O estudo SJMB12 (NCT01878617) está atualmente avaliando prospectivamente pacientes com MB SHH clinicamente definidos como risco baixo, intermediário, alto risco com tratamento de manutenção com vismodegibe após quimioterapia em crianças maiores de 12 anos de idade. Dentre os alvos de estudos pré-clínicos são promissores os inibidores de GLI2 (trióxido de arsênio) (KIM et al., 2013), inibidores de bromodomínio (TANG et al., 2014), inibidores de auracinas (GUSTAFSON et al., 2014) e inibidores de PI3K (CHATURVEDI et al., 2018).

O desenvolvimento de novas terapias para pacientes com MB grupo 3 é especialmente necessário devido ao pior prognóstico destes tumores. O estudo clínico em andamento SJMB12 (citado anteriormente) também está testando a efetividade das terapias com pemetrexede e gemcitabina (MORFOUACE et al., 2014). Como terapias experimentais promissoras podem ser citados inibidores de bromodomínio, inibidores de histonas demetilases (HDM) com alvos em EZH2 e KDM6A (VO et al., 2017), inibidores de HDAC e inibidores de PI3K em tumores com amplificação de MYC (PEI et al., 2016).

Atualmente não existem estudos clínicos em andamento para MBs grupo 4. Porém a sobreposição molecular observada entre os grupos 3 e 4 pode ser útil na extrapolação de terapias futuras para este subgrupo (DOUSSOUKI; GAJJAR; CHAMDINE, 2019; GAJJAR; ROBINSON, 2014).

#### **1.4. Neurotrofinas e seus receptores**

As neurotrofinas são fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso de vertebrados. Estas proteínas estão

implicadas em diferentes funções que incluem sobrevivência, proliferação, diferenciação, mielinização, apoptose, crescimento axonal e dendrítico, conexões e estruturas sinápticas, liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica (HUANG; REICHARDT, 2001; REICHARDT, 2006; STOLERU et al., 2013). Estes fatores são inicialmente sintetizados como precursores, pro-neurotrofinas, que são clivados por furinas ou pro-covertases intracelularmente, ou extracelularmente por proteases como plasmina e metalopeptidases (MMP-3 e MMP-7) para produzir proteínas maduras com aproximadamente 12kDa que formam dímeros estáveis e não-covalentes (CHAO, 2003).

Em mamíferos, a família de neurotrofinas consiste no fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofinas-4/5 (NT-4/5) (HUANG; REICHARDT, 2003; SOPPET et al., 1991). NGF foi o primeiro fator de crescimento a ser identificado e caracterizado em 1950, por Levi-Montalcini em colaboração com Stanley Cohen, tendo sido identificado em sarcoma de camundongos que quando transplantados para embriões de galinha induziram o crescimento acentuado de fibras nervosas periféricas. NGF foi purificado a partir da glândula submandibular de camundongos, que expressam níveis elevados desta proteína (ALOE, 2004). O gene humano que codifica o NGF possui 5 éxons, sendo que apenas o éxon IV é responsável pela codificação de pre-pro-NGF (figura 10). NGF é expresso em células neuronais e não neuronais no SNC e SNP. Neurônios hipocámpais e corticais, que são alvos de inervação colinérgica, são as células que expressam os mais elevados níveis de RNAm (RNA mensageiro) de NGF no cérebro (METSIS, 2001). A expressão de NGF é regulada por atividade neuronal e por estímulos inflamatórios. A principal função biológica do NGF é a manutenção e sobrevivência de neurônios pós-mitóticos, além disso, é importante no desenvolvimento de diversas regiões do sistema nervoso central e periférico (ALOE et al., 2012; SOFRONIEW; HOWE; MOBLEY, 2001).

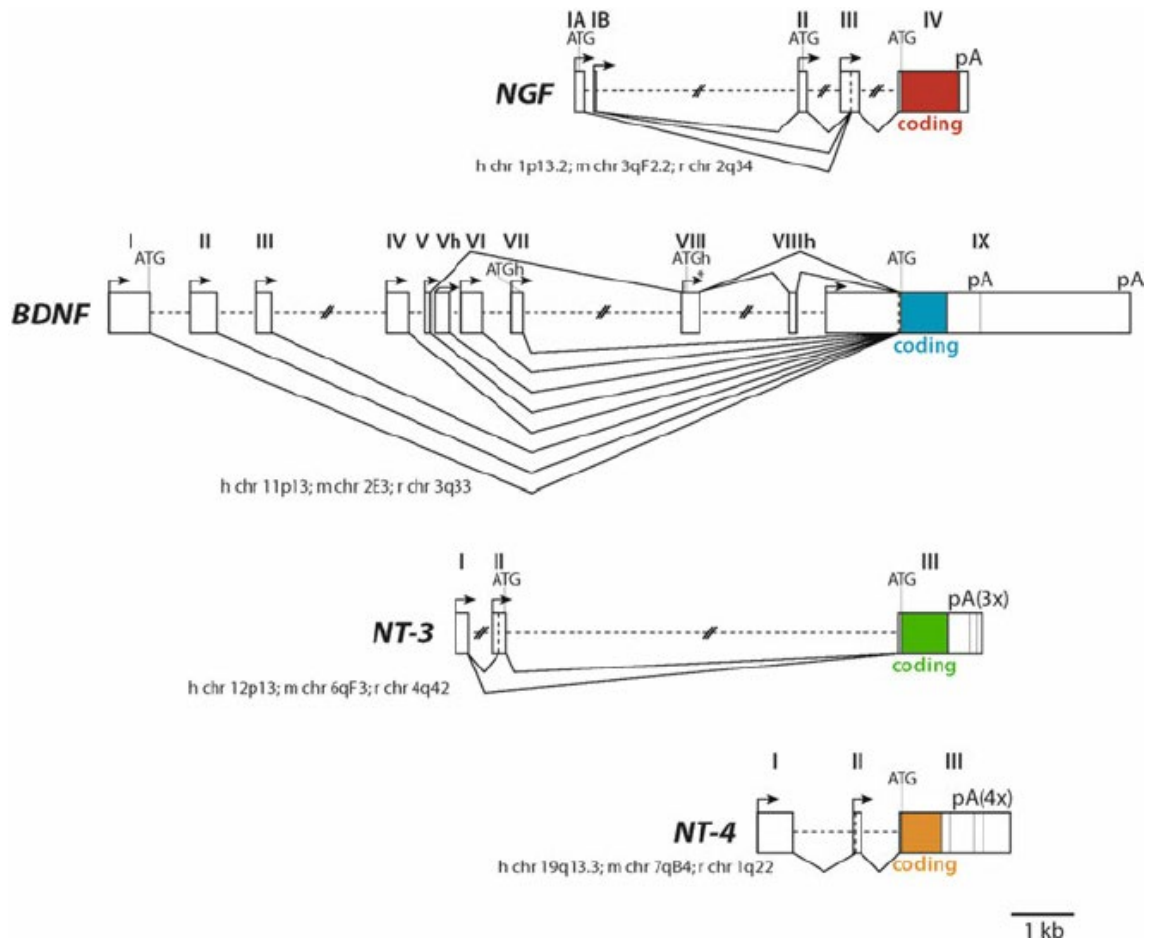
BDNF foi a segunda neurotrofina a ser descoberta, tendo sido purificada a partir de cérebro de porco em 1982 por Yves-Alain Barde e Hans Thoenen (BARDE; EDGAR; THOENEN, 1982; LEIBROCK et al., 1989). O gene humano



responsável pela codificação do BDNF possui 11 éxons (figura 10), que através de splicings alternativos promovem a formação de transcritos específicos a cada tecido e que respondem a estímulos diversos (TIMMUSK et al., 1993). Durante o desenvolvimento, a expressão de BDNF é mais abundante no sistema nervoso quando comparado a outros tecidos e seus níveis estão aumentados no cérebro pós-natal. Em adultos, BDNF apresenta um amplo padrão de distribuição no cérebro, sendo detectado principalmente no hipocampo, amígdala, córtex cerebral e hipotálamo (KATOH-SEMBA et al., 1997). BDNF também pode ser detectado em tecidos fora do sistema nervoso, como: coração, pulmão, timo, fígado, baço e músculo (MAISONPIERRE et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1996). A regulação da transcrição de BDNF pode ser realizada por diferentes estímulos incluindo estímulos isquêmicos e hipoglicêmicos, axotomia de nervos periféricos, estresse, tratamento antidepressivo entre outros. No entanto, o estímulo mais potente para a indução da transcrição de BDNF é a atividade neuronal. Sua função difere dependendo tanto do estágio de desenvolvimento do cérebro, bem como os constituintes neuronais, gliais ou vasculares do tecido cerebral. Entre as principais funções do BDNF pode-se destacar seu papel no desenvolvimento, regulação de sinaptogênese, neuroproteção, controle de potenciação de longa e curta duração que influenciam mecanismos de memória e cognição (GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN; ESCOBAR, 2013; GONZALEZ et al., 2016; HUANG; REICHARDT, 2003).

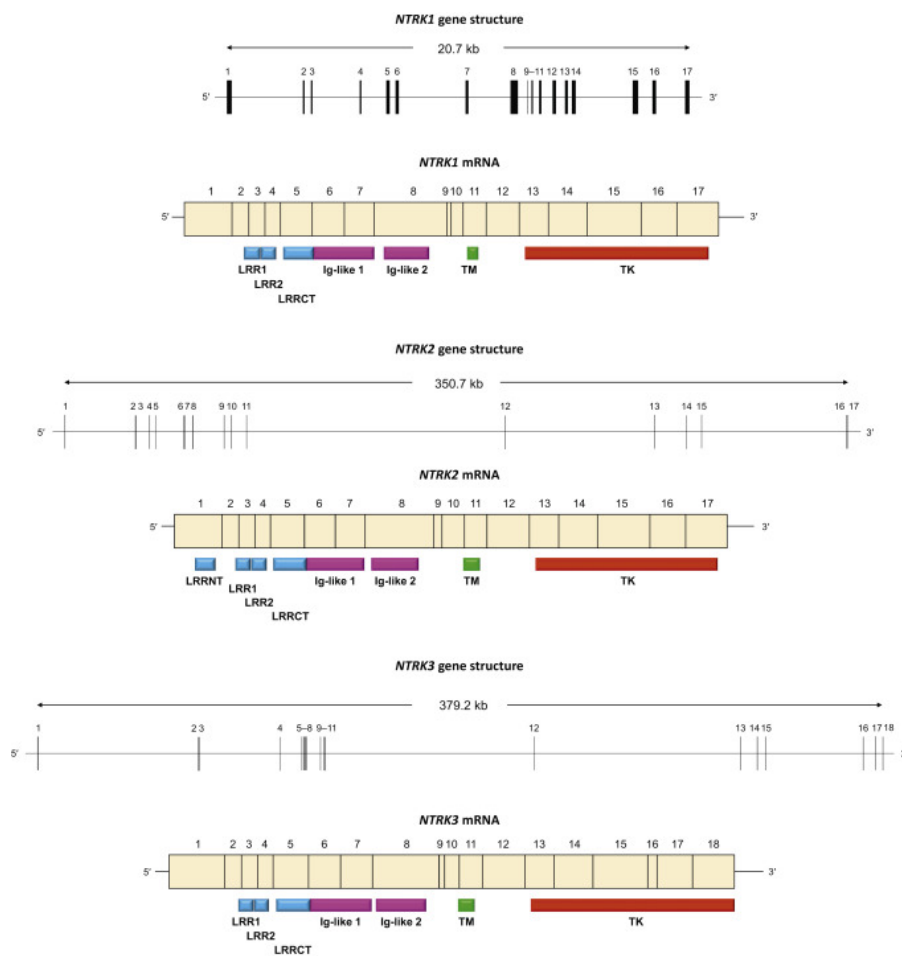
NT-3 e NT-4/5 foram identificados por PCR a partir da utilização de nucleotídeos degenerados com sequências relacionadas a NGF e BDNF (HOHN et al., 1990; MAISONPIERRE et al., 1990). O gene *Ntf3* possui 3 éxons e codifica diversos transcritos de RNAm de NT-3 (figura 10). NT-3 é amplamente expressa em tecidos não neuronais durante o desenvolvimento e em geral seus níveis estão reduzidos em tecidos adultos. No sistema nervoso, NT-3 é mais expressa durante o desenvolvimento regulando processos de proliferação, diferenciação e migração de precursores neuronais (KENDALL et al., 2001). NT-3 desenvolve papel importante no desenvolvimento cerebelar onde a sua expressão pode ser regulada por BDNF (BATES et al., 1999). O gene *Ntf4* que codifica NT-4/5 compreende 3 éxons e apresentam dois promotores alternativos à montante dos

éxons I e II (figura 10) (SALIN et al., 1997). NT-4/5 é amplamente expressa no músculo esquelético embrionário e adulto, assim como em células neuronais e não neuronais da coluna vertebral, em contraste aos níveis detectados no SNC. A expressão de NT-4/5 pode ser promovida pela indução de estímulo elétrico no músculo e está envolvida em mecanismos de manutenção e desempenho de conexões neuromusculares (WEST; PRUUNSILD; TIMMUSK, 2014).



**Figura 10. Estrutura dos genes de neurotrofinas em mamíferos.** Os dados incluem a localização dos genes nos cromossomos humanos (h), camundongos (m) e ratos (r). Todos os genes de neurotrofinas consistem em múltiplos éxons 5' ligados a promotores que iniciam a transcrição de RNA mensageiros distintos. Como característica comum, o éxon 3' compreende a fase de leitura aberta (Open Reading frame, ORF), representado pelas caixas coloridas que codificam cada pré-pro-neurotrofina. O início de cada ORF é marcado pelo códon de iniciação da tradução ATG. As linhas tracejadas horizontais representam íntrons. Linhas tracejadas horizontais dentro de éxons indicam locais aceitadores de splicings alternativos. Padrões de splicings são mostrados por linhas que ligam os éxons. O local do início de transcrição é indicado por uma seta em cada éxon. Obtido de: (WEST; PRUUNSILD; TIMMUSK, 2014).

Existem dois tipos de receptores conhecidos para neurotrofinas, os receptores tropomiosina cinases (Trks) e o receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR, CD271) (HUANG; REICHARDT, 2001). Em 1982, o receptor neurotrófico de tirosina cinase 1 (*NTRK1*) foi identificado como um oncogene por Mariano Barbacid *et al.* em câncer de cólon (PULCIANI *et al.*, 1982). Em 1989 este grupo descreveu TrkA como o produto de *NTRK1* (KLEIN *et al.*, 1991), que foi o primeiro membro da família de Trks, que também incluem os genes *NTRK2* e *NTRK3* que codificam TrkB e TrkC respectivamente (figura 11) (SOPPET *et al.*, 1991).



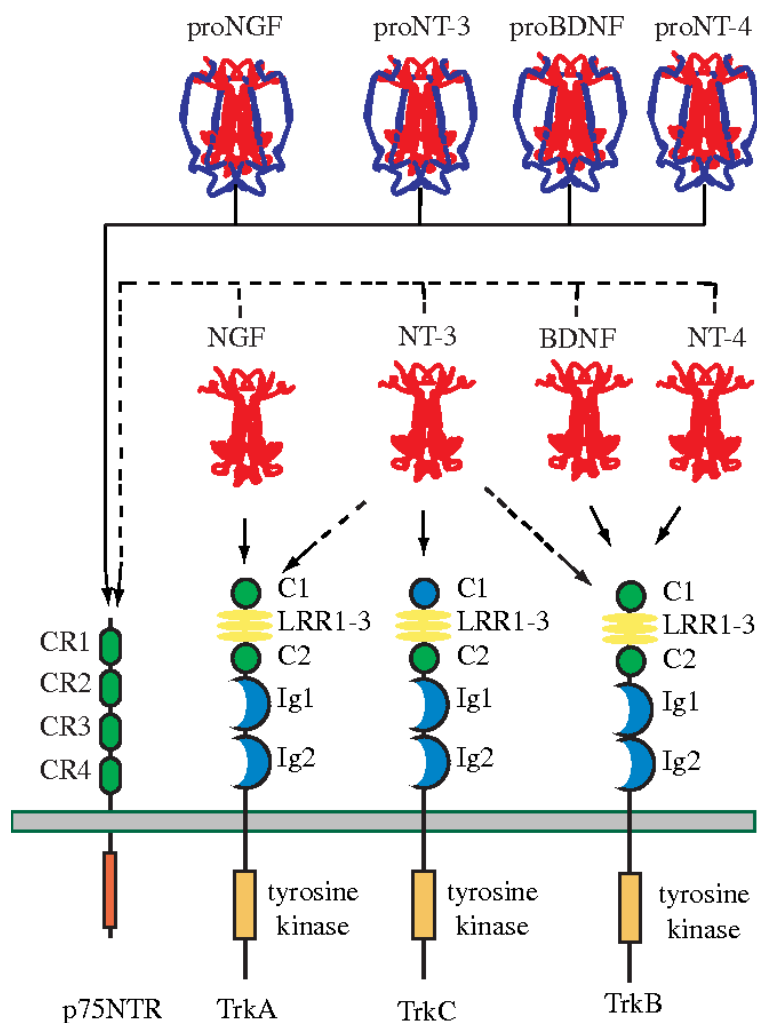
**Figura 11. Estrutura dos genes *NTRK*.** Os genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3* estão localizados nos cromossomos humanos nas regiões 1q23.1, 9q21.33 e 15q25.3, a figura mostra os éxons que codificam as isoformas canônicas de Trks. As caixas coloridas marcam a localização correspondente ao RNA mensageiro que codifica essas regiões. Obtido de: (HSIAO *et al.*, 2019)

Os Trks são receptores do tipo tirosina cinases que estruturalmente contém regiões extracelulares e intracelulares separadas por um domínio transmembrana. Os 3 receptores Trks compartilham elevado grau de homologia estrutural, incluindo 3 motivos ricos em leucina, flanqueados por 2 domínios de cisteína e dois domínios imunoglobulina tipo C2 (Ig-C2), localizados na região extracelular destas proteínas. A região citoplasmática contém o domínio cinase (DEINHARDT; CHAO, 2014). Cada neurotrofina demonstra afinidade pela ligação a um receptor específico; NGF se liga seletivamente ao receptor tirosina cinase A (TrkA), BDNF e NT-4/5 ao TrkB e NT-3 ao TrkC (figura 12). NT-3 também pode se ligar aos receptores TrkA e TrkB (SKAPER, 2012). A indução de diferentes isoformas de Trk a partir de splicings alternativos leva a expressão de receptores que são funcionalmente distintos (BRODEUR et al., 2009).

No geral Trks são altamente expressos em células de origem neuronal, e regulam a sobrevivência e diferenciação destas células durante o desenvolvimento. A atividade de Trks também é importante em tecidos adultos para a manutenção do crescimento e função de sinapses neuronais (NAKAGAWARA, 2001). Estes receptores também se encontram expressos em células de origem não neuronal incluindo astrócitos, oligodendrócitos, células imunes, células endócrinas e fibras musculares lisas e estriadas (MELDOLESI, 2017). TrkA se encontra expresso no sistema nervoso embrionário e adulto, onde controla a sobrevivência e diferenciação de neurônios. O papel de TrkA também é bastante estudado na modulação de dor, inflamação e no desenvolvimento e manutenção de neurônios colinérgicos, simpáticos e sensoriais (INDO, 2014). A expressão de TrkB é elevada no córtex pré-frontal, amígdala e lobo occipital, e sua ativação por BDNF é frequentemente associada a plasticidade e sobrevivência neuronal (BINDER; SCHARFMAN, 2004; TEJEDA; DÍAZ-GUERRA, 2017). TrkC também é conhecido pela promoção de sobrevivência e diferenciação neuronal e sua ativação previne estímulos pró-apoptóticos (HUANG; REICHARDT, 2001; REICHARDT, 2006).

Todas as neurotrofinas podem se ligar ao p75NTR com baixa afinidade, este receptor pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF), codificado pelo gene receptor de NGF (*NGFR*) e foi o primeiro receptor identificado para NGF

(PEREIRA; CHAO, 2008). As pro-neurotrofinas (pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT-3 e pro-NT-4/5) foram identificadas como ligantes de alta afinidade para p75NTR em complexo com os co-receptores sortilina, nogo e “leucine rich repeat and Ig domain containing 1” (LINGO-1) (ESPOSITO et al., 2001). P75NTR também pode se ligar diretamente aos Trks e esta interação pode modular a função destes receptores e sua responsividade a neurotrofinas. Por exemplo, a presença de p75NTR resulta em aumento da associação de NGF ao TrkA. Adicionalmente, a expressão de p75NTR aumenta a especificidade de TrkB pelo ligante BDNF e elimina parcialmente a ubiquitinação dos receptores TrkA e TrkB, adiando a sua degradação e promovendo efeitos de crescimento e sobrevivência (CHAO, 2003). Estes estudos indicam que os efeitos das neurotrofinas em p75NTR dependem da concentração de neurotrofinas e dos tipos de receptores disponíveis expressos em diferentes estágios do desenvolvimento. Em contraste a neurotrofinas maduras, as pro-neurotrofinas ao se ligarem ao complexo p75NTR-sortilina geralmente ativam vias de apoptose e morte celular. Processos celulares mediados por p75NTR contribuem de diferentes formas para o desenvolvimento, maturação e manutenção do sistema nervoso (HUANG; REICHARDT, 2003).



**Figura 12. Principais interações entre neurotrofinas e seus receptores.** Obtido de: (REICHARDT, 2006).

### 1.5. Vias de sinalização moduladas por neurotrofinas

A ligação de neurotrofinas aos Trks promove a homodimerização dos receptores na membrana plasmática, que permite a fosforilação de resíduos de tirosina citoplasmáticos de um receptor Trk para seu receptor cognato (CHAO, 2003). Os Trks possuem 10 domínios de tirosina conservados evolutivamente, 3 destes; Y670, Y674 e Y675 (nomenclatura TrkA humano) se localizam no loop de ativação do domínio que controla a atividade cinase, sendo responsável pela ativação do receptor (HUANG; REICHARDT, 2001). Em seguida, a fosforilação de outros resíduos de tirosina promove a criação de sítios de ligação para

proteínas adaptadoras citosólicas que levam a ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares. Dentre as principais vias de sinalização envolvidas na resposta de neurotrofinas estão a cascata da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), a sinalização por PI3K e a sinalização por fosfolipase C-  $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ ) (figura 13) (HUANG; REICHARDT, 2003). Curiosamente, um trabalho recente propôs um novo modelo de ativação de TrkB, em que este atua como um receptor monomérico na membrana plasmática, independentemente da sua ligação com BDNF e ativação inicial, ativando a sinalização por ERK1/2. A dimerização de TrkB ocorre apenas após a internalização de monômeros do receptor mediada pela proteína dinamina. Os dímeros de TrkB são localizados em endossomas juntamente com BDNF e promovem a sinalização via PI3K (ZAHAVI et al., 2018). A ativação de Trks também pode ser mediada na ausência de neurotrofinas por receptores acoplados a proteína G (LEE et al., 2002).

A ligação de neurotrofinas ao receptor p75NTR pode promover a ativação de vias de sinalização que regulam apoptose ou sobrevivência (figura 13). Os efeitos de sobrevivência são mediados pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB) e Proteína cinase B (AKT) (CARTER et al., 1996; ROUX et al., 2001) e os estímulos pro-apoptóticos são regulados pela via cinase N-terminal c-Jun (JNK) (LIN et al., 2015; MILLER; KAPLAN, 2001). P75NTR também pode ativar pequenas proteínas G, Rac GTPase (Rac) e rodopsina (Rho), que afetam diretamente a motilidade celular (HUANG; REICHARDT, 2003).

### **1.5.1. Sinalização MAPK**

A ativação de Ras GTPase (Ras) e MAPK ocorre a partir da fosforilação do resíduo Y490 que inicia o recrutamento e fosforilação da proteína adaptadora “Src-homology collagen protein” (Shc) e domínio de ligação a fosfotirosina (PTB) pelo receptor Trk, resultando no recrutamento da proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (Grb2), Ras e “son of sevenless” (SOS) (HUANG; REICHARDT, 2003). Estes adaptadores promovem a ativação de Ras, que estimula diversas vias intracelulares incluindo Raf cinase (Raf), proteína cinase 38 ativada por mitógeno (p38) e PI3K (XING et al., 1998). Raf é responsável pela

ativação da cinase ativadora da MAP cinase (MEK), que em sequência ativa ERK. ERK é translocada para o núcleo, onde a ativa a transcrição da proteína de ligação ao elemento responsivo AMP-c 1 (CREB), proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 1/3 (*STAT1/3*), fator de transcrição ETS (ELK1) e *Myc*, modulando a expressão de genes reguladores de proliferação e diferenciação (TAN; THIELE; LI, 2014). Se a resposta a ligação de neurotrofinas induzirá estímulos de proliferação ou diferenciação parece estar relacionado ao efeito transitório ou prologado da ativação de ERK (REICHARDT, 2006).

### **1.5.2. Sinalização PI3K**

Os receptores Trk podem ativar PI3K através de dois diferentes mecanismos, cuja importância difere entre subpopulações neuronais. Em diversos neurônios a ativação de PI3K dependente de Ras é a via de sinalização pelo qual neurotrofinas promovem a sobrevivência celular (CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). Em algumas células, entretanto, PI3K pode ser ativada através de mecanismos independentes de Ras. A fosforilação de Y490 permite o recrutamento de Shc, que permite a ligação da proteína de ligação 1 associada à GRB2 (Gab1) e do substrato do receptor do fator de crescimento de fibroblasto 2 (Frs2) permitindo a ativação de PI3K (BRODEUR et al., 2009). Produtos lipídicos gerados por PI3K, como fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), recrutam proteínas incluindo piruvato desidrogenase cinase (PDK). AKT é ativada por PDK na membrana plasmática e fosforila diversas proteínas que regulam sobrevivência celular (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999). AKT inativa o fator de transcrição “forkhead box O1” (FOXO1), GSK-3b e a proteína promotora de morte associada a BCL-2 (BAD) envolvidos na regulação de estímulos pró-apoptóticos. AKT promove a fosforilação de proteínas envolvidas na modulação da sobrevivência celular como a proteína alvo da rapamicina (mTOR), que é importante para síntese de proteínas, “mouse double minute 2 homolog” (MDM2) que é um importante regulador negativo da proteína supressora tumoral p53 e ativa a transcrição de NF-KB (TAN; THIELE; LI, 2014). A ativação de PI3K por



neurotrofinas, também estimula vias de sinalização relacionadas a motilidade celular e aumenta a produção de VEGF (KARAR; MAITY, 2011).

### **1.5.3. Sinalização PLC- $\gamma$**

A ativação de PLC-  $\gamma$  por neurotrofinas depende da fosforilação do resíduo Y785 em TrkA e de resíduos análogos em TrkB e TrkC. A fosforilação deste resíduo recruta diretamente PLC-  $\gamma$  para a membrana plasmática, onde é ativado por fosforilação e então atua na hidrólise fosfatidil inositídeos para produzir IP3 e D-1,2-Diacilglicerol (DAG) (CHOI et al., 2001). A presença de IP3 promove a liberação de reservas de  $Ca^{+2}$ , aumentando os níveis de  $Ca^{+2}$  citoplasmáticos, que resulta na ativação de enzimas dependentes de cálcio como calmodulina, fosfatases e proteína cinase C (PKC) (CORBIT; FOSTER; ROSNER, 1999). A formação de DAG regula diversas isoformas de PKC. Sinalização através desta via controla a expressão e / ou atividade de muitas proteínas, incluindo canais iônicos e fatores de transcrição (HUANG; REICHARDT, 2003).

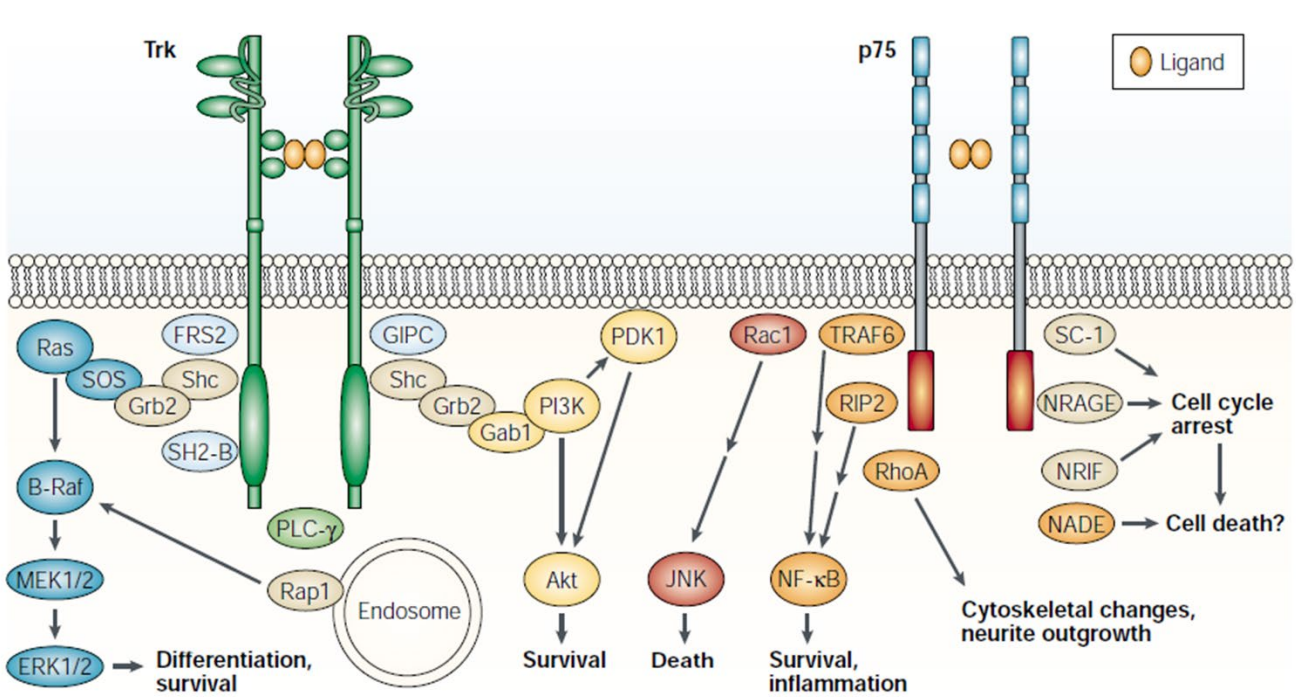
### **1.5.4. Sinalização NF-KB**

Em resposta a ligação de neurotrofinas ao receptor p75NTR, a cinase IKB é fosforilada pelo complexo cinase IKK, levando a ubiquitinação e degradação desta proteína, que inibe constitutivamente NF-KB. Sem essa inibição, NF-KB fica livre para ser translocado para o núcleo e regular a transcrição de genes alvo. Dentre estes estão membros da família de genes inibidores de apoptose como BCL2 e inibidor de apoptose (IAP) (HAMANOUE et al., 1999; HUANG; REICHARDT, 2003).

### **1.5.5. Sinalização JNK**

O efeito pró-apoptótico observado pela ligação de neurotrofinas ao receptor p75NTR é mediado pela sinalização JNK. A ativação de p75NTR induz a ativação da cinase reguladora de sinais de apoptose 1 (ASK1) e MEKK que ativa JNK (BRODEUR et al., 2009). JNK pode ativar p53 diretamente ou

indiretamente através da fosforilação de c-jun, o que promove apoptose através da regulação de Proteína X associada a BCL-2 (BAX), BAD e modulador de apoptose regulado positivamente por p53 (Puma) (TAN; THIELE; LI, 2014). Além disso, a ativação de JKN também induz a expressão do ligante do receptor de morte Fas (Fas), promovendo apoptose através da ativação do receptor Fas. Pro-neurotrofinas também promovem sinais pró-apoptóticos ao se ligarem a p75NTR, a presença do receptor sortilina é necessária para este efeito que também induz apoptose via ativação de JNK (REICHARDT, 2006).



**Figura 13. Sinalização por neurotrofinas.** Principais vias de sinalização ativadas por neurotrofinas a partir da sua ligação aos receptores Trk e p75NTR. Obtido de: (Chao, 2003).

### 1.6. Neurotrofinas e seus receptores em câncer

Embora as neurotrofinas sejam conhecidas por seu papel fisiológico modulando a sobrevivência e diferenciação neuronal, alterações na sinalização e níveis de expressão de neurotrofinas e seus receptores também estão envolvidas na patogênese de diversas condições incluindo doenças

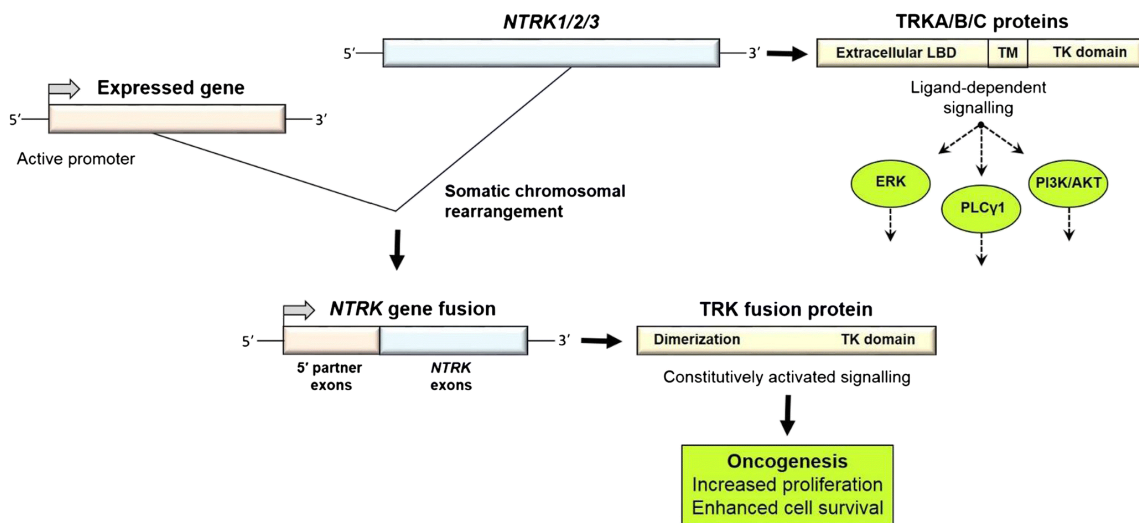
degenerativas como doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e desordens psiquiátricas como depressão (CHAO; RAJAGOPAL; LEE, 2006). Diversos estudos têm reportado a expressão de neurotrofinas e seus receptores em diferentes tumores de origem neuronal e não neuronal (TAN; THIELE; LI, 2014). Na maioria dos casos o envolvimento de neurotrofinas e seus receptores em tumores estão relacionados a características de desenvolvimento, progressão e disseminação tumoral, que estão associadas a mutações em NTRK, fusões oncogênicas, expressão de diferentes isoformas e superexpressão de Trks (GRIFFIN et al., 2018). No entanto, dependendo do tipo tumoral, contexto celular e isoforma estas proteínas também podem desenvolver papel supressor tumoral e estarem correlacionadas a prognóstico clínico favorável (CHOPIN et al., 2016).

#### **1.6.1. Fusões gênicas em NTRK**

Fusões gênicas envolvendo *NTRKs* foram uma das primeiras translocações gênicas identificadas em câncer (PULCIANI et al., 1982). Essas fusões são resultado de alterações intra-cromossômicas ou rearranjos inter-cromossômicos, que justapõem a região 3' do gene NTRK com a região 5' de um gene parceiro de fusão em células progenitoras tumorais. Geralmente a proteína resultante desta fusão está constitutivamente ativa resultando em ativação aberrante de vias de sinalização de sobrevivência celular, dessa forma atuando como um oncogene (figura 14) (COCCO; SCALTRITI; DRILON, 2018). Fusões envolvendo genes NTRK têm sido identificadas como iniciadoras tumorais e marcadores diagnóstico em diversos tipos de câncer (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016).

Embora fusões possam ocorrer nos 3 genes de *NTRK*, as fusões mais comuns são observadas em *NTRK3* ou *NTRK1* e estão presentes em cerca de 1% dos tumores sólidos (VAISHNAVI; LE; DOEBELE, 2015). As duas principais categorias de tumores com fusões em *NTRK* são: Tumores raros com alta frequência de fusões em *NTRK* (80%) e tumores comuns com baixa frequência de fusões *NTRK* (5-25% ou >5%) (KHOTSKAYA et al., 2017; PENAULT-LLORCA; RUDZINSKI; SEPULVEDA, 2019). Além disso, fusões gênicas de

*NTRK* são associadas a tipos tumorais específicos, como exemplo, a fusão dos genes *ETS* variante 6 e *NTRK3* (*ETV6-NTRK3*) é observada em 90-100% de carcinomas secretores análogo ao mamário, também está presente em 91-100% dos fibrossarcomas infantis e em 83% dos nefromas mesoblásticos congênitos (BOURGEOIS et al., 2000; RUBIN et al., 1998; SKÁLOVÁ et al., 2010). Outros tipos de câncer apresentam diversos genes como parceiros de fusão, em câncer de pulmão 7 genes diferentes foram identificados fazendo parte de fusões com *NTRK1*, no entanto essas fusões ocorrem em 0.2 – 3.3% dos casos de câncer de pulmão (STRANSKY et al., 2014). A identificação destas fusões tem contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (MELDOLESI, 2017).



**Figura 14. Fusões em genes *NTRK*.** Em condições normais os genes *NTRK* promovem a transcrição das proteínas Trks, que através da ativação pelos seus ligantes induzem a transdução de sinal e ativação de vias intracelulares como ERK, PI3K-AKT e PLC- $\gamma$ . O rearranjo genômico de genes *NTRK* tipicamente ocorre através da junção da região 5' de um gene expresso em células precursoras tumorais com a região 3' dos genes *NTRK*. O RNA mensageiro resultante da fusão é traduzido em uma proteína fusionada que compreende a região N-terminal do parceiro de fusão com a região C-terminal da proteína Trk. Esta proteína fusionada se apresenta constitutivamente ativa e promove a oncogênese através de aumento da proliferação e sobrevivência celular. Obtido de: (KUMMAR; LASSEN, 2018).

### 1.6.2. NGF/TrkA

A superexpressão de NGF e TrkA exerce efeitos pró-tumorais em diversos tipos de tumores como em câncer de ovário, mama, pulmão, pâncreas, pele,

estômago, fígado e tireoide (CHOPIN et al., 2016). A expressão dessas proteínas também tem sido associada a invasão perineural em pacientes com câncer de pâncreas e carcinoma de células escamosas, e com prognóstico ruim em paciente de câncer de mama e ovário (DANG et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2015; KOLOKYTHAS et al., 2010; MA et al., 2008). A ativação de TrkA por NGF resulta na proliferação, sobrevivência, invasão, migração, metástase e resistência, através da modulação das vias de sinalização ERK, “SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase” (SRC) e AKT (TAN; THIELE; LI, 2014). Além disso, a inibição de TrkA reduz o crescimento de tumores xenográficos em modelos animais de câncer de mama. NGF também promove a transição epitélio-mesenquimal em células tronco tumorais, e parece estar envolvida na plasticidade e auto-renovação destas células em tumores de mama (LAGADEC et al., 2010). NGF também promove angiogênese através da indução da expressão VEGF (ROMON et al., 2010).

Em contraste, a participação de TrkA na tumorigênese de neuroblastomas pode ser variável dependendo da isoforma expressa pelo tumor (TAN; THIELE; LI, 2014). A expressão de TrkA (I e II) em altos níveis é um forte fator relacionado a bom prognóstico em pacientes com neuroblastomas. Em linhagens celulares de neuroblastomas, a expressão e ativação de TrkA está associada a redução do crescimento celular, redução de invasão e diminuída expressão de fatores angiogênicos (NAKAGAWARA, 2001; THIELE; LI; MCKEE, 2009). Por outro lado, a elevada expressão da isoforma TrkA III foi observada em pacientes de neuroblastomas com pior prognóstico. A atividade pró-tumoral de TrkA III ocorre por mecanismos independentes de NGF (TACCONELLI et al., 2004).

### **1.6.3. BDNF/TrkB**

A ativação de TrkB dependente ou independente de BDNF representa uma via de transdução de sinal crítica para sobrevivência celular de células cancerosas (DESMET; PEEPER, 2006). Os primeiros estudos que associaram BDNF/TrkB com atividades oncogênicas foram realizados em neuroblastomas, onde a expressão elevada de BDNF e TrkB constituem forte fator prognóstico

negativo (NAKAGAWARA, 2001). Atualmente o envolvimento da sinalização BDNF/TrkB está associada a características pró-tumorais modulando a proliferação, invasão, inibição de apoptose, resistência a quimioterapia e metástases em diversos tipos de câncer incluindo tumores de pulmão, cólon, mama, estômago, cabeça e pescoço, próstata, glioblastoma entre outros (DE FARIAS et al., 2012; EGGERT et al., 2001; LAWN et al., 2015; SCLABAS et al., 2005; SINKEVICIUS et al., 2014; VANHECKE et al., 2011). Além da ação direta em células tumorais, BDNF também apresenta atividade angiogênica através da indução da expressão da subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1a) que estimula a expressão de VEGF. BDNF também estimula a neovascularização tumoral ao promover o recrutamento de células progenitoras epiteliais que expressam TrkB (RADIN; PATEL, 2017).

A expressão de BDNF e TrkB está relacionada a redução da sensibilidade a quimioterapia em células cancerosas. BDNF é capaz de promover a sobrevivência de células de neuroblastoma tratadas com cisplatina, etoposídeo e vimblastina de forma dose-dependente, através de mecanismos envolvendo a via de sinalização AKT (JABOIN et al., 2003; LI et al., 2015). A estimulação de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço com BDNF promoveu a resistência a quimioterapia através do aumento de expressão do transportador de bomba de efluxo MDR1 (LEE; JIFFAR; KUPFERMAN, 2012).

A ativação de TrkB tem sido associada com a transativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que se encontra superexpresso em diversos tipos tumorais, mesmo na ausência do ligante fator de crescimento epidérmico (EGF) (RADIN; PATEL, 2017). A transativação de TrkB mediada por EGF facilita a migração de células de câncer de pulmão e aumenta a proliferação e migração de células de câncer de ovário (GÖTZ; SENDTNER, 2014; QIU et al., 2006). Em estudos *in vitro* a ativação de TrkB por BDNF em células de câncer colorretal promove o aumento da proliferação celular e desenvolvimento de mecanismos de resistência associados a transativação do receptor EGFR. No entanto, a inibição de ambos receptores é capaz de suprimir a proliferação destas células (DE FARIAS et al., 2012).

A sinalização BDNF/TrkB tem sido descrita como mediadora de resistência à *anoikis* em diversos cânceres em resultado da ativação de AKT que regula sobrevivência e migração das células cancerosas (THIELE; LI; MCKEE, 2009). Em carcinoma de pulmão de pequenas células a expressão de TrkB promove migração, invasão e transformação destas células, adicionalmente, a elevada expressão de TrkB em tumores primários está correlacionada com metástase em linfonodos (RICCI et al., 2013). Células de tumores metastáticos apresentam elevada expressão de BDNF e TrkB (BAO et al., 2013; SMIT et al., 2009). Pacientes com câncer de pâncreas com elevados níveis de TrkB desenvolvem metástase de fígado mais rapidamente do que pacientes com tumores que não expressam TrkB (SCLABAS et al., 2005). Em câncer colorretal tumores em estágios mais avançados apresentam maior expressão de TrkB. Além disso, a expressão concomitante do RNAm de BDNF e TrkB em câncer de cólon são associadas a metástases de fígado e peritônio (HUANG et al., 2015).

Mais recentemente tem sido relatada a importância de BDNF/TrkB na regulação de células tronco tumorais. BDNF e NT-3 foram capazes de estimular a proliferação e sobrevivência de células iniciadoras tumorais de glioblastoma na ausência de fatores de crescimento canônicos como EGF e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (LAWN et al., 2015). Células tronco tumorais TrkB positivas demonstraram ter um papel essencial na recorrência tumoral após tratamento de modelos animais de câncer de mama triplo-negativos (YIN et al., 2015).

Curiosamente, alguns estudos têm sugerido que a superexpressão de BDNF no hipotálamo pode exercer propriedades imunomoduladoras induzindo resposta antitumoral através da regulação de proteínas envolvidas na resistência tumoral (MENG et al., 2018; RADIN; PATEL, 2017).

#### **1.6.4. NT-3/TrkC**

A expressão de TrkC em tumores, assim como de TrkA, pode atuar tanto como oncogene ou supressor tumoral em câncer (MELDOLESI, 2017). Isso se deve ao fato destes receptores serem considerados receptores de dependência

que estão sujeitos à disponibilidade do seu ligante para ativar diferentes vias de sinalização. Na presença do seu ligante estes receptores ativam vias de sinalizações clássicas na regulação de sobrevivência, migração celular e progressão tumoral. Por outro lado, na ausência de ligantes, estes receptores atuam como supressores de tumor para promoverem morte celular (GIBERT; MEHLEN, 2015; NIKOLETOPOULOU et al., 2010).

TrkC tem sido reportado como supressor tumoral em células cancerosas de origem neuronal e não-neuronal, característica que parece ser independente da sua ativação por NT-3. Em neuroblastoma e MB, a expressão de TrkC é considerada fator prognóstico favorável (GROTZER et al., 2000; RYDÉN et al., 1996). Por outro lado, pacientes com neuroblastoma em estágio 4 apresentam expressão aumentada de NT-3, o que pode ser um mecanismo de defesa contra apoptose induzida por TrkC em condições limitadas do seu ligante (BOUZAS-RODRIGUEZ et al., 2010). Em câncer colorretal, a expressão de TrkC é divergente entre os estudos, sendo observado como supressor tumoral condicional por mecanismos de metilação de *NTRK3* que suprime a expressão de TrkC e ativando apoptose quando o receptor está presente na ausência do seu ligante (GENEVOIS et al., 2013; LUO et al., 2013). Também já foi relatado o papel de TrkC promovendo crescimento e metástase de câncer colorretal, a sua expressão está aumentada em tumores quando comparada ao tecido normal, e se correlaciona com elevada expressão de NT-3 (KIM et al., 2017).

A expressão de TrkC também pode estar envolvida em processos de iniciação, progressão e metástase de tumores, como já observado por exemplo em tumores de mama e leucemias. Elevados níveis de TrkC são observados em pacientes com leucemia e em linhagens celulares. TrkC regula a proliferação e sobrevivência de células de leucemia através da ativação de PI3k-AKT e o silenciamento da expressão e inibição farmacológica de TrkC leva à redução da proliferação celular (KIM et al., 2013). NT-3 promove o crescimento e metástase cerebral de tumores primários de mama, através da regulação da transição celular epitélio-mesênquima, e através da redução da ativação de resposta imune no cérebro (LOUIE et al., 2013).



### 1.6.5. P75NTR

O receptor p75NTR é frequente sugerido na literatura como regulador do desenvolvimento tumoral e por suas funções em células tronco tumorais (CHOPIN et al., 2016; MOLLOY; READ; GORMAN, 2011). A sinalização de p75NTR através da ligação de NGF tem sido associada com aumento da proliferação e migração em células de melanoma (VERBEKE et al., 2010), e foi correlacionada com o aumento de metástases cerebrais (DENKINS et al., 2004). Além disso, elevada expressão de p75NTR e “SRY-box transcription factor 10” (SOX10) foi correlacionado com o aumento de metástases, resistência a quimioterapia e pior prognóstico (REDMER et al., 2017). Em tumores de mama, a ativação de NF-KB regulada por p75NTR promove o aumento da sobrevivência de células tumorais (VERBEKE et al., 2013). P75NTR se encontra expresso em gliomas de alto grau e a clivagem deste receptor regula processos de invasão celular. Este receptor também interage com a proteína PDLIM1 estimulando a invasão de células tronco tumorais derivadas de tumores de pacientes com glioma (ALSHEHRI; ROBBINS; SENGER, 2017).

No entanto, p75NTR também pode atuar como supressor tumoral em câncer gástrico, câncer de bexiga e próstata, através do bloqueio da progressão do ciclo celular e promoção de apoptose. A redução da expressão deste receptor favorece a sobrevivência, proliferação e metástase de células tumorais (JIN et al., 2007; KHWAJA et al., 2006; TABASSUM; KHWAJA; DJAKIEW, 2003).

Em estudo mais recente em melanoma, p75NTR demonstrou atuar como um “switch” molecular. A ativação de p75NTR em condições patológicas regula a expressão do fator de transcrição E2F (*E2F*), *MYC*, “sterol regulatory element binding transcription factor 1” (*SREBP1*) e da sinalização por PI3K, controlando auto-renovação e sobrevivência celular em contraste aos seus efeitos de diferenciação celular e apoptose observados durante o desenvolvimento do tecido normal (FILIPP; LI; BOIKO, 2019; RESTIVO et al., 2017).

### **1.7. Neurotrofinas e seus receptores em MB**

Neurotrofinas e seus receptores apresentam expressão e função bastante variada em MB (CHOU; TROJANOWSKI; LEE, 1997; WASHIYAMA et al., 1996). TrkC foi o primeiro receptor a ser associado com aspectos clínicos, sendo a sua expressão e ativação relacionadas ao aumento de apoptose e diferenciação e redução de proliferação (KIM et al., 1999; SEGAL et al., 1994). A elevada expressão de TrkC tem sido associada com prognóstico favorável em pacientes com MB e estudo mais recente demonstrou que a sua expressão é mais frequente no subgrupo molecular SHH (FRIEDRICH et al., 2017; GROTZER et al., 2000).

De acordo com a literatura atual, a expressão de NGF e TrkA também estão associadas a atividades supressoras tumorais em MB. A ativação de TrkA por NGF promovem a apoptose de células de MB por mecanismos independente da atividade de caspases e que envolvem macropinocitose (CHOU; TROJANOWSKI; LEE, 2000; KOKUNAI et al., 1994; LI et al., 2016; MURAGAKI et al., 1997; OHTA et al., 2006).

A presença de p75NTR em MB tem sido correlacionada ao aumento da capacidade de auto-renovação de células tronco (MORRISON et al., 2013). A sua expressão parece estar mais frequentemente observada em pacientes do subgrupo SHH, além disso, células tumorais p75NTR positivas apresentam maior proliferação, sobrevivência e migração em progenitores tumorais (LIANG et al., 2015, 2018).

A sinalização por BDNF e TrkB ainda permanece controversa em MBs. Apesar da sua expressão ter sido identificada em amostras de pacientes (WASHIYAMA et al., 1996), pouco se sabe da sua relevância e papel biológico nestes tumores. O nosso grupo tem investigado o papel da estimulação de TrkB por BDNF e a inibição de TrkB utilizando a molécula ANA-12. Estes estudos demonstraram que TrkB tem papel importante na regulação da viabilidade e sobrevivência de células de MB (NÖR et al., 2011; SCHMIDT et al., 2010; THOMAZ et al., 2016).

Estes estudos demonstram que neurotrofinas e seus receptores podem ser importantes candidatos a alvos terapêuticos e biomarcadores para MB. Mais detalhes sobre a expressão de neurotrofinas e seus receptores em MB serão amplamente discutidas no capítulo 2 deste trabalho.

### **1.8. Inibição de Trks como estratégia terapêutica em câncer**

O aumento do interesse no desenvolvimento de novas drogas tendo Trks como alvo terapêutico se deve a importância de neurotrofinas e Trks como promotores de tumorigênese e às descobertas de fusões oncogênicas de genes NTRK (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016; KHOTSKAYA et al., 2017; MELDOLESI, 2017). Devido ao elevado nível de homologia dos domínios tirosina cinases entre TrkA, TrkB e TrkC, foram sintetizadas pequenas moléculas capazes de inibir os 3 receptores Trks, os inibidores pan-Trks (LANGE; LO, 2018).

Desde 2014, diversos inibidores pan-Trks disponíveis em estudos clínicos, dentre estes, entrectinibe e larotrectinibe (LOXO101), considerados inibidores pan-Trks de primeira geração, estão sendo testados em estudos clínicos de fase I e II (AMATU; SARTORE-BIANCHI; SIENA, 2016; COCCO; SCALTRITI; DRILON, 2018; KUMMAR; LASSEN, 2018). Larotrectinibe é o inibidor de Trks mais potente e específico testado em pacientes com câncer. Entrectinibe é um inibidor pan-Trk com atividade contra ROS proto-oncogene 1 (ROS1) e cinase de linfoma anaplásico (ALK). Ambos fármacos interferem na autofosforilação do domínio cinase dos receptores, resultando na diminuição da ativação de vias intracelulares e são capazes de cruzar a barreira hematoencefálica (LANGE; LO, 2018). Ensaios pré-clínicos demonstraram que o tratamento com larotrectinibe e entrectinibe são eficazes na inibição das vias de sinalização MAPK, PI3k-AKT, PKC e STAT3 (COCCO; SCALTRITI; DRILON, 2018).

Dados de 55 pacientes adultos e pediátricos com 17 diferentes tipos de tumores sólidos avançados apresentando fusões NTRKs positivas foram

avaliados quanto à resposta ao tratamento com larotrectinibe (DRILON et al., 2018). Foram observados níveis de resposta >75% independentemente do tipo histológico e idade (sendo eficaz em pacientes adultos e pediátricos). Após 1 ano, 55% dos pacientes permaneceram livres de progressão da doença (DRILON et al., 2018). Larotrectinibe também foi bem tolerado clinicamente, com eventos adversos sendo predominantemente de grau 1 e nenhum paciente abandonou o tratamento devido a toxicidade relacionada ao fármaco (LAETSCH et al., 2018). Os eventos adversos mais comuns observados foram: fadiga, efeitos gastrointestinais, aumento dos níveis de enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ganho de peso entre outros (COCCO; SCALTRITI; DRILON, 2018).

Entrectinibe também tem demonstrados resultados interessantes em pacientes com câncer de mama, rins, ovário, câncer de pulmão de pequenas células, sarcomas e tumores cerebrais primários (ARDINI et al., 2016). Este fármaco tem sido eficaz significativamente eficaz em tumores cerebrais. Foram observadas respostas no SNC em 63% dos pacientes, e um paciente que apresentava de 15 a 20 metástases no cérebro apresentou resposta intracranial completa que tem perdurado por mais de 15 meses (DRILON et al., 2017). As respostas a terapia foram apenas identificadas em pacientes com alterações em NTRKs, ROS 1 e ALK. Entrectinibe tem sido considerado seguro, com a observação de efeitos adversos brandos e moderados que foram reduzidos com a redução de dose ou interrupção do tratamento (LANGE; LO, 2018).

Apesar da excelente resposta terapêutica, alguns pacientes com doença avançada se tornam refratários ao tratamento com inibidores de Trk (RUSSO et al., 2016). Devido a isso, inibidores de Trk de segunda geração (LOXO-195 e TPX-0005) têm sido testados em ensaios clínicos e parecem ser capazes de reverter a resistência inata e adquirida a essas terapias (DRILON et al., 2017; NISHIYAMA et al., 2018). Embora a pesquisa com inibidores de Trk estejam em estágio inicial de avaliação, a sua eficácia especialmente em pacientes com fusões em NTRK tem demonstrado que estes inibidores possuem um futuro promissor no campo de terapias alvo-dirigidas (COCCO; SCALTRITI; DRILON,

2018; KHOTSKAYA et al., 2017; MELDOLESI, 2017; VAISHNAVI; LE; DOEBELE, 2015).

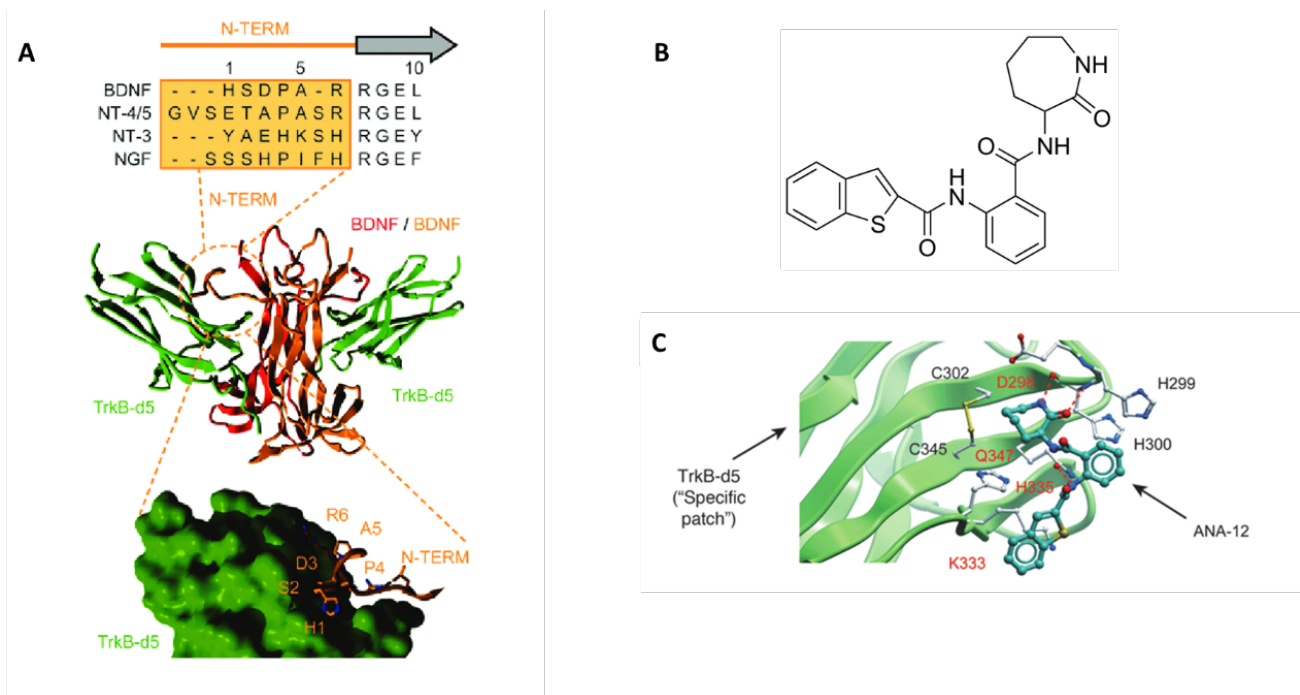
### **1.9. Inibidores seletivos de TrkB: ANA-12**

Com base na participação da sinalização por BDNF e TrkB em câncer, o desenvolvimento de moléculas que regulem a ativação deste receptor tem sido fundamental para a compreensão do seu papel na tumorigênese (DESMET; PEEPER, 2006; THIELE; LI; MCKEE, 2009). Análises *in silico* e modelagem de pequenas moléculas têm contribuído para a síntese de novas moléculas com capacidade de interagir com TrkB. Atualmente, dois inibidores seletivos de TrkB foram desenvolvidos e estão disponíveis para estudos pré-clínicos, Cyclotraxin-B e ANA-12 (BOULLE et al., 2012; MENG et al., 2018).

A pequena molécula ANA-12 foi sintetizada em 2011 por Cazorla *et al.* ANA-12 é um antagonista ao TrkB que previne a ativação do receptor através da interação com o domínio TrkB-D5, e atua por mecanismo não competitivo com BDNF (figura 15). Estudos *in vitro* demonstraram que esta pequena molécula é um potente antagonista seletivo de TrkB, pois demonstrou inibir processos de ativação intracelular deste receptor sem interferir nas funções de outros receptores Trk. Quando administrado sistemicamente ANA-12 é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e inibir a fosforilação de TrkB principalmente nas regiões do estriado, córtex e hipocampo. ANA-12 se mantém estável em soro e atinge o SNC em 30 minutos após sua administração, reduzidos níveis do antagonista ainda podem ser detectados após 6 horas da administração e a inibição da fosforilação de TrkB pode ser observada a partir de 2 após a sua administração. O tratamento com ANA-12 demonstrou ter efeitos ansiolíticos e antidepressivos em ratos (CAZORLA et al., 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* vêm confirmando o potencial de ANA-12 como estratégia para a inibição de TrkB em diversos tipos tumorais. O tratamento com ANA-12 reduziu a migração de linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão e reduziu a viabilidade de linhagens celulares de glioblastoma, sarcoma de Ewing e leucemia em estudos *in vitro* (HEINEN et al., 2016; PINHEIRO et al., 2017; POLAKOWSKI et al., 2014; SINKEVICIUS et al., 2014). Em carcinoma oral

de células escamosas, ANA-12 foi eficaz na redução do crescimento tumoral e redução de comportamentos associados a dor em modelos animais de câncer oral (CHODROFF et al., 2016; MORIWAKI et al., 2018). Além disso, em modelo animal de câncer de mama triplo-negativo, a inibição de TrkB por ANA-12 reduziu a formação de metástases no SNC induzidas por estradiol (CONTRERAS-ZÁRATE et al., 2019). Em estudo prévio, o nosso grupo observou que a inibição de TrkB por ANA-12 reduz a viabilidade, sobrevivência e altera o ciclo celular de linhagens celulares de MB (THOMAZ et al., 2016). Essas descobertas proporcionaram a justificativa para futuras investigações, relacionando a inibição de TrkB como uma potencial estratégia terapêutica em MB.



**Figura 15. Estrutura da pequena molécula ANA-12 e seu domínio de ligação em TrkB. (A)** Modelagem computacional do domínio de especificidade. A triagem virtual baseada na estrutura de TrkB foi realizada visando a interação específica do domínio N-terminal de BDNF e o subdomínio d5 do TrkB (TrkB-d5 apresentado em verde). O alinhamento da sequência de aminoácidos é mostrado no painel superior, a região específica pode ser visualizada na caixa laranja. O modelo 3D da interação de TrkB-d5 com BDNF é mostrada no painel inferior. **(B)** Estrutura química da molécula ANA-12. **(C)** Modelo computacional da ancoragem de ANA-12 (azul ciano) em TrkB-d5 (fita verde). Três pontes de hidrogênio (linhas pontilhadas em vermelho) ancoram ANA-12 que é envolvido por aminoácidos específicos do domínio de ligação em TrkB. Adaptado de: (CAZORLA et al., 2011).

## 2. HIPÓTESES

2.1. A inibição de TrkB pelo antagonista seletivo ANA-12 reduz a viabilidade e sobrevivência de linhagens celulares de MB humano, logo:

2.1.1. A inibição farmacológica de TrkB por ANA-12 pode suprimir vias de sinalização celulares relacionadas a proliferação e sobrevivência e aumentar a expressão de genes reguladores de parada de ciclo celular, apoptose, diferenciação e pluripotência levando à redução do crescimento tumoral em modelos *in vitro* e *in vivo* de MB.

2.2. As neurotrofinas e seus receptores estão envolvidos na regulação da tumorigênese de diversos tipos de câncer, incluindo MBs, logo:

2.2.1. A investigação do perfil de expressão de neurotrofinas e seus receptores em dados de transcriptoma de amostras primárias de subgrupos e subtipos moleculares de MB pode revelar informações importantes a respeito do potencial prognóstico e terapêutico desses marcadores.

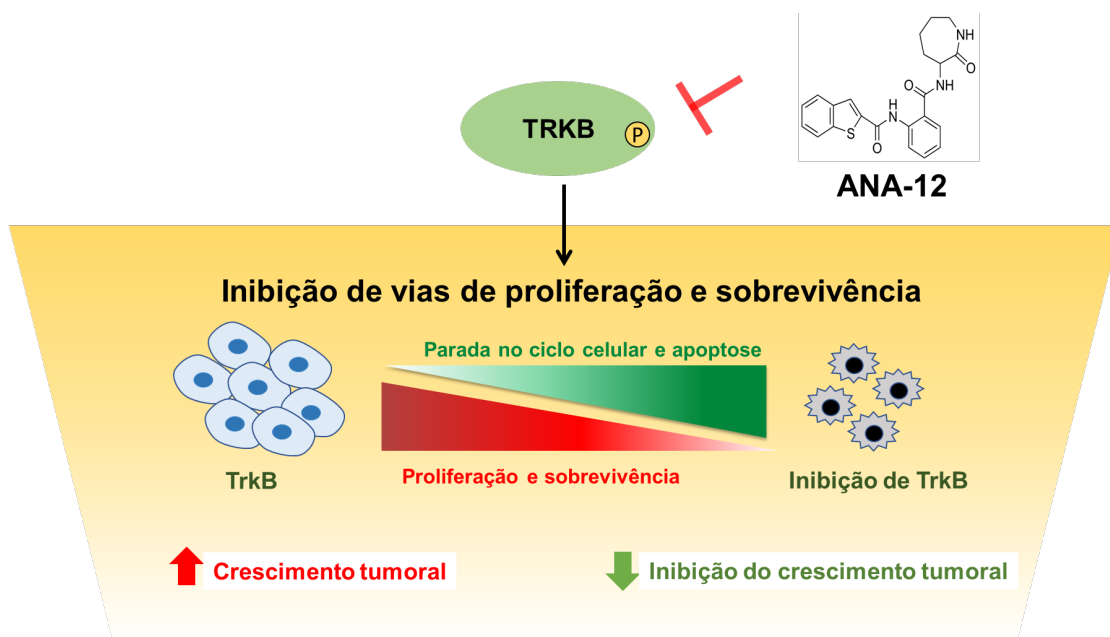


Figura 16. Hipótese 2.1.1 do estudo.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da inibição seletiva de TrkB sobre características celulares e moleculares em linhagens celulares e modelo animal de MB, e investigar o perfil de expressão de neurotrofinas e seus receptores em dados de transcriptoma de amostras primárias correspondentes à diferentes subgrupos e subtipos moleculares de MB.

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da inibição de TrkB, pelo antagonista ANA-12, na viabilidade e proliferação em linhagens celulares MB humano expostas a diferentes concentrações de ANA-12 e diferentes tempos de tratamento.
- Determinar os efeitos da inibição de TrkB, por ANA-12, e da ativação de TrkB, por BDNF, sobre apoptose celular em linhagens celulares MB humano expostas a diferentes doses e períodos de tratamento.
- Investigar as consequências da inibição de TrkB, por ANA-12, na ativação das vias de sinalização reguladoras de sobrevivência e proliferação, PI3-AKT e MAPK, em linhagens celulares MB humano.
- Avaliar os efeitos da inibição de TrkB, por ANA-12, sobre a expressão gênica de alvos relacionados à proliferação e sobrevivência, supressão tumoral, diferenciação e pluripotência: STAT3, p21, TUBB3 e Nestina, respectivamente.
- Avaliar os efeitos *in vivo* do tratamento com ANA-12 no crescimento de tumores de xenoinxerto de MB.
- Discutir através de um artigo de revisão a influência da expressão de neurotrofinas e seus receptores o impacto de descobertas experimentais em MB, e investigar o perfil de expressão de NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NGFR, NTRK1, NTK2 e NTRK3 em dados de



transcriptoma de amostras primárias correspondentes à diferentes subgrupos e subtipos moleculares de MB.

## 4. CAPÍTULOS

---

Os resultados obtidos durante o doutorado foram organizados em 2 capítulos. O primeiro capítulo refere-se ao artigo de dados experimentais intitulado “*Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma*”, aceito para publicação em 2019 na revista *Frontiers in Pharmacology*, fator de impacto 3.84. Sob supervisão dos orientadores, eu fui a principal investigadora em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, desde planejamento experimental, realização de experimentos, análise de dados e escrita do manuscrito.

O segundo capítulo engloba o artigo de revisão com resultados originais intitulado “*Neurotrophin signaling in medulloblastoma*”, este artigo está em etapa de preparação e será submetido em 2019 à revista *Acta Neuropathologica*, fator de impacto 15.7. Neste trabalho eu fui responsável pela realização da revisão da literatura, escrita do manuscrito, análise e interpretação de dados dos transcriptomas.

A discussão desta tese terá como foco os principais resultados obtidos destes dois trabalhos.

#### **4.1. Capítulo 1**

**Artigo de dados experimentais:** *“Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma”*.

**Status:** Publicado.

**Revista:** *Frontiers in Pharmacology*.



# Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma

Amanda Thomaz<sup>1,2</sup>, Kelly de Vargas Pinheiro<sup>1,2</sup>, Bárbara Kunzler Souza<sup>1,2</sup>, Lauro Gregianin<sup>1,3,4</sup>, Algemir L. Brunetto<sup>1,5</sup>, André T. Brunetto<sup>1,5</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>1,5</sup>, Mariane da Cunha Jaeger<sup>1,5</sup>, Vijay Ramaswamy<sup>6,7</sup>, Carolina Nör<sup>6,8</sup>, Michael D. Taylor<sup>6,7,8,9,10</sup> and Rafael Roesler<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>3</sup> Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>4</sup> Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>5</sup> Children's Cancer Institute, Porto Alegre, Brazil, <sup>6</sup> The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada, <sup>7</sup> Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada, <sup>8</sup> Developmental and Stem Cell Biology Program, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada, <sup>9</sup> Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, <sup>10</sup> Division of Neurosurgery, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Cyril Corbet,  
Catholic University of Louvain,  
Belgium

### Reviewed by:

Christina Pabelick,  
Mayo Clinic, United States  
Maxim Cazorla,  
INSERM U1216 Grenoble Institut des  
Neurosciences (GIN), France

### \*Correspondence:

Rafael Roesler  
rafaelroesler@hcpa.edu.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 02 April 2019

**Accepted:** 29 May 2019

**Published:** 26 June 2019

### Citation:

Thomaz A, Pinheiro KdV, Souza BK, Gregianin L, Brunetto AL, Brunetto AT, de Farias CB, Jaeger MC, Ramaswamy V, Nör C, Taylor MD and Roesler R (2019) Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma. *Front. Pharmacol.* 10:698. doi: 10.3389/fphar.2019.00698

Neurotrophins are critically involved in regulating normal neural development and plasticity. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin that acts by binding to the tropomyosin receptor kinase B (TrkB) receptor, has also been implicated in the progression of several types of cancer. However, its role in medulloblastoma (MB), the most common type of malignant brain tumor afflicting children, remains unclear. Here we show that selective TrkB inhibition with the small molecule compound ANA-12 impaired proliferation and viability of human UW228 and D283 MB cells, and slowed the growth of MB tumors xenografted into nude mice. These effects were accompanied by increased apoptosis, reduced extracellular-regulated kinase (ERK) activity, increased expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and differential modulation of p21 expression dependent on the cell line. In addition, MB cells treated with ANA-12 showed morphological alterations consistent with differentiation, increased levels of the neural differentiation marker  $\beta$ -III Tubulin (TUBB3), and reduced expression of the stemness marker Nestin. These findings are consistent with the possibility that selective TrkB inhibition can display consistent anticancer effects in MB, possibly by modulating intracellular signaling and gene expression related to tumor progression, apoptosis, and differentiation.

**Keywords:** brain-derived neurotrophic factor, tropomyosin receptor kinase B, neurotrophin, medulloblastoma, brain tumor

## INTRODUCTION

Medulloblastomas (MBs) are highly aggressive and heterogeneous brain tumors of the cerebellum that account for about 20% of pediatric brain cancers (Ramaswamy and Taylor, 2017; Northcott et al., 2019). Integrative genomic and epigenomic studies on MB biology classify this disease into four clinically relevant consensus subgroups: wingless (Wnt), Sonic hedgehog (Shh), group 3, and group 4

(Northcott et al., 2012; Taylor et al., 2012). The 2016 World Health Organization (WHO) Classification of Tumors of the Central Nervous System recently acknowledged the molecular subgroups in the classification of MBs, providing clinical utility for the improvement of MB diagnosis (Louis et al., 2016). More recent advancements in deep transcriptional and methylation profiling of 763 primary MB samples revealed new subtypes within each of the four subgroups and further classified MB into 12 subtypes: two Wnt, four Shh, three group 3, and three group 4 subgroups (Cavalli et al., 2017). Current treatment is based in risk stratification and despite significant advances in surgery, radiotherapy, and drug therapy, effective treatment to MB remains a challenge (Kumar et al., 2017; Northcott et al., 2019). Because irradiating the central nervous system (CNS) can be harmful to the developing brain, radiation therapy is typically avoided in children under the age of three, but this can compromise disease control and survival. Consequently, there is a need for new treatments that can be tolerated in the younger population to treat therapy-resistant disease as well as to decrease potential side effects (Sabel et al., 2016; Northcott et al., 2019).

Targeting oncogenic fusions and dysregulated signal transduction pathways is an approach that can potentially improve the outcome of pediatric tumors therapy. Neurotrophins (NTs) are a group of growth factors that stimulates cell survival pathways through the activation of the tropomyosin receptor kinase (Trk) receptors. The Trk family includes TrkA, TrkB, and TrkC, which are encoded by NTRK1, NTRK2, and NTRK3 genes, respectively. TrkA is the high-affinity receptor for nerve growth factor (NGF), whereas TrkB has high affinity for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and NT-4. NT-3 can bind to all Trk receptors but has highest affinity for TrkC and is the sole ligand of this receptor (Chao, 2003; Park and Poo, 2013). NTs were initially characterized for their roles in regulating development and plasticity in the CNS (Park and Poo, 2013). However, it is now clear that deregulation of NT signaling is involved in the pathogenesis and progression of several tumor types (Vaishnavi et al., 2015). Gene fusions involving NTRK genes that lead to transcription of chimeric Trk proteins with constitutively activate or overexpressed kinase function conferring oncogenic potential have become increasingly important targets for cancer therapy (Cocco et al., 2018; Lange and Lo, 2018).

Expression of NTs and Trks has been reported in MB tumor samples from patients (Washiyama et al., 1996), and activation of different Trk receptors can influence MB cell function (Chou et al., 1997). Stimulation of TrkA by NGF and TrkC by NT-3 typically increases cell death and differentiation (Kim et al., 1999; Li et al., 2010; Li et al., 2016a; Li et al., 2016b), and higher TrkC expression has been associated with a favorable outcome and predictor of survival of MB patients (Segal et al., 1994; Friedrich et al., 2017). Despite substantial knowledge about TrkA and TrkC receptors in MB, the role of BDNF/TrkB in MB cells remains poorly understood (Venkatesh and Monje, 2017). Previous reports showed that BDNF or TrkB inhibition can display either pro- or antitumoral effects in these tumors (Schmidt et al., 2010; Nör et al., 2011; Thomaz et al., 2016). Given that BDNF/TrkB pathway is implicated in the pathogenesis and prognosis of a wide variety of malignancies, including neuroblastoma, glioblastoma, head and neck, breast, lung, and pancreas tumors as well as

leukemia, being associated with promotion of proliferation, migration, resistance to anoikis and resistance to chemotherapy (Thiele et al., 2009; Roesler et al., 2011; Radin and Patel, 2017; Meng et al., 2019), here we investigated the potential role of TrkB inhibition in experimental MB.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching [DBCA, published by National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), Brazil's Ministry of Science, Technology, Innovations and Communications (MCTIC); <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/concea.html>], and approved by the institutional Animal Care Committee (*Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA*), under protocol number 20160098.

### Cell Culture

Human MB cell lines D283 and UW-228 were originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA). These two cell lines present molecular features of different MB molecular subgroups: UW228 cells are TP53-mutated and classified as Shh, whereas D283 cells are p53 wild-type and classified as Group 3 (Ivanov et al., 2016). The D283 cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM low glucose, Gibco, Grand Island, USA), while UW228 cell line was cultured in DMEM: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12 Gibco®), both medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco). Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### Drug Treatments

ANA-12 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, MO, USA) at the concentration of 6,140 μM. BDNF (Sigma Aldrich, USA) was diluted in sterile ultrapure water at the stock solution of 1,000 ng/ml. Cells were treated with increasing concentrations of ANA-12 (5, 10, 20, or 30 μM) or human recombinant BDNF (50 ng/ml) in complete medium for 6, 24, 48, or 72 h. The concentration of the vehicle DMSO was used as control and did not exceed 0.5% (v/v).

### Mice and *In Vivo* Experiments

*In vivo* studies were performed in accordance with procedures approved by the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI) and approved by the institutional Animal Care Committee (CEUA-HCPA) under protocol number 160098.

Balb/c nude mice males and females (6 to 12 weeks old) were kept under aseptic conditions in ventilated cages and received food and water *ad libitum*. A total of 1 × 10<sup>6</sup> D283 cells were processed in serum-free DMEM and diluted 1:1 with Matrigel

(Corning, Corning, USA). Two hundred microliters of cell suspension was subcutaneously inoculated into the lower right dorsum of nude mice generating xenograft tumors. When established tumors reached approximately 80 to 100 mm<sup>3</sup>, the mice were randomly divided into two groups (12 mice/group) and subjected to treatments. The TrkB selective inhibitor ANA-12 was dissolved in DMSO at 6.5 mg/ml and administered at 1 mg/kg (ANA-12 + saline solution + Tween 20 2%) or vehicle alone (DMSO 2% + saline solution + Tween 20 2%) once daily by intraperitoneal (IP) injections for 15 days. The drug dose was chosen on the basis of previous studies using systemic administration of ANA-12 (Cazorla et al., 2011; Chodroff et al., 2016). After treatment, all the mice were euthanized, and the tumors were excised, measured, and weighed. The tumor size for the xenografts was determined using a caliper, and the volume was calculated: tumor volume (mm<sup>3</sup>) = [(Width 2 × Length)/2], where the width is the smallest measurement and the length is the longest measurement.

### Cell Viability

MB cells were seeded at density of  $3 \times 10^3$  cells per well in a complete medium into 96-well plates (NEST Biotechnology, Jiangsu, China). After overnight culture in a complete medium, cells were treated with ANA-12 as described above and after 24, 48, and 72 h of treatment, the medium was removed, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and 50  $\mu$ l of 0.25% trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Gibco by Life Technologies) solution was added to detach cells. To assess cell viability, the 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. For the calculation of IC<sub>50</sub>, data were fitted in a dose response curve (Graphpad Prism v. 6.0) using the equation:  $y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{-(\log IC_{50} - x) \times \text{Hillslope}})$ .

### Ki67 Proliferation Assay

The Muse Ki67 Proliferation kit (Merck, Princeton, USA) was used to detect proliferating and non-proliferating cells based on Ki67 expression. MB cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells per well in six-well plate (NEST) and treated with ANA-12 for 24 h. After treatment, the supernatant was removed, cells were detached, counted, and adjusted to the concentration of  $1 \times 10^5$  cells, followed by washing, fixation, permeabilization, and centrifugation steps. Cells were stained with anti-Ki67-PE antibody or IgG1-PE antibody (isotype), used as negative control, for 30 min, in the dark, at room temperature according to the manufacturer's instructions. Percentage of Ki67 negative and positive cells was determined from the fluorescence of cells in each sample analyzed by Muse Cell Analyzer (Merck). Experiments were performed at least four times in duplicates for each treatment.

### Apoptosis Assay

The Annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD Biosciences, San Diego, USA) was used to detect apoptosis and cell death,

respectively. MB cells were plated at  $15 \times 10^3$  cells per well in 24-well plate (NEST) and cells were treated with ANA-12 or BDNF for 24 and 48 h. After treatment times, both floating and attached cells were harvested and washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 1× binding buffer, and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide (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 20,000 events for each sample in a flow cytometer (Attune Acoustic focusing cytometer, Applied Biosystems, Beverly, USA). Data were analyzed using Attune Cytometric Software version 1.2.5. At least three independent replicates were performed.

### PI3K and MAPK Dual Pathway Activation Assay

MB cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells per well in six-well plate (NEST) and treated with ANA-12 for 24 h. To access the activation of both PI3K and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, the Muse™ PI3K/MAPK Dual Pathway Activation Kit (Merck) was used. After treatment, the supernatant was removed, cells were detached, counted, and adjusted to the concentration of  $1 \times 10^5$  cells, followed by washing, fixation, permeabilization, and centrifugation steps. Cells were stained with anti-phospho-Akt (Ser473) conjugated with Alexa Fluor-555 and anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204 and Thr185/Tyr187) conjugated with PECy5 for 30 min, in the dark, at room temperature according to the manufacturer's instructions. Percentage of phospho-AKT and phospho-ERK positive cells were determined from the fluorescence of cells in each sample analyzed by Muse Cell Analyzer (Merck). Experiments were performed at least four times in duplicates for each treatment.

### mRNA Expression

Analysis of messenger RNA (mRNA) expression was performed in MB cell lines seeded at a density of  $1.8 \times 10^6$  cells in T75 cm<sup>2</sup> culture flasks (NEST) and treated with ANA-12 or control vehicle for 6 or 24 h. After the treatment period, cells were counted and adjusted to the concentration of  $1 \times 10^6$ . Total RNA purification was performed using the kit SV total RNA isolation system (Promega, Fitchburg, USA). Purified total RNA was quantified using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) and 500 ng of total RNA was used to generate complementary DNA (cDNA) using GoScript Reverse Transcriptase kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. mRNA expression levels of target genes (p21, STAT3, Nestin, and TUBB3) were performed using reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) with SYBR Green master mix (Applied Biosystems) and analyzed by StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Cycling was performed as follows: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. This was followed with a dissociation stage of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 95°C for 15 s. Samples were analyzed and calculated using the  $\Delta$ CT method from triplicate reactions, with the levels of gene normalized to the relative Ct value of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). mRNA expression levels of

target genes (BDNF and TrkB) were performed using conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Experiments using PCR were performed using GoTaq Hot Start Polymerase (Promega) according to the manufacturer's instruction. Cycling conditions were as follows: 35 cycles for amplification that consisted of 1 min at 95°C, denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C, 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 GAPDH were electrophoresed through 1.5% agarose gels containing ethidium bromide (Biotium, Fremont, CA, USA) and visualized with ultraviolet light. Primers are listed in **Table 1**.

## Protein Extraction and Immunoblotting

MB cells were plated at a density of  $1.8 \times 10^6$  cells in T75 cm<sup>2</sup> culture flasks (NEST) and treated with ANA-12 or control vehicle for 6 or 24 h. After treatment, cells were lysed in cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich) and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. Protein concentration was determined by Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, USA) using the spectrophotometer SpectraMax Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, USA) at a wavelength of 540 nm. Subsequently 20 µg of protein was separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P PVDF, EMD, Merck). Membranes were blocked with 5% fat-free milk in Tris buffered saline with Tween-20 (TBST) (0.01% Tween) for 1 h, incubated with antibodies against p21 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and β-Tubulin III (1:1,000, Abcam, Cambridge, MA, USA) overnight at 4°C and followed by 1-h incubation at room temperature with horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:2,000, Sigma Aldrich). Chemiluminescence was detected using ECL Western Blotting substrate (Merck, USA) and analyzed by ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Membrane was stained with Coomassie blue (0.025%) for protein load control. Densitometric analyses were performed using ImageJ

software and relative densitometric unit (RDU) was calculated by the normalization of interest protein level to Coomassie blue staining. ANA-12 treated cells were corrected by control groups (DMSO-treated cells). Three individual replicates were performed. See **Supplementary Online Material** for further details.

## Immunohistochemistry

ANA-12 and vehicle-treated D283 xenograft samples were harvested, formalin-fixed, paraffin-embedded and sectioned at 4 µm. Antigen retrieval was performed using preheated pH 6.0 citrate buffer. Endogenous peroxidase activity was blocked using 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min. Sections were blocked and stained with primary antibodies against: Ki67 (1:200, Abcam), p53 (1:100, Santa Cruz), TrkB (1:800, Abcam), and phospho-TrkB (Y706/707, 1:100, Abcam) overnight at 4°C. Secondary antibody incubation was performed at room temperature for 90 min utilizing an HRP-labeled anti-rabbit IgG (Merck), and staining was visualized with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako, CA, USA) following the manufacturer's instructions. All slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated and permanently mounted using standard procedures. Quantitative evaluation was made using Immunohistochemistry (IHC) profiler plugin in the software ImageJ (Varghese et al., 2014).

## Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 6.0. Data were represented as means ± standard error of mean (SEM). For comparison between two data sets, a two-tailed unpaired Mann-Whitney test was used. For analysis of three or more sets of data, ANOVA test followed by Bonferroni multiple comparison test was used;  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## RESULTS

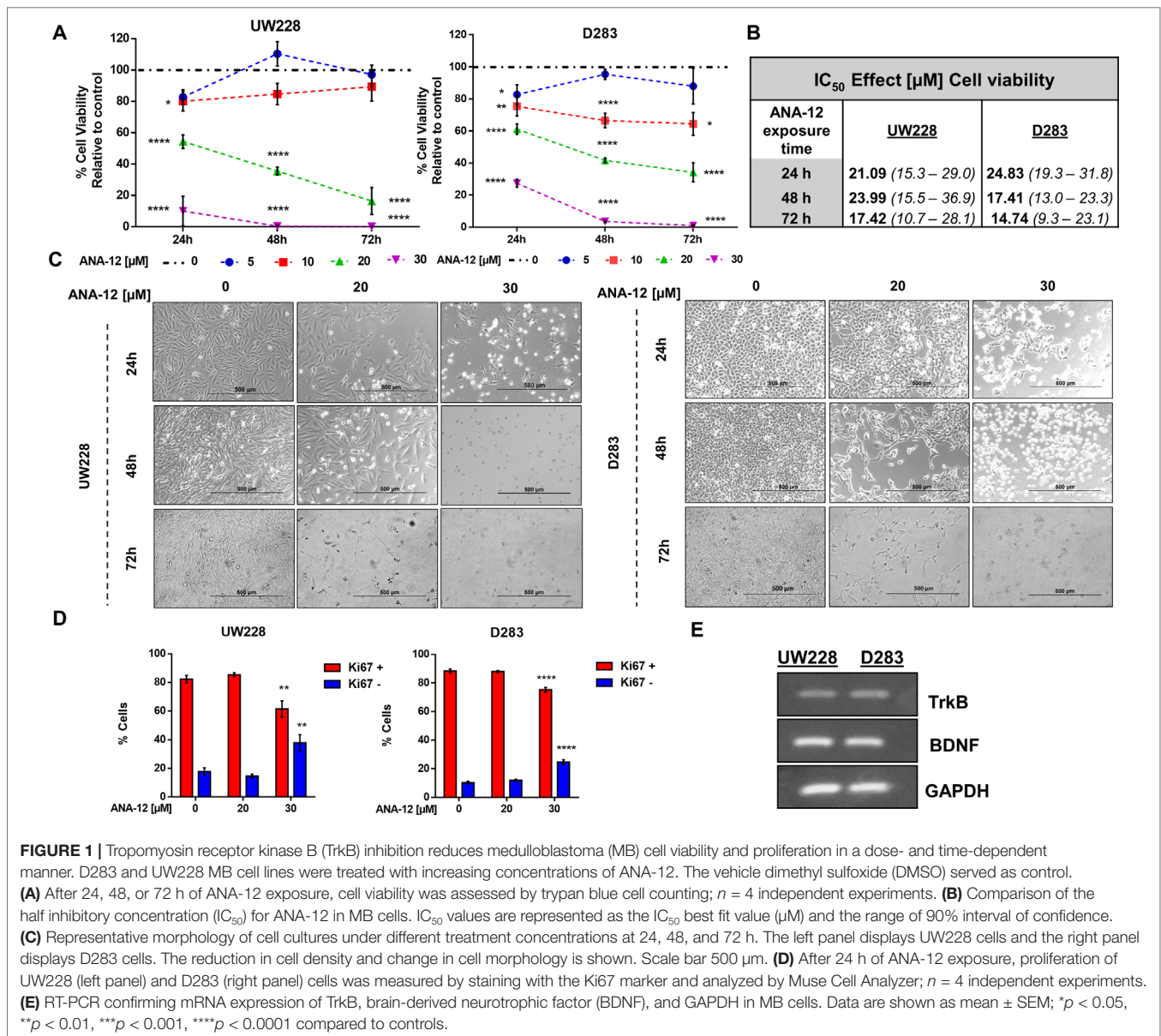
### Selective TrkB Inhibition Suppresses Cell Viability and Proliferation of MB Cells

To evaluate the effects of TrkB inhibition on MB cell viability, we exposed the cells to varying concentrations of ANA-12 (5, 10, 20, or 30 µM) for different time periods (24, 48, or 72 h). A dose-dependent reduction of cell viability was observed in both cell lines, and increasing effects were observed with longer exposure ANA-12 (**Figure 1A**). Fifty percent inhibition of growth (IC<sub>50</sub>) was calculated for ANA-12 considering different exposure times, ranging from 23.99 to 17.42 µM in UW228 cells and 24.83 to 14.74 in D283 cells (**Figure 1B**). Moreover, changes in cell viability were accompanied by alterations in cell morphology characteristic of cell death features in both cell lines, and differentiation in UW228 cells (**Figure 1C**).

We next assessed cell proliferation using the Ki67 marker in cells exposed to ANA-12 for 24 h. Exposure to ANA-12 for 24 h resulted in a significant decrease in the percentage of cells positive for Ki67 (**Figure 1D**). Expression of BDNF and TrkB in MB cells was confirmed by PCR analysis (**Figure 1E**). These results indicate that TrkB inhibition reduces viability and proliferation in cell lines representative of different molecular subgroups of MB.

**TABLE 1** | Forward and reverse primer sequences used for RT-PCR amplification.

Gene	Primer sequence
TrkB	Forward: 5'- TGGTGCATCCATTCACCTGT-3' Reverse: 5'- CGTGGTACTCCGTGTGATTG-3'
GAPDH	Forward: 5'- CAAGATCATCAGCAATGCCTCC-3' Reverse: 5'- GACTGTGGTCATGAGTCCC-3'
STAT3	Forward: 5'- AGTGACCAGGCAGAAGATGC-3' Reverse: 5'- CACGTACTCCATCGCTGACA-3'
p21	Forward: 5'- ACTCTCAGGTGCGAAAACGG-3' Reverse: 5'- CTTCCCTGTGGCGGATTAGG-3'
TUBB3	Forward: 5'- CTCAGGGGCCTTTGGACATC-3' Reverse: 5'- CAGGCAGTCGCAGTTTTTAC-3'
Nestin	Forward: 5'- GAGAAACAGGGCCACAGAG-3' Reverse: 5'- AAAGCTGAGGGAAGTCTTGG-3'
BDNF	Forward: 5'- GGCTATGTGGAGTTGGCATT-3' Reverse: 5'- CTTGAGAGCCCTCGTTTTG-3'



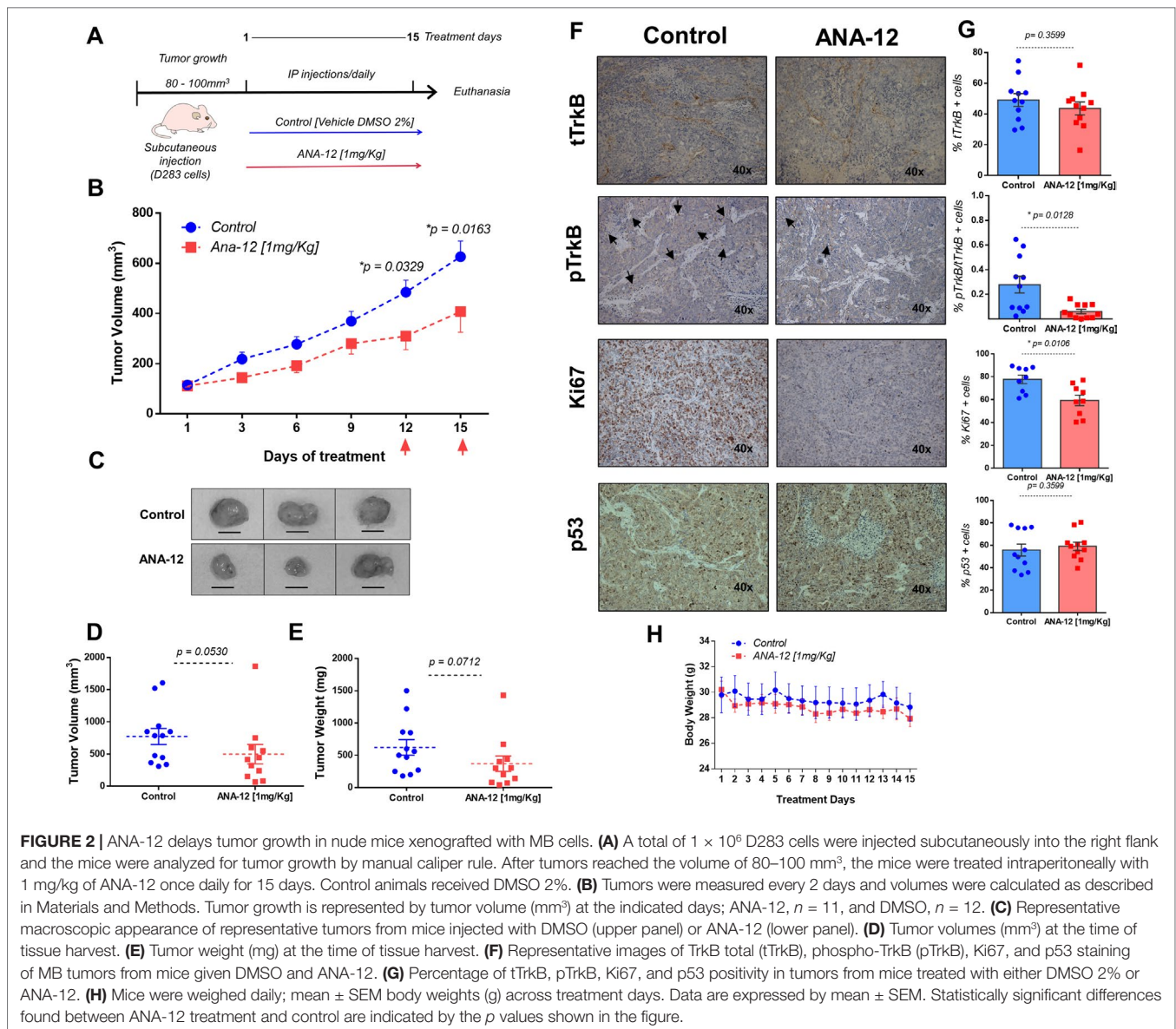
**FIGURE 1 |** Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) inhibition reduces medulloblastoma (MB) cell viability and proliferation in a dose- and time-dependent manner. D283 and UW228 MB cell lines were treated with increasing concentrations of ANA-12. The vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) served as control. **(A)** After 24, 48, or 72 h of ANA-12 exposure, cell viability was assessed by trypan blue cell counting; *n* = 4 independent experiments. **(B)** Comparison of the half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for ANA-12 in MB cells. IC<sub>50</sub> values are represented as the IC<sub>50</sub> best fit value (μM) and the range of 90% interval of confidence. **(C)** Representative morphology of cell cultures under different treatment concentrations at 24, 48, and 72 h. The left panel displays UW228 cells and the right panel displays D283 cells. The reduction in cell density and change in cell morphology is shown. Scale bar 500 μm. **(D)** After 24 h of ANA-12 exposure, proliferation of UW228 (left panel) and D283 (right panel) cells was measured by staining with the Ki67 marker and analyzed by Muse Cell Analyzer; *n* = 4 independent experiments. **(E)** RT-PCR confirming mRNA expression of TrkB, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and GAPDH in MB cells. Data are shown as mean ± SEM; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, \*\*\*\**p* < 0.0001 compared to controls.

### TrkB Inhibition Impairs MB Growth in Mice D283 Xenograft With D283 MB Tumors

We next assessed the effects of ANA-12 on MB growth *in vivo*. D283 MB cells were grown subcutaneously in nude mice until tumors were apparent (~80–100 mm<sup>3</sup>). ANA-12 was administered *i.p.* at 1 mg/kg daily for 15 days. Control animals received vehicle alone (DMSO 2%) in the same injection regimen. The tumor growth was significantly delayed in ANA-12 treated mice compared with vehicle-treated controls (**Figure 2**). Mice treated with ANA-12 showed a slower rate of tumor growth at 12 and 15 days of treatment and an average reduction in tumor volume of 35%, whereas growth continued at a high rate in control animals (**Figure 2B**). *Ex vivo* tumor analysis showed an apparent reduction in tumor volume and weight; however, these differences did not reach statistical

significance (**Figure 2C–E**). Importantly, the treatment protocol used did not induce overt toxicity, and there were no significant changes in animal weights over the study period (**Figure 2H**). We analyzed the protein content of TrkB and phospho-TrkB in tumor samples and found reduced levels of phospho-TrkB in tumors from mice treated with ANA-12. The antibody used detects the double specific residues Y706/707 that are positioned at the autophosphorylation site, which is essential for the TrkB activation. The phosphorylation of these specific sites also recruits adaptor proteins when phosphorylated, including Grb2 and SH2B, that can participate in the signaling through the ERK and AKT pathways (Boltaev et al., 2017; Saarelainen et al., 2003). Ki67 IHC staining was used to investigate the extent of proliferation in the tumors. Tumors from mice receiving ANA-12 showed a reduction of approximately 20% in Ki67-positive





tumor cells. Finally, we verified whether ANA-12 would affect p53 expression. There was no difference in p53 staining between ANA-12-treated and control groups (Figure 2F and G). These results indicate that TrkB inhibition results in significant *in vivo* antitumoral activity in MB xenografts.

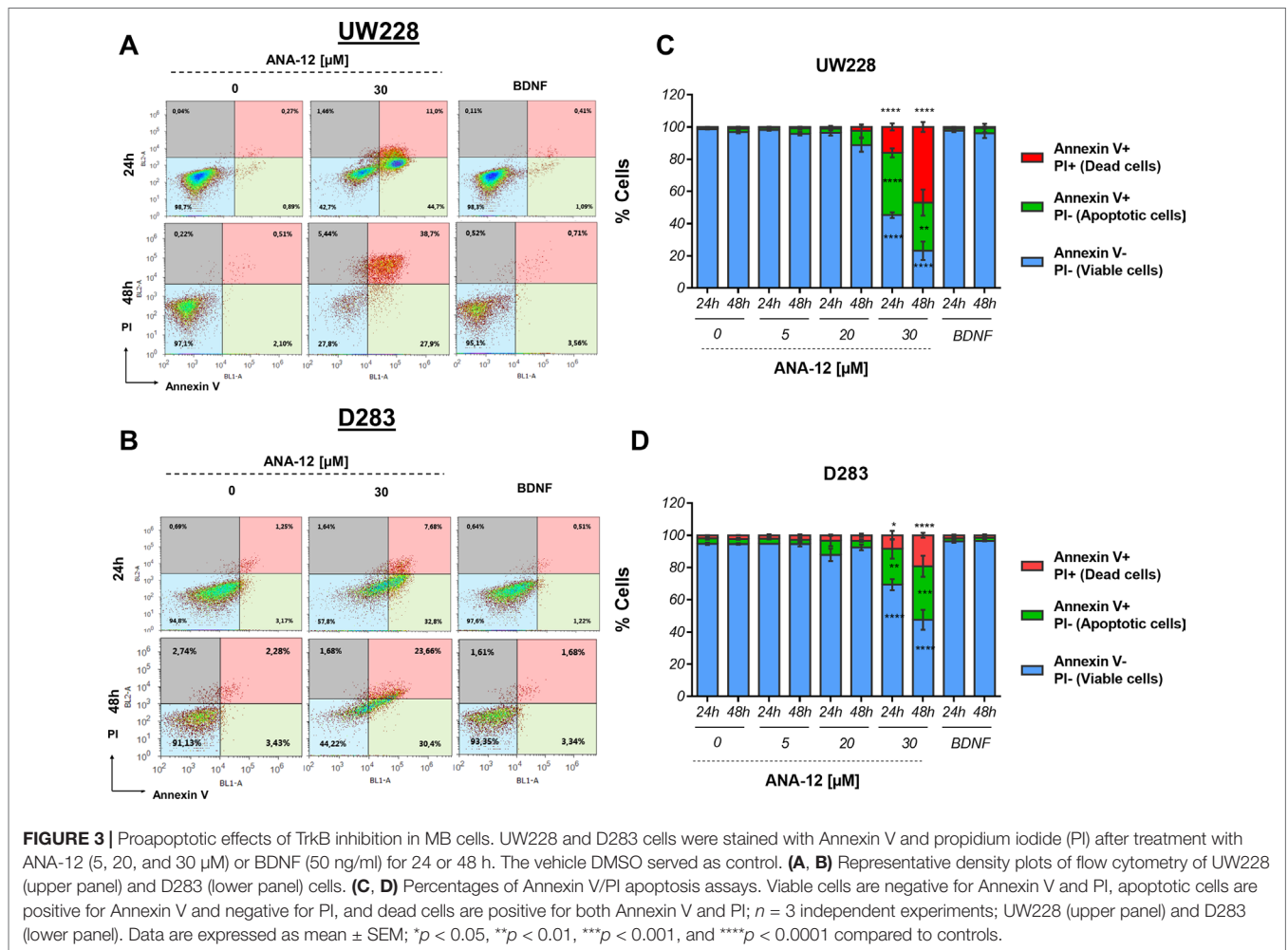
### TrkB Inhibition Induces Proapoptotic Effects in MB Cells

We assessed the induction of apoptosis in cells treated with different doses of ANA-12 or recombinant BDNF (50 ng/ml) for 24 and 48 h by flow cytometry analysis of Annexin V/PI staining. A significant increase in cell death was observed in response to ANA-12 at 30  $\mu$ M. Also, there was an increase in the percentage of cells positive for Annexin V after 24 h of treatment, when compared with either control or BDNF-treated cells; 38.67% of

UW228 cells (Figure 3A and C) and 28.78% for D283 cells (Figure 3B and D) were stained for Annexin V only and were considered apoptotic cells. After 48 h of treatment, there was an increase in the percentage of cells stained for both Annexin V and PI (dead cells), namely, 44.84% in UW228 cells and 17.36% in D283 cells. Thus, TrkB inhibition dose-dependently induced apoptosis.

### The Antiproliferative and Proapoptotic Effects of TrkB Inhibition Are Associated With Extracellular-Regulated Kinase Pathway Regulation

To investigate molecular pathways associated with the antiproliferative and proapoptotic effects of TrkB inhibition, we evaluated the activation of two major pathways simultaneously,



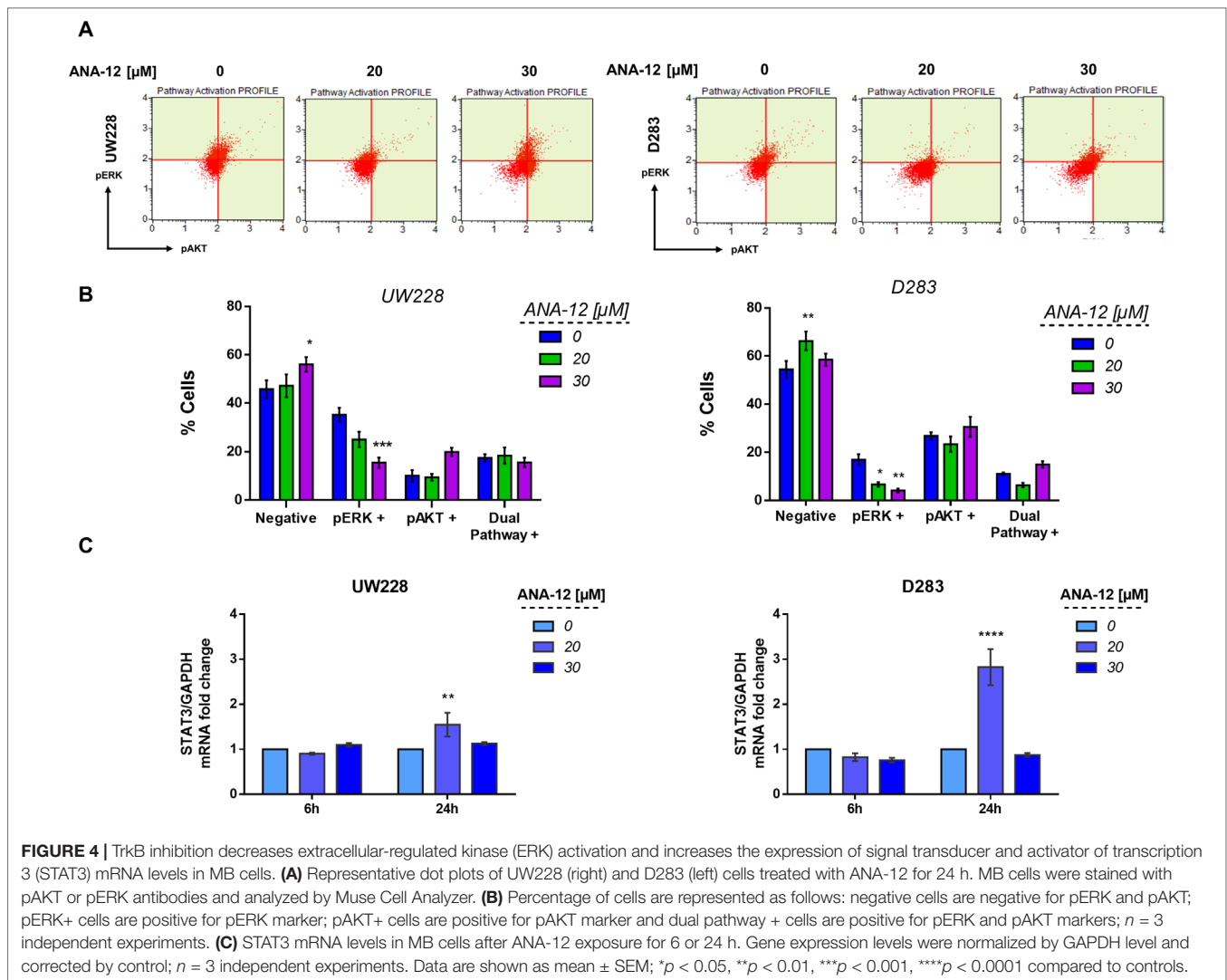
protein kinase B (PKB or AKT) and extracellular-regulated kinase (ERK), which are involved in mediating intracellular responses to TrkB activation. After exposure of 30  $\mu\text{M}$  ANA-12 for 24 h, a decrease in the percentage of phospho-ERK positive cells was detected in UW228 cells (15.46%) in comparison with control cells (32.25%) (Figure 4A and B, left panels). In D283 cells, ANA-12 at 20 or 30  $\mu\text{M}$  was effective in reducing phospho-ERK (6.16% and 4.16%, respectively) when compared with control cells (16.94%) (Figure 4A and B, right panels). There were also increases in negative cells, and no differences were observed for AKT or dual-pathway activation.

We also evaluated the transcriptional expression level of the Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which is a known downstream mediator of BDNF/TrkB, AKT, and ERK signaling. MB cells exposed to ANA-12 at 20  $\mu\text{M}$  for 24 h, concentrations close to  $\text{IC}_{50}$  values, resulted in approximately 1.5- and 2.8-fold change increases of STAT3 transcriptional expression in UW228 and D283 cells, respectively (Figure 4C). These results support the possibility that reductions in ERK activation may be involved in the antiproliferative and proapoptotic actions of TrkB inhibition in MB cells, and the treatment also results in increased expression of STAT3.

### TrkB Inhibition Regulates p21 Gene Expression in MB Cells

The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 is a well-known tumor suppressor that promotes cell cycle inhibition, transcriptional regulation, and modulation of apoptosis. In order to access the status of p21 expression after TrkB inhibition, we treated MB cells with ANA-12 for 6 or 24 h and then performed RT-qPCR and Western blot analyses. TrkB inhibition led to increases in both mRNA expression and protein levels of p21 in UW228 cells in a dose-dependent manner. In addition, we observed 3 and 10.8-fold change increase of p21 mRNA expression in UW228 cells after 6 and 24 h of ANA-12, respectively (Figure 5A, left panel). UW228 cells exposed to 20 and 30  $\mu\text{M}$  of ANA-12 for 6 h showed approximately 1.97- and 2.49-fold change increases in the protein levels of p21 (Figure 5B and C, left panel).

Interestingly, opposite effects of TrkB inhibition on p21 expression were found in D283 cells. Significant 2- to 3.3-fold decreases in p21 mRNA levels were observed in D283 cells treated with ANA-12 for 6 and 24 h, respectively (Figure 5A, right panel). We also detected a 2.5-fold change decrease in p21 protein content in D283 cells exposed to ANA-12 for



24 h (Figure 5B and C, right panel). These results indicate differential responses of p21 expression to TrkB inhibition in different cell lines.

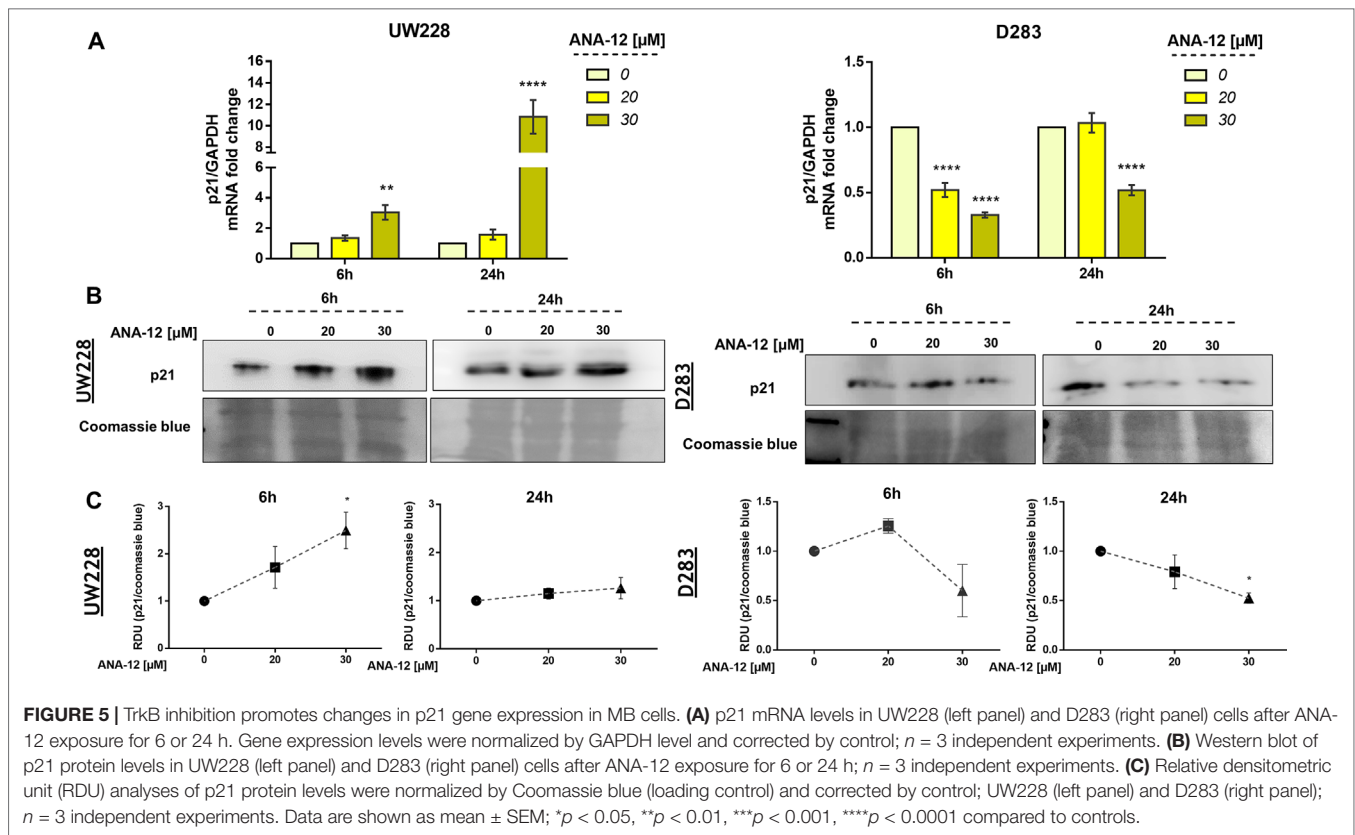
### Inhibiting TrkB Induces Morphological Changes and Alters the Expression of Differentiation and Pluripotency Markers

We went on to investigate whether morphological changes observed after ANA-12 treatment would be associated with changes in differentiation in MB cells. We observed neurite-like extensions after 24 h of ANA-12 treatment, particularly in UW228 cells (Figure 6A, left panel), whereas D283 cells showed predominantly morphologic features associated with cell death (Figure 6A, right panel). Next, we performed flow cytometry analysis to evaluate the forward and side scatter characteristics, particularly the Side scatter area (SSC-A) parameter that indicates cell granularity or internal complexity. We observed an increase in cell complexity and granularity in UW228 cells treated with ANA-12 at 30  $\mu$ M for 24 h (Figure 6B and C). Moreover, we measured the expression

level of the neural differentiation marker  $\beta$ -III tubulin (TUBB3) and the neural stem/progenitor cell marker Nestin. We found that the transcriptional expression level of Nestin was decreased in a dose-dependent manner in both MB cell lines (Figure 6D). We also observed a 1.8-fold change increase in TUBB3 mRNA levels in UW228 cells (Figure 6E); however, there were no differences in the protein content of TUBB3 (Figure 6F and G). These findings suggest that UW228 cells, classified SHH MB subtype, display features of cell differentiation after TrkB inhibition, and both cell lines showed reductions of the pluripotency marker Nestin.

## DISCUSSION

We have previously reported (Thomaz et al., 2016) that ANA-12, a small molecule selective TrkB inhibitor (Cazorla et al., 2011), decreased cell viability and survival and promoted cell cycle arrest in MB cells *in vitro*. To increase our understanding of the functional role of TrkB in MB, here we evaluated cellular changes possibly associated with the antitumoral effects of TrkB

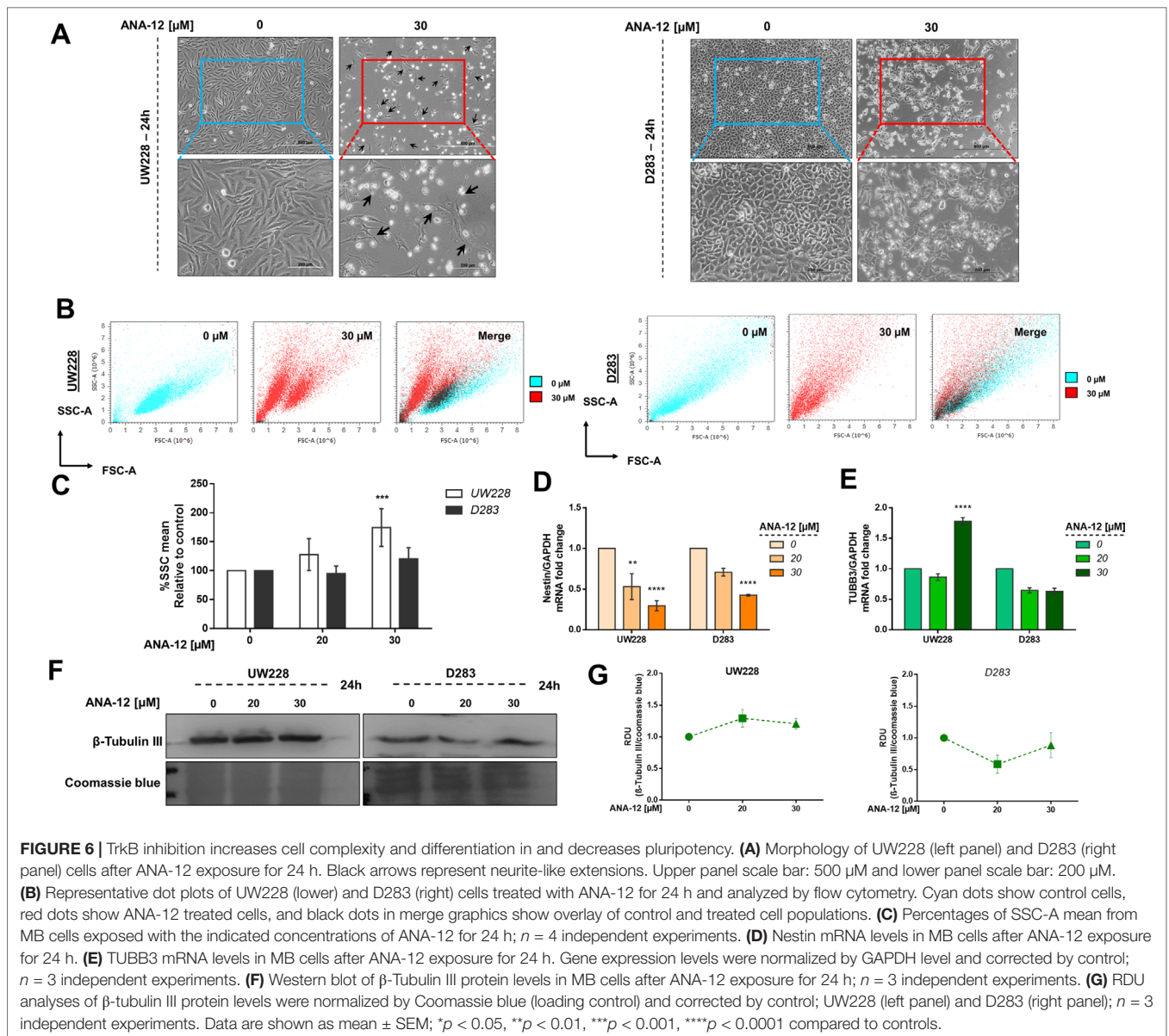


inhibition *in vitro* and *in vivo*. ANA-12 has been successfully used to target TrkB in preclinical studies of other types of tumors, including lung cancer, Ewing sarcoma, glioblastoma, oral squamous carcinoma, and leukemia (Polakowski et al., 2014; Sinkevicius et al., 2014; Heinen et al., 2016; Pinheiro et al., 2017; Moriwaki et al., 2018). The present study is the first to evaluate the antitumoral effects of ANA-12 in a pediatric cancer animal model. Overall, it shows that pharmacological TrkB inhibition by ANA-12 hinders the activation of TrkB downstream targets, such as ERK signaling, modulates gene expression, and leads to decreased MB cell viability and proliferation, induction of apoptosis, and promotion of morphological and molecular changes that are consistent with differentiation in MB cells. Two cell lines representative of different MB molecular subgroups were used in our study: UW228 cells are TP53-mutated and classified as Shh, whereas D283 cells are classified as Group 3/4 (Ivanov et al., 2016).

We found that MB cells treated with ANA-12 showed a decrease in the activation of ERK signaling pathway as measured by phospho-ERK. The ERK/MAPK cascade mediates the stimulatory effects of TrkB activation on proliferation (Chao, 2003; Thiele et al., 2009), and aberrant ERK signaling activation promotes proliferative stimuli in Shh and Group 4 MB (Badodi et al., 2017). ANA-12 is able to reduce ERK activation induced by BDNF in astrocytes (Saba et al., 2018) and prevent ERK activation in neurons (Brady et al., 2018). These findings are consistent with the possibility that blocking TrkB activity suppresses ERK-mediated growth and survival actions in MB.

STAT3 mRNA levels were increased by treatment with ANA-12, whereas phospho-AKT levels remained unchanged. STAT3 plays an important role as an intermediate molecule linked to TrkB and AKT activation (Radin and Patel, 2017). MB tumors commonly present deregulation and aberrant expression of AKT and STAT3 and the activation of these pathways is associated with enhanced cellular survival, migration, angiogenesis, and resistance to chemotherapeutic agents (Hartmann et al., 2006; Xiao et al., 2015). MB brain tumor-initiating cells expressing CD133 drive recurrence mediated by STAT3 activation (Garg et al., 2017). Thus, the upregulation in STAT3 after anticancer treatment with a TrkB inhibitor suggested by our findings could indicate a compensatory response to counteract the inhibitory effects. In fact, inhibition of receptor tyrosine kinases including the epidermal growth factor receptor (EGFR) and HER2 in experimental cancer models can trigger feedback activation of STAT3 as a possible mechanism of resistance to targeted therapies (Zhao et al., 2016). However, other studies indicate a dual role of STAT3, where it can act as a tumor suppressor. For instance, endogenous STAT3 activation or expression of a constitutively active form of STAT3 inhibits glioblastoma cell proliferation and invasiveness (de la Iglesia et al., 2008; Luwor et al., 2013). Thus, the increase in STAT3 expression we observed in ANA-12-treated cells may contribute to the antiproliferative effect of TrkB inhibition.

Inhibiting TrkB resulted in differential modulatory effects on p21 expression in the two MB cell lines used, where UW228 cells treated with ANA-12 showed an increase in p21 transcriptional



expression whereas a decrease was found in D283 cells. It is possible that the increased expression of p21 in UW228 cells is associated with growth arrest, whereas decreased expression of p21 in D283 cells might be related to apoptosis. In addition, UW228 cells are TP53 mutated while D283 cells display TP53 expression (Ivanov et al., 2016). p21 displays a complex pattern of actions in regulating the cell cycle and interacting with other signaling components, and its role and expression may be different depending on p53 expression (Abbas and Dutta, 2009).

TrkB plays a role in cell differentiation during normal CNS development. We found that UW228 cells exposed to ANA-12 showed increased cellular complexity. Consistently with the observed morphological alterations, UW228 cells showed a small increase in mRNA levels of TUBB3 after TrkB inhibition. Upregulation of TUBB3 was previously associated with differentiation in MB cells (Fiaschetti et al., 2014). Moreover,

a decreased expression of Nestin, a marker of stemness, was detected in both MB cells treated with ANA-12. Nestin is commonly used as a marker for neural stem cell and cancer stem cell populations (Neradil and Veselska, 2015), and its expression increases progressively during MB development (Li et al., 2013). Nestin cooperates with the Shh pathway to drive tumor growth and Nestin suppression inhibits cell proliferation and promotes differentiation in MB (Li et al., 2016a; Li et al., 2016b). Thus, our findings provide early evidence that TrkB might be a target to induce differentiation in MB, particularly in Shh tumors, a possibility that should be further explored by future studies.

A recent study used ANA-12 as an experimental treatment for oral squamous carcinoma *in vivo* and found reduction of tumor growth in a pattern consistent with our results in MB (Moriwaki et al., 2018). Other TrkB inhibitors have also been shown to efficiently reduce the growth of neuroblastoma in mouse

models (Croucher et al., 2015; Li et al., 2015). Our final series of experiments provides the first evidence that TrkB inhibition slows MB growth *in vivo*.

Given the critical role of BDNF/TrkB signaling in brain development and plasticity, concerns may arise regarding potential adverse effects of TrkB inhibitors on nervous system function in MB patients. Although this issue must be carefully considered and investigated, recent clinical studies of the pan-Trk inhibitor larotrectinib in children with NTRK gene fusion-positive solid tumors have suggested a good safety profile (Drilon et al., 2018; Laetsch et al., 2018).

Together, our results support the view that specific inhibition of TrkB can be effective as a therapy for MB, likely through mechanisms involving modulation of apoptosis and cell differentiation.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

All experimental procedures have been approved by the institutional research ethics committee and the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-HCPA).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AT, KP, BS, and MJ performed the experiments. AT, AB, VR, CN, and RR drafted the manuscript. AT, KP, BS, MJ, LG, AB, CF, CN,

VR, MDT, VR and RR contributed to designing the experiments, analyzing and interpreting the data, and revising and approving the final version of the manuscript.

## FUNDING

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 303276/2013-4 and 409287/2016-4 to RR and grant number 201001/2014-4 to CN); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21); the Children's Cancer Institute (ICI); the Rio Grande do Sul State Research Foundation (FAPERGS; grant number 17/2551-0001 071-0 to RR); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel; and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA). CN is also supported by the William Donald Nash fellowship from the Brain Tumour Foundation of Canada. VR is supported by operating funds from the Canadian Institutes for Health Research, the American Brain Tumor Association, and the Brain Tumour Foundation of Canada. MT is supported by the National Institutes of Health, the Pediatric Brain Tumour Foundation, the Terry Fox Research Institute, the Canadian Institutes of Health Research, The Cure Search Foundation, b.r.a.i.n.child, Meagan's Walk, Genome Canada, Genome BC, the Ontario Institute for Cancer Research, and the Canadian Cancer Society Research Institute.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00698/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Abbas, T., and Dutta, A. (2009). P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–414. doi: 10.1038/nrc2657
- Badodi, S., Dubuc, A., Zhang, X., Basson, M. A., Taylor, M. D., and Marino S. (2017). Convergence of BMI1 and CHD7 on ERK signaling in medulloblastoma. *Cell Rep.* 21, 2772–2784. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.021
- Boltaev, U., Meyer, Y., Tolibzoda, F., Jacques, T., Gassaway, M., Xu, Q., et al. (2017). Multiplex quantitative assays indicate a need for reevaluating reported small-molecule TrkB agonists. *Sci. Signal.* 10, eaal1670. doi: 10.1126/scisignal.aal1670
- Brady, M. L., Pilli, J., Lorenz-Guertin, J. M., Das, S., Moon, C. E., Graff, N., et al. (2018). Depolarizing, inhibitory GABA type A receptor activity regulates GABAergic synapse plasticity via ERK and BDNF signaling. *Neuropharmacology* 128, 324–339. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.022
- Cavalli, F. M. G., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D. J. H., Luu, B., et al. (2017). Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. *Cancer Cell* 31, 737–754.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2017.05.005
- Cazorla, M., Prémont, J., Mann, A., Girard, N., Kellendonk, C., and Rognan, D. (2011). Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1846–1857. doi: 10.1172/JCI43992
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 299–309. doi: 10.1038/nrn1078
- Chodroff, L., Bendele, M., Valenzuela, V., Henry, M., and Ruparel, S. (2016). EXPRESS: BDNF signaling contributes to oral cancer pain in a preclinical orthotopic rodent model. *Mol. Pain* 12, 1744806916666841. doi: 10.1177/1744806916666841
- Chou, T. T., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1997). Neurotrophin signal transduction in medulloblastoma. *J. Neurosci. Res.* 49, 522–527. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970901)49:5<522::AID-JNR2>3.0.CO;2-D
- Cocco, E., Scaltriti, M., and Drilon, A. (2018). NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 731–747. doi: 10.1038/s41571-018-0113-0
- Croucher, J. L., Iyer, R., Li, N., Molteni, V., Loren, J., Gordon, W. P., et al. (2015). TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 131–141. doi: 10.1007/s00280-014-2627-1
- de la Iglesia, N., Konopka, G., Lim, K. L., Nutt, C. L., Bromberg, J. F., Frank, D. A., et al. (2008). Deregulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness. *J. Neurosci.* 28, 5870–5878. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5385-07.2008
- Drilon, A., Laetsch, T. W., Kummar, S., DuBois, S. G., Lassen, U. N., Demetri, G. D., et al. (2018). Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N. Engl. J. Med.* 378, 731–739. doi: 10.1056/NEJMoa1714448
- Fiaschetti, G., Abela, L., Nonoguchi, N., Dubuc, A. M., Remke, M., Boro, A., et al. (2014). Epigenetic silencing of miRNA-9 is associated with HES1 oncogenic activity and poor prognosis of medulloblastoma. *Br. J. Cancer* 110, 636–647. doi: 10.1038/bjc.2013.764
- Friedrich, C., Shalaby, T., Oehler, C., Pruschy, M., Seifert, B., Picard, D., et al. (2017). Tropomyosin receptor kinase C (TrkC) expression in medulloblastoma:

- relation to the molecular subgroups and impact on treatment response. *Childs Nerv. Syst.* 33, 1463–1471. doi: 10.1007/s00381-017-3506-y
- Garg, N., Bakhshinyan, D., Venugopal, C., Mahendram, S., Rosa, D. A., Vijayakumar, T., et al. (2017). CD133+ brain tumor-initiating cells are dependent on STAT3 signaling to drive medulloblastoma recurrence. *Oncogene* 36, 606–617. doi: 10.1038/onc.2016.235
- Hartmann, W., Digon-Söntgerath, B., Koch, A., Waha, A., Endl, E., Dani, I., et al. (2006). Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. *Clin. Cancer Res.* 12, 3019–3027. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2187
- Heinen, T. E., Dos Santos, R. P., da Rocha, A., Dos Santos, M. P., Lopez, P. L., Silva Filho, M. A., et al. (2016). Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7, 34860–34880. doi: 10.18632/oncotarget.8992
- Ivanov, D. P., Coyle, B., Walker, D. A., and Grabowska, A. M. (2016). In vitro models of medulloblastoma: choosing the right tool for the job. *J. Biotechnol.* 236, 10–25. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.07.028
- Kim, J. Y., Sutton, M. E., Lu, D. J., Cho, T. A., Goumnerova, L. C., Goritschenko, L., et al. (1999). Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res.* 59, 711–719.
- Kumar, V., Kumar, V., McGuire, T., Coulter, D. W., Sharp, J. G., and Mahato, R. I. (2017). Challenges and recent advances in medulloblastoma therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 1061–1084. doi: 10.1016/j.tips.2017.09.002
- Laetsch, T. W., DuBois, S. G., Mascarenhas, L., Turpin, B., Federman, N., Albert, C. M., et al. (2018). Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 19, 705–714. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30119-0
- Lange, A. M., and Lo, H. W. (2018). Inhibiting TRK proteins in clinical cancer therapy. *Cancers (Basel)* 10 (4), E105. doi: 10.3390/cancers10040105
- Li, C., Macdonald, J. I. S., Hryciw, T., and Meakin, S. O. (2010). Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells. *J. Neurochem.* 112, 882–899. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06507.x
- Li, C., MacDonald, J. I., Talebian, A., Leuenberger, J., Seah, C., Pasternak, S. H., et al. (2016a). Unravelling the mechanism of TrkA-induced cell death by macropinocytosis in medulloblastoma Daoy cells. *Mol. Cell Biol.* 36, 2596–2611. doi: 10.1128/MCB.00255-16
- Li, P., Du, F., Yuelling, L. W., Lin, T., Muradimova, R. E., Tricarico, R., et al. (2013). A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat. Neurosci.* 16, 1737–1744. doi: 10.1038/nn.3553
- Li, P., Lee, E. H., Du, F., Gordon, R. E., Yuelling, L. W., Liu, Y., et al. (2016b). Nestin mediates hedgehog pathway tumorigenesis. *Cancer Res.* 76, 5573–5583. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1547
- Li, Z., Zhang, Y., Tong, Y., Tong, J., and Thiele, C. J. (2015). Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 16, 477–483. doi: 10.1080/15384047.2015.1016659
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., et al. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Luwor, R. B., Stylli, S. S., and Kaye, A. H. (2013). The role of Stat3 in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* 20, 907–911. doi: 10.1016/j.jocn.2013.03.006
- Meng, L., Liu, B., Ji, R., Jiang, X., Yan, X., and Xin, Y. (2019). Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncol. Lett.* 17, 2031–2039. doi: 10.3892/ol.2018.9854
- Moriwaki, K., Ayani, Y., Kuwabara, H., Terada, T., Kawata, R., and Asahi, M. (2018). TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 9, 25225–25243. doi: 10.18632/oncotarget.25396
- Neradil, J., and Veselska, R. (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 106, 803–811. doi: 10.1111/cas.12691
- Nör, C., de Farias, C. B., Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., and Roesler, R. (2011). The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DA0Y human medulloblastoma cells. *Childs Nerv. Syst.* 27, 897–901. doi: 10.1007/s00381-011-1439-4
- Northcott, P. A., Robinson, G. W., Kratz, C. P., Mabbott, D. J., Pomeroy, S. L., Clifford, S. C., et al. (2019). Medulloblastoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* 5, 11. doi: 10.1038/s41572-019-0063-6
- Northcott, P. A., Shih, D. J., Peacock, J., Garzia, L., Morrissy, A. S., Zichner, T., et al. (2012). Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488, 49–56. doi: 10.1038/nature11327
- Park, H., and Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23. doi: 10.1038/nrn3379
- Pinheiro, K. V., Alves, C., Buendia, M., Gil, M. S., Thomaz, A., Schwartzmann, G., et al. (2017). Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. *Neuro. Oncol.* 19, 138–139. doi: 10.1093/neuonc/now199
- Polakowski, N., Terol, M., Hoang, K., Nash, I., Laverdure, S., Gazon, H., 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, 13482–13494. doi: 10.1128/JVI.02285-14
- Radin, D. P., and Patel, P. (2017). BDNF: an oncogene or tumor suppressor? *Anticancer Res.* 37, 3983–3990. doi: 10.21873/anticancer.11783
- Ramaswamy, V., and Taylor, M. D. (2017). Medulloblastoma: from myth to molecular. *J. Clin. Oncol.* 35, 2355–2363. doi: 10.1200/JCO.2017.72.7842
- Roesler, R., de Farias, C. B., Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., and Schwartzmann, G. (2011). BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11, 1473–1475. doi: 10.1586/era.11.150
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., et al. (2003). Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J. Neurosci.* 23, 349–357.
- Saba, J., Turati, J., Ramirez, D., Carniglia, L., Durand, D., Lasaga, M., et al. (2018). Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. *J. Neurochem.* 146, 686–702. doi: 10.1111/jnc.14476
- Sabel, M., Fleischhack, G., Tippelt, S., Gustafsson, G., Doz, F., Kortmann, R., et al. (2016). Relapse patterns and outcome after relapse in standard risk medulloblastoma: a report from the HIT-SIOP-PNET4 study. *J. Neurooncol.* 129, 515–524. doi: 10.1007/s11060-016-2202-1
- Schmidt, A. L., de Farias, C. B., Abujamra, A. L., Kapczynski, F., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., et al. (2010). BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J. Mol. Neurosci.* 40, 303–310. doi: 10.1007/s12031-009-9221-8
- Segal, R. A., Goumnerova, L. C., Kwon, Y. K., Stiles, C. D., and Pomeroy, S. L. (1994). Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12867–12871. doi: 10.1073/pnas.91.26.12867
- Sinkevicius, K. W., Kriegel, C., Bellaria, K. J., Lee, J., Lau, A. N., Leeman, K. T., et al. (2014). Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10299–10304. doi: 10.1073/pnas.1404399111
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 123, 465–472. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z
- Thiele, C. J., Li, Z., and McKee, A. E. (2009). On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res.* 15, 5962–5967. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0651
- Thomaz, A., Jaeger, M., Buendia, M., Bambini-Junior, V., Greganian, L. J., Brunetto, A. L., et al. (2016). BDNF/TrkB signaling as a potential novel target in pediatric brain tumors: anticancer activity of selective TrkB inhibition in medulloblastoma cells. *J. Mol. Neurosci.* 59, 326–333. doi: 10.1007/s12031-015-0689-0
- Vaishnavi, A., Le, A. T., and Doebele, R. C. (2015). TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* 5, 25–34. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0765
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., and De, A. (2014). IHC profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One* 9, e96801. doi: 10.1371/journal.pone.0096801
- Venkatesh, H., and Monje, M. (2017). Neuronal activity in ontogeny and oncology. *Trends Cancer* 3, 89–112. doi: 10.1016/j.trecan.2016.12.008

- Washiyama, K., Muragaki, Y., Rorke, L. B., Lee, V. M., Feinstein, S. C., Radeke, M. J., 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, 929–940.
- Xiao, H., Bid, H. K., Jou, D., Wu, X., Yu, W., Li, C., et al. (2015). A novel small molecular STAT3 inhibitor, LY5, inhibits cell viability, cell migration, and angiogenesis in medulloblastoma cells. *J. Biol Chem.* 290, 3418–3429. doi: 10.1074/jbc.M114.616748
- Zhao, C., Li, H., Lin, H. J., Yang, S., Lin, J., and Liang, G. (2016). Feedback activation of STAT3 as a cancer drug-resistance mechanism. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 47–61. doi: 10.1016/j.tips.2015.10.001

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Thomaz, Pinheiro, Souza, Gregianin, Brunetto, Brunetto, de Farias, Jaeger, Ramaswamy, Nör, Taylor and Roesler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## **4.2. Capítulo 2**

**Artigo de revisão com dados originais:** *“Neurotrophin signaling in medulloblastoma”*.

**Status:** Manuscrito em preparação.

**Revista:** Acta Neuropathologica.

**REVIEW**

## **Neurotrophin signaling in medulloblastoma**

**Amanda Thomaz**<sup>1,2</sup> • **Mariane Jaeger**<sup>1,3</sup> • **Algemir L. Brunetto**<sup>1,3</sup> • **André T. Brunetto**<sup>1,3</sup> • **Lauro Gregianin**<sup>1,4,5</sup> • **Caroline Brunetto de Farias**<sup>1,3</sup> • **Vijay Ramaswamy**<sup>6,7</sup> • **Carolina Nör**<sup>6,8</sup> • **Michael D. Taylor**<sup>6,8,9,10</sup> • **Rafael Roesler**<sup>1,2</sup>

- 1 Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 2 Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 3 Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil
- 4 Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 5 Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

- 6 The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
  
- 7 Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
  
- 8 Developmental and Stem Cell Biology Program, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
  
- 9 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada
  
- 10 Division of Neurosurgery, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada

Correspondence:

Rafael Roesler

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.

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

[rafaelroesler@hcpa.edu.br](mailto:rafaelroesler@hcpa.edu.br)

## **Abstract**

Neurotrophins are a family of secreted proteins that act by binding to tropomyosin receptor kinase (Trk) receptors to regulate nervous system development and plasticity. Increasing evidence indicates that neurotrophins and their receptors expressed in cancer cells play a role in tumor growth and resistance to treatment. In this review, we summarize evidence indicating that neurotrophin signaling influences medulloblastoma (MB), the most common type of malignant brain tumor afflicting children and discuss the potential of neurotrophin receptors as new therapeutic targets for the treatment of MB.

**Keywords** Nerve growth factor • Brain-derived neurotrophic factor • Tropomyosin receptor kinase • Neurotrophin • Medulloblastoma • Brain tumor

## Introduction

Driver oncogenes in many types of cancer encode growth factor receptors belonging to the receptor tyrosine kinase (RTK) superfamily, and most molecularly targeted therapies successfully incorporated into clinical practice to date act by targeting RTKs [Arora and Scholar, 2005; Shawver et al., 2002]. Neurotrophins, protein growth factors that activate RTKs of the tropomyosin receptor kinase (Trk) family, are known to be critically involved in regulating neuronal development and have also been increasingly implicated in tumor progression and resistance to treatment in several types of cancer, including those of possible neural origin [Desmond and Peeper, 2006; Roesler et al., 2011; Thiele et al., 2009]. In children, brain cancers are the most common solid tumors and the leading cause of cancer-related mortality. The most common type of malignant childhood brain tumor is medulloblastoma (MB). Although treatment with chemotherapy, radiotherapy, and surgery has improved cure rates, about one-third of patients are not cured, and survivors often experience long-term neurological, cognitive, and endocrinological deficits [Gajjar and Robinson, 2014; Massimino et al., 2016; Northcott et al., 2019; Rossi et al., 2008; von Bueren et al., 2016]. Here, we review the emerging evidence indicating that neurotrophin signaling may be involved in MB, and discuss some of the potential biological, prognostic and clinical implications.

## **MB Biology**

### **Molecular subgroups of MB**

Some of the most important advances in our understanding of MB are related to its classification into four consensus molecular subgroups with distinct genomic, epigenetic, and clinical features: WNT, SHH, Group 3, and Group 4. This classification has quickly become critically important for guiding patient risk stratification, treatment, and selection in clinical trials [Gajjar et al., 2014; Gomes et al., 2018; Northcott et al., 2011; 2012a; 2012b; 2012c; 2012d; 2017; Pugh et al., 2012; Ramaswamy and Taylor; 2017; Ramaswamy et al., 2013; Remke et al., 2013; Taylor et al., 2012; Thompson et al., 2016]. The WNT and SHH subgroups are defined by mutations leading to aberrant activation of the Wingless and Sonic hedgehog pathways, respectively, whereas Group 3 MB has been associated with amplification of genes involved in the Notch and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) pathways, and Group 4 with an increased representation of genes involved in chromatin modification [Northcott et al., 2017]. Patients who exhibit tumors of the more aggressive Group 3 and Group 4 subgroups have a particularly poor prognosis, with patients with Group 3 MB showing a 5-year survival of around 50% and a high rate of metastasis at diagnosis [Cho et al., 2011; Ramaswamy et al., 2016; Northcott et al., 2012c]. More recently, significant intra- and intertumoral heterogeneity has been reported within specific subgroups, and at least 12 unique subtypes within subgroups have been identified [Cavalli et al., 2017; Morrissy et al., 2016; 2017; Northcott et al., 2017; Schwalbe et al., 2017; Sharma et al., 2019; Zapotocky et al., 2018].

## MB origins

Identifying the cellular origin of MB is crucial to understand how normal cells transform into cancer cells. Several childhood tumor types are believed to emerge from errors in development, either directly from embryonal cells or from more mature prenatal cell types that acquire embryonal properties, including aberrant self-renewal capacity [Gilbertson, 2011; Marshall et al., 2014]. In MB, embryonic neural stem cells (NSCs) and different types of neural precursors have been proposed as candidate cells of origin [Gilbertson, 2011; Goodrich et al., 1997; Marshall et al., 2014; Yang et al., 2008].

Different molecular subtypes of MB mirror fetal transcription programs from distinct cerebellar cell lineages that may appear transitionally during development [Vladoiu et al., 2019]. Cell types that descend from cerebellar stem cells, including typical granule neuron precursor cells (GNPCs) and Nestin-positive progenitors (NEPs) committed to the granule neuron lineage, can give rise to SHH-subtype MB upon genetic ablation of *Ptch 1*, which encodes the Sonic hedgehog receptor protein patched homolog 1 [Li et al., 2013; Schüller et al., 2008; Yang et al., 2008]. Different embryonic cerebellar progenitor cells may originate Group 3 MB [Kawauchi et al., 2012; 2017], and deep cerebellar nuclei (DCNs) or their precursors are among the candidate cells of origin of Group 4 MB [Lin et al., 2016]. In contrast, WNT-subtype MB can originate outside the cerebellum, from neuron precursors of the dorsal brainstem [Gibson et al., 2010]. Recent findings indicate that The SHH MB transcriptionally resembles the granule cell hierarchy, whereas Group 3 MB mirrors Nestin+ stem cells, and Group 4 MB resembles unipolar brush cells. In addition, bulk tumours can contain a mixed population of transcriptionally distinct cells [Vladoiu et al., 2019].

## Neurotrophin regulation of nervous system development and function

Several signaling pathways involved in normal neural development and plasticity are hijacked and amplified by cancer to promote tumor growth. Neurotrophins and their receptors play a critical role in regulating nervous system development and neuronal survival and plasticity. Trk neurotrophin receptors, TrkA (encoded by the *NTRK1* gene), TrkB (encoded by *NTRK2*), and TrkC (encoded by *NTRK3*) are activated primarily by their endogenous ligands, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotrophin 3 (NT-3), respectively. NT-3 can also activate TrkA, and TrkB can also be activated by NT-3 and neurotrophin NT-4/5 (NT-4/5). Trk activation by neurotrophins induces receptor homodimerization and transphosphorylation of critical tyrosine residues, leading to intracellular signal transduction mediated by activation of multiple protein kinase pathways, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phospholipase C-gamma (PLC $\gamma$ )/protein kinase C (PKC), ultimately resulting in cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation and changes in gene expression. Other intracellular mechanisms mediating the actions of neurotrophins include increased synaptic insertion of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) glutamate receptors, through a mechanism dependent on PKC and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II (CaMKII), as well as modulation of voltage-gated ion channel function. Neurotrophins and proneurotrophins can also act by binding the p75 neurotrophin receptor (p75NTR, also known as CD271), a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, to promote either the activation of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway, and induce prosurvival signals, or activate the c-Jun N-terminal kinases (JNK) signaling pathway to generate cell death. [Bothwell, 2016; Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003; Park and Poo, 2013]. Mechanisms of neurotrophin-independent Trk activation, for instance through transactivation dependent of G protein-couple receptors (GPCRs), have also been described [Schechterson and



Bothwell, 2010]. Figure 1 summarizes signaling mechanisms mediating cellular actions of neurotrophins.

Trks and p75NTR are expressed in embryonic NSCs, and NGF, BDNF, or NT-3 promote NSC survival [Ahmed et al., 1995; Shetty and Turner, 1998]. In contrast, expression of TrkA or TrkC in the absence of neurotrophins triggers cell death in embryonic stem cells [Nikoletopoulou et al., 2010]. Thus, changes in NGF availability may crucially regulate the survival or naturally occurring death of neurons during development, particularly in the peripheral nervous system [Bibel and Barde, 2000]. TrkB is mostly expressed in central nervous system (CNS) neurons, does not trigger cell death, and its stimulation by BDNF can stimulate the survival or differentiation of neurons derived from NSCs [Ahmed et al., 1995; Bibel and Barde, 2000; Davies, 1994; Lindsay et al., 1985; Nikoletopoulou et al., 2010]. Neurotrophin signaling is also crucially involved in mediating activity-dependent refinement of neural circuits during development [Cabelli et al., 1995]. After neuronal differentiation and throughout adulthood, neurotrophins promote neurite outgrowth, axon formation, synapse formation and maturation, long-term potentiation, memory formation, neuronal survival and resistance to stress [Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003; Park and Poo, 2013].

## **Neurotrophin signaling in cancer**

Trk was originally identified as an oncogene in a colon cancer sample. Specifically, the altered gene consisted of an *NTRK1* gene fusion containing sequences from non-muscle tropomyosin (*TPM3*) [Pulciani et al., 1982]. The recurrence of this *TPM3-NTRK1* gene fusion as an oncogene in colon cancer has been more recently confirmed, along with evidence that it is associated with sensitivity to TrkA inhibition [Ardini et al., 2014]. *NTRK1* fusions are now known to occur in many other solid tumor types, including lung adenocarcinoma, papillary thyroid carcinoma, secretory breast carcinoma, and glioblastoma (GBM) [Amatu et al., 2016; Lange and Lo, 2018]. In addition, evidence indicating that NGF/TrkA, BDNF/TrkB, TrkC, or p75NTR play a role in cancer has rapidly accumulated over the past few years, with most studies showing that neurotrophins and their receptors are expressed in cancer cells and can influence experimental tumor growth, cellular

survival, proliferation, migration, invasion, neovascularization, metastasis, and treatment resistance in many peripheral solid tumor types including colorectal, breast, small cell and non-small cell lung, cervical, bladder, gallbladder, laryngeal, renal, head and neck, and oral squamous cell cancers [Adriaenssens et al., 2008; Chakravarthy et al., 2016; Chen et al., 2016; de Farias et al., 2010; 2012; de Moaraes et al., 2018; De la Cruz-Morcillo et al., 2016; Desmet and Peeper, 2006; Gao et al., 2018; Jiang et al., 2017; Jin et al., 2010; Kawamoto et al., 2017; Kim et al., 2017; Kimura et al., 2018; Lim et al., 2017; Mauri et al., 2018; Moriwaki et al., 2018; Nakagawara, 2001; Ozono et al., 2017; Radin and Patel, 2017; Roesler et al., 2011; Xu et al., 2017; Yuan et al., 2018; Zhang et al., 2016].

Neurotrophins and Trk receptors also play a role in brain tumor types other than MB. Expression of NGF and BDNF has been found in samples of human astrocytoma [Liu et al., 2018]. Human malignant glioma samples and cancer stem cells (CSCs) isolated from human gliomas express NGF, BDNF, NT3, TrkB and TrkC. Neurotrophin activation of TrkB and TrkC enhanced CSC viability through a mechanism dependent on the extracellular-regulated kinase (ERK) and Akt pathways. Conversely, knockdown or pharmacological inhibition of TrkB and TrkC decreased glioma CSC growth [Lawn et al., 2015]. TrkA and TrkB can be activated in GBM cells, and combined inhibition of Trk and c-Met reduces the resistance against CDK4/6 inhibition in experimental GBM [Olmez et al., 2018]. Selective TrkB inhibition effectively and dose-dependently impairs the viability of human GBM cells in vitro [Pinheiro et al., 2017]. A systematic screening of a library of human tyrosine kinases for their oncogenic potential in glioma and found compelling evidence indicating that TrkB plays a role in tumor formation [Ni et al., 2017]. Furthermore, TrkB-containing exosomes in GBM cells can promote the transference of tumor aggressiveness among cells [Pinet et al., 2016].

In pediatric solid tumors, the role of neurotrophin signaling has been mostly investigated in neuroblastoma (NB), a cancer type derived from embryonal neural crest cells that later give rise to the sympathetic nervous system and accounts for around 15% of pediatric cancer deaths [Maris et al., 2007]. NB tumors expressing high levels of TrkA show a favorable prognosis, whereas BDNF and TrkB expression is associated with worst outcomes [Nakagawara et al., 1993; 1994]. TrkB

stimulation by BDNF protects TrkB-expressing human NB cell lines against cytotoxic chemotherapeutics, and the protective effect of BDNF is prevented by inhibition of TrkB or PI3K [Jaboin et al., 2002; Scala et al., 1996]. TrkB inhibition prevents BDNF-induced protection of experimental NB against etoposide in vitro and in vivo [Li et al., 2015]. BDNF protects NB cells from paclitaxel by downregulating the proapoptotic protein Bim through a mechanism dependent on MAPK [Li et al., 2007]. BDNF has also been shown to stimulate, and NGF to inhibit, NB cell invasion [Matsumoto et al., 1995], and BDNF activation of TrkB promotes metastasis in experimental NB through the PI3K and MAPK pathways [Hua et al., 2016]. In contrast, TrkA activation by NGF decreases N-myc expression through MAPK signaling, resulting in a reduction in the number of NB cells [Woo et al., 2004], and promotes NB cell differentiation [Bongenmann et al., 1998]. NGF helps maintaining *MYCN*-amplified NB in an aggressive and undifferentiated state through a crosstalk with estrogen receptors [Dzieran et al., 2018]. p75NTR can induce apoptosis in NB cells and TrkA inhibits this effect [Bunone et al., 1997; Eggert et al., 2000], and p75NTR expression enhances the cytotoxic effect of the redox-active chemotherapeutic drug fenretinide in NB [Ganeshan et al., 2013]. When coexpressed with TrkA and TrkB, p75NTR enhances Trk receptor sensitivity to low levels of ligand [Ho et al., 2011].

In Ewing sarcoma (ES), another type of pediatric solid tumor with possible origin in embryonal neural crest cells [von Levetzow et al., 2011], treating human ES cells with TrkA or TrkB selective inhibitors reduced cell proliferation, and the effects were optimized when the two inhibitors were combined. Moreover, the pan-Trk inhibitor K252a induced changes in morphology, reduced levels of  $\beta$ -III tubulin, and decreased mRNA expression of NGF, BDNF, TrkA and TrkB in ES cells, in addition to potentiating the effects of cytotoxic chemotherapy even in chemoresistant ES cells [Heinen et al., 2016]. The possibility that Trk receptors are involved in carcinogenesis in tumors derived from embryonal neural crest cells is supported by evidence that constitutive activation of TrkB is sufficient to promote malignant transformation, accompanied by increased expression of *MYCN* and other cancer-associated genes and reduced expression of tumor suppressor genes, in neural crest cells. Importantly, neural crest cells with constitutively active TrkB

form rapidly growing and invasive tumors when injected into NOD SCID mice [DeWitt et al., 2014].

In brain tumor types that afflict children (other than MB), *NTRK* mutations have been reported in pediatric low-grade and diffuse high-grade gliomas [Lassaletta et al., 2016; Nobusawa et al., 2014; Vanan et al., 2017; Wu et al., 2014]. Activating fusions of *NTRK1*, *NTRK2*, or *NTRK3* occur in approximately 40% of pediatric high-grade gliomas and *NTRK2* fusions in about 3% of pediatric pilocytic astrocytomas [Jones et al., 2013; Venkatesh and Monje, 2017; Wu et al., 2014]. TrkA and p75NTR are expressed in ependymoma [Hagel et al., 2013]. NGF expression was reported to be increased, whereas BDNF expression was reduced, both in tumor samples and cerebrospinal fluid (CSF), in children with low-grade astrocytomas and ependymomas [Chiaretti et al., 2004]. Although that study did not find changes in plasma levels of neurotrophins, recent findings in children with acute leukemia suggests that BDNF should be further investigated as a potential biomarker in pediatric cancers [Portich et al., 2016].

## **Neurotrophins and their receptors in MB**

### **NGF and TrkA**

Early studies in the 1990s, aimed at investigating the protein expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in MB, were done at a time when MB was classified as type of primitive neuroectodermal tumor (PNET), thus MB samples were analyzed together with other PNETs. TrkA was found in 5 out of 20 and NGF in 6 out of 20 MB specimens, although NGF and TrkA were not expressed within the same tumors [Tajima et al., 1998]. Washiyama et al. [1996] found TrkA immunoreactivity in cells from 8 of 29 PNET samples, 27 of which were posterior fossa pediatric MBs. An immunohistochemical study focusing on neuronal differentiation in the nodules of nodular/desmoplastic MBs found that TrkA and NGF were expressed in 13 of 14 tumor samples, and were mostly localized within nodules, which is consistent with a role for Trks in apoptosis and neuronal differentiation in MB [Eberhart et al., 2001]. In a more recent study, TrkA was

identified in 14 of 21 cases of pediatric patients with newly diagnosed MB, and TrkA expression was correlated to the apoptotic index [Ohta et al., 2006].

NGF and TrkA were also identified in MB cell lines [Kokunai et al., 1994; 1996]. As mentioned above, although neurotrophin signaling is generally associated with cell survival, both TrkA and TrkC promote neuronal death in the developing nervous system [Nikoletopoulou et al., 2010]. Experimental studies using cultured cells have consistently supported the hypothesis that TrkA activation by NGF stimulates cell death and hinders growth in MB [Harel et al., 2010; Nakagawara, 2001], and TrkA expression in MB is associated with neuronal differentiation, low proliferation, and apoptosis [Katsetos et al., 2003]. Treating MED-H MB cells with NGF resulted in growth inhibition and increased differentiation [Kokunai et al., 1996]. D283-MED and DAOY MB cells engineered to overexpress TrkA undergo apoptosis when treated with NGF, an effect that is blocked by anti-NGF antibodies or the pan-Trk inhibitor K252a [Muragaki et al., 1997]. The TrkA-mediated apoptosis is blocked by mutations in the ATP binding site or tyrosines 490 and 785. In addition, expression of a dominant negative Ras inhibitor prevents NGF-induced ERK activation and apoptosis, whereas ERK inhibition alone do not affect apoptosis [Chou et al., 2000]. NGF-induced apoptosis is associated with a reduced expression of the DNA-damage-inducible gene *gadd45*, possibly through BRCA1 and independently of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) or p38 MAPK [Chou et al., 2001]. NGF was found to impair proliferation and increase TrkA expression, but also to reduce the cytotoxic effect of cisplatin in MB cells [Antonelli et al., 2007]. Ectopic expression of the transcription factor Zhangfei in ONS-76 MB cells resulted in increased expression of TrkA and apoptosis markers [Valderrama et al., 2009]. Zhangfei enhances expression of *Brn3a*, an inducer of TrkA expression, promoting autocrine NGF stimulation of TrkA that leads to MAPK-dependent neuronal differentiation and cell death in ONS-76 MB cells [Bodnarchuk et al., 2012]. In addition to promoting apoptosis and autophagy, NGF activation of TrkA can lead to cell death through casein kinase 1 (CK1)-mediated stimulation of macropinocytosis [Li et al., 2010], which involves inhibition of RhoB and FRS2-scaffolded Src and H-Ras activation of RhoA [Li et al., 2016]. Moreover, TrkA-induced cell death in MB cells depends on the cerebral cavernous malformation 2 (CCM2) protein and can

be blocked by inhibition of the germinal center kinase class III kinase and CCM2 interactor STK25, but not STK24 [Costa et al., 2012; Harel et al., 2009; 2010].

### **BDNF and TrkB**

An early immunohistochemical study detected the presence of BDNF and TrkB in 8 out of 20 MB samples, with coexpression of both molecules in 6 of the cases [Tajima et al., 1998]. Another study found BDNF- and TrkB-positive tumor cells in 6 out of 27 and 18 out of 29 samples, respectively [Washiyama et al., 1996]. MB cell lines express both BDNF and TrkB [Schmidt et al., 2010; Thomaz et al., 2016], and TrkB blockade by the selective inhibitor ANA-12 can induce a pronounced inhibition of survival and viability, as well as cell cycle arrest, in cells lines (D283 and UW-228) associated with different MB molecular subgroups [Thomaz et al., 2016]. In addition, we have recently shown that TrkB inhibition slows the growth of MB tumors xenografted into nude mice *in vivo*, increased apoptosis, reduced ERK activity, increased expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and resulted in differential modulation of p21 expression [Thomaz et al., 2019] (Figure 2). However, TrkB activation by BDNF may also reduce cell viability under certain experimental conditions, either when given to MB cells alone [Schmidt et al., 2010] or combined with a histone deacetylase inhibitor [Nör et al., 2011].

### **NT3, NT4/5, and TrkC**

As with NGF/TrkA and BDNF/TrkB, immunohistochemical studies have found the expression of NT-3 and TrkB in subsets of MB samples. TrkC was observed in 17 of 20 MB tumors analysed, and 3 of these tumors also coexpressed NT-3 [Tajima et al., 1988], whereas other studies found TrkC in 48%, NT-3 in 9%, and NT-4/5 in 19% of 29 [Washiyama et al., 1996], TrkC in 71% of 22 [Sinnappah-Kang et al., 2006], and TrkC in 52% of 21 [Ohta et al., 2006] MB cases. Importantly, higher TrkC expression has been associated with a favorable outcome in MB. Thus, among 12 MB samples, all of which expressed mRNA encoding NT-3 and TrkC, patients with

tumors expressing high levels of TrkC mRNA had significantly longer progression-free intervals and higher overall survival [Segal et al., 1994]. High TrkC mRNA expression was linked to a higher 5-year cumulative survival compared to patients with low expression (89% versus 46% respectively), with TrkC mRNA levels being the most powerful predictor of clinical outcome [Grotzer et al., 2000]. A more favorable outcome was also found among patients combining low MYC with high TrkC mRNA expression [Grotzer et al., 2001; Rutkowski et al., 2007]. High TrkC expression may be found particularly in MB tumors in the SHH subgroup [Friedrich et al., 2017]. Given that TrkC is expressed at higher levels in most mature cerebellar granule cells during CNS development, it has been proposed that MB tumors with a more favorable outcome may be derived from more differentiated cells [Pomeroy et al., 1997]. TrkC expression has been incorporated as a predictor of MB patient survival in models combining clinical and biological markers [Ray et al., 2004], as well as in proposed risk stratification systems for MB [Gajjar et al., 2004].

When treated with NT-3, MB cells undergo apoptosis, and TrkC overexpression inhibits the growth of MB xenografts in nude mice. In addition, TrkC levels in individual cells from MB biopsies is correlated with apoptosis [Kim et al., 1999], and TrkC mRNA levels was correlated to vincristine-induced apoptosis in DAOY and primary culture MB cells [Shinwari et al., 2011]. However, experimentally-induced TrkC overexpression in DAOY cells did not impact response to chemotherapy [Friedrich et al., 2017]. Tumors with reduced TrkC levels show decreased apoptosis in the Ptc<sup>+/-</sup> mouse model of MB [Kim et al., 2003]. NT-3-induced TrkC activation reduces MB cell invasion through a mechanism possibly involving heparanase inhibition [Sinnappah-Kang et al., 2005]. Proteomic experiments identified several proteins related to regulating gene expression, protein synthesis, apoptosis, proliferation, differentiation, migration, invasion, and cell metabolism as candidate effectors of NT-3 activation of TrkC in DAOY cells [Gruber-Olipitz et al., 2008; 2009]. A truncated isoform of TrkC (t-TrkC), which is overexpressed and displays proproliferative actions in MB, and has its expression regulated by microRNAs miR-9 and miR-125a, has been identified [Ferretti et al., 2009].

## **p75NTR**

In an immunohistochemical analysis of 167 MB samples, p75NTR was detected in 17% of classic MBs, in all of the desmoplastic (nodular) MBs, and 71% of those MBs with a significant desmoplastic component [Bühren et al., 2000]. Immunostaining for p75NTR was also positive in nine (12%) of 75 MB tumors, being four classic, two desmoplastic, and three anaplastic MBs [Barnes et al., 2009]. The ratio between TrkC and p75NTR expression correlates with meningeal spread in childhood MB samples [Sinnappah-Kang et al., 2006], and p75NTR may play a role in a functional axis with heparanase in regulating MB invasion [Marchetti et al., 2007]. MB cells overexpressing p75NTR show increased apoptosis [Küchler et al., 2011]. Blocking p75(NTR) proteolytic processing with a  $\gamma$ -secretase inhibitor impairs p75NTR-mediated migration, invasion, and spinal metastasis in experimental MB [Wang et al., 2010]. The presence of p75NTR in MB cell subpopulations may be related to a higher capacity for self-renewal [Morrison et al., 2013], although other findings have suggested that p75NTR expression identifies lower self-renewing progenitors or stem cells and expression of SHH pathway genes in MB [Liang et al., 2015]. In fact, it was recently demonstrated, through immunohistochemical analysis and transcriptome data across 763 primary tumors, that p75NTR may be a novel diagnostic and prognostic marker for SHH MB. The ERK/MAPK pathway was upregulated in p75NTR-positive tumors, and inhibiting MAPK signaling reduced stem/progenitor cell proliferation, survival, and migration [Liang et al., 2018]. A summary of neurotrophin signaling in MB is presented in Table 1.

### **Expression levels of neurotrophins and their receptors in MB subgroups and subtypes**

To investigate the clinical relevance of neurotrophins and their receptors in MB subgroups and subtypes, we analyzed the data sets derived from 763 subgrouped MB patient's samples cohort [Cavalli et al., 2017], 223 MB patient samples from Pfister cohort [Northcott et al. 2017] and 9 normal cerebellum samples [Roth et al. 2006]. We detected an increased expression of NGF and *NTRK1* in WNT tumors (figure 3 and 4), particularly in the WNT- $\alpha$  subtype common in young



age patients with monosomy of chromosome 6 and displaying good prognosis (figure 5). However, high levels of *NTRK1* were also observed in the SHH- $\beta$  subtype (figure 5), which characterizes the poorest prognosis of SHH group. The impact of *NTRK1* expression in the survival of patients from SHH subgroup was evaluated using the Kaplan-Meier method, dividing the patients with high and low expression of *NTRK1*. We found that high expression of *NTRK1* was related to decreased overall survival probability (figure 7).

*NGFR* and *NTRK3* expression were significant within SHH tumors (figure 3, 4 and 5). Similar results of *NGFR* expression were previously described by Morrison et al. 2013 and Liang et al. 2015 and 2018, showing higher expression of this marker in SHH subgroup [Morrison et al., 2013], especially in the subtype SHH- $\delta$ , more common in adult patients presenting *TERT* promoter mutations. The expression of *NGFR* has been proposed as a diagnostic and prognostic marker in MB-SHH [Liang et al., 2018]. High TrkC mRNA expression appears to be frequent in the SHH subgroup [Friedrich et al., 2017], and our analysis showed that *NTRK3* seems to be increased across all 4 subtypes of SHH tumors (Figure 4). Our overall survival evaluation based on *NTRK3* expression showed that high levels of this receptor are associated with improved survival (figure 6) across all MB subgroups, which agrees with the previously published literature.

Surprisingly, the expression of BDNF was lower in MB subgroups in comparison with normal cerebellum (figure 3). According to our analysis and the available literature [Lawn et al., 2015], the downregulation of BDNF appears to be a pattern not only in MB but among brain tumors in general, including glioblastomas, ependymomas and atypical teratoid rhabdoid tumors (supplementary figure S2). Regarding the distribution of these markers in MB subgroups, WNT tumors showed the lowest expression of BDNF (figure 3 and 4), and the highest expression of BDNF was observed in the SHH- $\gamma$  subtype (figure 5). The SHH- $\gamma$  subtype is more prevalent in infants and presents good outcome, additionally, genes involved with developmental pathways and receptor tyrosine kinase signaling, are enriched in SHH- $\gamma$  subtype [Cavalli et al., 2017]. The expression of BDNF across MB samples was investigated using the Kaplan-Meier method and we found that high expression of BDNF was related with decreased overall survival (figure 6). We detected

increased levels of *NTRK2* in the subgroup 4 (figure 4), and also the subtype Group 4- $\alpha$  exhibited increased expression of *NTRK2* when compared with the other subtypes (figure 4). Group 4 is the most prevalent subgroup comprising >40% of all MBs, and Group 4- $\alpha$  are enriched for *MYCN* and *CDK6* amplifications. Genes linked to cell migration and neuronal development are also enriched in this subtype. High levels of *NTRK2* were correlated with decreased survival of MB-SHH patients (figure 7). However, the clinical implication of the expression of BDNF and *NTRK2* still needs to be further investigated.

NT-3 expression was found increased in the group 4 when compared to the expression in normal cerebellum samples (figure 3), and this neurotrophin was also upregulated in all group 4 subtypes (figure 5). When we evaluated the survival probability of group 4 patients according to the expression levels of NT-3, we found that high expression of *NT-3* was related to increased overall survival probability in group 4 (figure 7), and similar survival results were observed in group 4 patients expressing high levels of *NTRK3* (figure 7). These results suggest that NT-3 could be potentially used as a survival marker across group 4 MB. Transcript levels of NT-4 were not found to be increased amongst MB subgroups (figure 3 and 4).

Taken together our results have identified that the expression of neurotrophins and their receptors in MB is clinically important, therefore these genes can be pointed out as potential biomarkers of molecular subgroups and subtypes of MB.

## Concluding remarks

Oncogenic gene fusions involving the *NTRK* family have been recently identified across several tumor types and emerged as therapeutic targets. For example, among brain tumors, glioblastoma, pilocytic astrocytoma and pontine glioma can show gene fusions involving *NTRK2* or *NTRK3* [Frattini et al., 2013; Jones et al., 2013; Kim et al., 2014; Wu et al., 2014]. Several small-molecule pan-Trk inhibitors are currently being evaluated in clinical trials [Vaishnavi et al., 2015]. A recent phase 1 and 2 clinical study examining the effects of the pan-Trk inhibitor larotrectinib in children and adults with various types of peripheral solid cancers harboring *NTRK* gene fusions found pronounced and durable responses regardless of patient age or tumor type [Drilon et al., 2018]. Recently, a case of a potent response to larotrectinib in a 3-year old female patient with a Trk fusion-driven pediatric high-grade glioma has been reported [Ziegler et al., 2018]. Although, to date, oncogenic genetic alterations in the *NTRK* family have not been reported in MB, there is now accumulating evidence suggesting that Trk expression can influence MB progression and should be further explored as a therapeutic target. The role of Trks in MB illustrates how childhood brain cancers can hijack molecular pathways involved in regulating neuronal survival, death, and differentiation during embryonic development. The differential roles of different subtypes of Trk receptors in MB, where stimulation of TrkA and TrkC can promote cell death whereas TrkB can likely display either pro- or antitumoral actions, makes it harder to predict what the clinical effects of pan-Trk inhibitors would be in MB patients. Further understanding of how neurotrophin signaling regulates MB tumor progression will offer insights into the disease pathology and development of potential targeted therapeutic approaches.

## **Funding**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 303276/2013-4 and 409287/2016-4 to RR and grant number 201001/2014-4 to CN); PRONON/Ministry of Health, Brazil (number 25000.162.034/2014-21); the Children's Cancer Institute (ICI); Rio Grande do Sul State Research Foundation (FAPERGS; grant number 17/2551-0001 071-0 to RR); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the William Donald Nash fellowship from the Brain Tumour Foundation of Canada (CN). VR is supported by operating funds from the Canadian Institutes for Health Research, the American Brain Tumor Association, and the Brain Tumour Foundation of Canada. MDT is supported by the National Institutes of Health, Pediatric Brain Tumour Foundation, Terry Fox Research Institute, Canadian Institutes of Health Research, The Cure Search Foundation, b.r.a.i.n.child, Meagan's Walk, Genome Canada, Genome BC, the Ontario Institute for Cancer Research, and the Canadian Cancer Society Research Institute.

## **Compliance with ethical standards**

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, Mougel A, Page A, Romon R et al (2008) Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68: 346-351. [https://doi.org/ 10.1158/0008-5472.CAN-07-1183](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1183)
- Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S (1995) BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci* 15: 5765-5778. [https://doi.org/ 10.1523/JNEUROSCI.15-08-05765.1995](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-08-05765.1995)
- Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S (2016) NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 1(2): e000023. <http://dx.doi.org/10.1136/esmoopen-2015-000023>
- Antonelli A, Lenzi L, Nakagawara A, Osaki T, Chiaretti A, Aloe L (2007) Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependyoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor. *Cancer Invest* 25: 94-101. <https://doi.org/10.1080/07357900701205689>
- Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, De Ponti C, Somaschini A, Cammarota R et al (2014) The TPM3-NTRK1 rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. *Mol Oncol* 8: 1495-1507. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.06.001>
- Arora A, Scholar EM (2005) Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 971-979. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084145>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9755-6>
- Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14: 2919-2937. <https://doi.org/10.1101/gad.841400>
- Bodnarchuk TW, Napper S, Rapin N, Misra V (2012) Mechanism for the induction of cell death in ONS-76 medulloblastoma cells by Zhangfei/CREB-ZF. *J Neurooncol* 109: 485-501. [https://doi.org/ 10.1007/s11060-012-0927-z](https://doi.org/10.1007/s11060-012-0927-z)
- Bogenmann E, Peterson S, Maekawa K, Matsushima H (1998) Regulation of NGF responsiveness in human neuroblastoma. *Oncogene* 17: 2367-2376. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202160>
- Bothwell M (2016) Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Res* 2016: 5. F1000 Faculty Rev-1885. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8434.1>
- Bühren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T (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: 229-240. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.3.229>

- Bunone G, Mariotti A, Compagni A, Morandi E, Della Valle G (1997) Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 14: 1463-1470. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200972>
- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ (1995) Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267: 1662-1666. <https://doi.org/10.1126/science.7886458>
- Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B et al (2017) Intertumoral heterogeneity within medulloblastoma subgroups. *Cancer Cell* 31: 737-754.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>
- Chakravarthy R, Mnich K, Gorman AM (2016) Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75(NTR) expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 478: 1541-1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.149>
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>
- Chen B, Liang Y, He Z, An Y, Zhao W, Wu J (2016) Autocrine activity of BDNF induced by the STAT3 signaling pathway causes prolonged TrkB activation and promotes human non-small-cell lung cancer proliferation. *Sci Rep* 6: 30404. <https://doi.org/10.1038/srep30404>
- Chiaretti A, Aloe L, Antonelli A, Ruggiero A, Piastra M, Riccardi R et al (2004) Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst* 20: 412-419. <https://doi.org/10.1007/s00381-004-0959-6>
- Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H et al (2011) Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol* 29: 1424-1430. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.5148>
- 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: 565-570. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.565>
- Chou TT, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) p38 mitogen-activated protein kinase-independent induction of gadd45 expression in nerve growth factor-induced apoptosis in medulloblastomas. *J Biol Chem* 276: 41120-41127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102832200>
- Costa B, Kean MJ, Ast V, Knight JD, Mett A, Levy Z et al (2012) Ceccarelli DF, Badillo BG, Eils R, König R, Gingras AC, Fainzilber M. STK25 protein mediates TrkA and CCM2 protein-dependent death in pediatric tumor cells of neural origin. *J Biol Chem* 287: 29285-29289. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.345397>
- Davies AM (1994) The role of neurotrophins in the developing nervous system. *J Neurobiol* 25: 1334-1348. <https://doi.org/10.1002/neu.480251103>

- de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R (2012) BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.091>
- de Farias CB, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F et al (2010) BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 79: 430-439. <https://doi.org/10.1159/000326564>
- de Moraes JK, Wagner VP, Fonseca FP, Vargas PA, de Farias CB, Roesler R et al (2018) Uncovering the role of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase receptor B signaling in head and neck malignancies. *J Oral Pathol Med* 47: 221-227. <https://doi.org/10.1111/jop.12611>
- De la Cruz-Morcillo MA, Berger J, Sánchez-Prieto R, Saada S, Naves T, Guillaudeau A et al (2016) p75 neurotrophin receptor and pro-BDNF promote cell survival and migration in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7: 34480-34497. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8911>
- Desmet CJ, Peeper DS (2006) The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63: 755-759. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5490-8>
- Dewitt J, Ochoa V, Urschitz J, Elston M, Moisyadi S, Nishi R (2014) Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene* 33: 977-985. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.39>
- Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD et al (2018) Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med* 378: 731-739. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1714448>
- Dzieran J, Rodriguez Garcia A, Westermark UK, Henley AB, Eyre Sánchez E, Träger C et al (2018) MYCN-amplified neuroblastoma maintains an aggressive and undifferentiated phenotype by deregulation of estrogen and NGF signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E1229-E1238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710901115>
- Eberhart CG, Kaufman WE, Tihan T, Burger PC (2001) Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 462-469. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.5.462>
- Eggert A, Sieverts H, Ikegaki N, Brodeur GM (2000) p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med Pediatr Oncol* 35: 573-576. [https://doi.org/10.1002/1096-911X\(20001201\)35:6<573::AID-MPO17>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1096-911X(20001201)35:6<573::AID-MPO17>3.0.CO;2-A)
- Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS et al (2009) MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 124: 568-577. <https://doi.org/10.1002/ijc.23948>



- Frattinic V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F et al (2013) The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet* 45: 1141-1149. <https://doi.org/10.1038/ng.2734>
- Friedrich, C., Shalaby, T., Oehler, C., Pruschy, M., Seifert, B., Picard, D., et al. (2017). Tropomyosin receptor kinase C (TrkC) expression in medulloblastoma: relation to the molecular subgroups and impact on treatment response. *Child's Nerv. Syst.* 33, 1463–1471. doi:10.1007/s00381-017-3506-y
- Gajjar A, Pfister SM, Taylor MD, Gilbertson RJ (2014) Molecular insights into pediatric brain tumors have the potential to transform therapy. *Clin Cancer Res* 20: 5630-5640. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0833>
- Gajjar A, Hernan R, Kocak M, Fuller C, Lee Y, McKinnon PJ et al (2004) Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol* 22: 984-993. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.06.032>
- Gajjar AJ, Robinson GW (2014) Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 714-722. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.181>
- Ganeshan V, Ashton J, Schor NF (2013) p75NTR: an enhancer of fenretinide toxicity in neuroblastoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 777-787. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2071-7>
- Gao L, Yan P, Guo FF, Liu HJ, Zhao ZF. MiR-1-3p inhibits cell proliferation and invasion by regulating BDNF-TrkB signaling pathway in bladder cancer. *Neoplasma*. 2018;65(1):89-96. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2018\\_161128N594](https://doi.org/10.4149/neo_2018_161128N594)
- Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C et al (2010) Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468: 1095-1099. <https://doi.org/10.1038/nature09587>
- Gilbertson RJ (2011) Mapping cancer origins. *Cell* 145: 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.019>
- Gómez S, Garrido-Garcia A, Garcia-Gerique L, Lemos I, Suñol M, de Torres C et al (2018) A novel method for rapid molecular subgrouping of medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 24: 1355-1363. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2243>
- Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277:1109-1113. <https://doi.org/10.1126/science.277.5329.1109>
- Grotzer MA, Hogarty MD, Janss AJ, Liu X, Zhao H, Eggert A et al (2001) MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 7: 2425-2433.

- Grotzer MA, Janss AJ, Fung K, Biegel JA, Sutton LN, Rorke LB et al (2000) TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 18:1027-1035. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.5.1027>
- Gruber-Olipitz M, Ströbel T, Chen WQ, Grotzer MA, Quehenberger F, Slavc I et al (2008) Synthesis, chaperoning, and metabolism of proteins are regulated by NT-3/TrkC signaling in the medulloblastoma cell line DAOY. *J Proteome Res* 7: 1932-1944. <https://doi.org/10.1021/pr700724a>
- Gruber-Olipitz M, Ströbel T, Kang SU, John JP, Grotzer MA, Slavc I et al (2009) Neurotrophin 3/TrkC-regulated proteins in the human medulloblastoma cell line DAOY. *Electrophoresis* 30: 540-549. <https://doi.org/10.1002/elps.200800325>
- Hagel C, Treszl A, Fehlert J, Harder J, von Haxthausen F, Kern M et al (2013) Supra- and infratentorial pediatric ependymomas differ significantly in NeuN, p75 and GFAP expression. *J Neurooncol* 112: 191-197. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1062-1>
- Harel L, Costa B, Fainzilber M (2010) On the death Trk. *Dev Neurobiol* 70: 298-303. <https://doi.org/10.1002/dneu.20769>
- Harel L, Costa B, Tcherpakov M, Zapatka M, Oberthuer A, Hansford LM et al (2009) CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase. *Neuron* 63: 585–591. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.020>
- Heinen TE, dos Santos RP, da Rocha A, dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA et al (2016) Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 7: 34860-34880. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8992>
- Ho R, Minturn JE, Simpson AM, Iyer R, Light JE, Evans AE et al (2011) The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. *Cancer Lett* 305: 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.02.029>
- Hua Z, Gu X, Dong Y, Tan F, Liu Z, Thiele CJ et al (2016) PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. *Tumour Biol* 37: 16227–16236. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5433-z>
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ (2002) Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res* 62: 6756-6763.
- Jiang L, Wang Z, Liu C, Gong Z, Yang Y, Kang H et al (2017) TrkB promotes laryngeal cancer metastasis via activation PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 8: 108726-108737. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21711>

- Jin W, Kim GM, Kim MS, Lim MH, Yun C, Jeong J et al (2010) TrkC plays an essential role in breast tumor growth and metastasis. *Carcinogenesis* 31: 1939-1947. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq180>
- Jones DT, Hutter B, Jäger N, Korshunov A, Kool M, Warnatz HJ et al (2013) Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 45: 927-932. <https://doi.org/10.1038/ng.2682>
- Katsetos CD, Del Valle L, Legido A, de Chadarévian JP, Perentes E, Mörk SJ (2003) On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak. *Acta Neuropathol* 105: 1-13. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0618-5>
- Kawamoto M, Onishi H, Ozono K, Yamasaki A, Imaizumi A, Kamakura S et al (2017) Tropomyosin-related kinase B mediated signaling contributes to the induction of malignant phenotype of gallbladder cancer. *Oncotarget* 8: 36211-36224. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16063>
- Kawauchi D, Ogg RJ, Liu L, Shih DJH, Finkelstein D, Murphy BL et al (2017) Novel MYC-driven medulloblastoma models from multiple embryonic cerebellar cells. *Oncogene* 36: 5231-5242. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.110>
- Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, Gibson P, Rehg J, Gao C et al (2012) A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer Cell* 21: 168-180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.023>
- Kim J, Lee Y, Cho HJ, Lee YE, An J, Cho GH et al (2014) NTRK1 fusion in glioblastoma multiforme. *PLoS One* 9: e91940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091940>
- Kim JY, Sutton ME, Lu DJ, Cho TA, Goumnerova LC, Goritchenko L et al (1999) Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. *Cancer Res* 59: 711-719.
- Kim MS, Suh KW, Hong S, Jin W (2017) TrkC promotes colorectal cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 8: 41319-41333. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17289>
- Kim JY, Nelson AL, Algon SA, Graves O, Sturla LM, Goumnerova LC et al (2003) Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice. *Dev Biol* 263: 50-66. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00434-2)
- Kimura S, Harada T, Ijichi K, Tanaka K, Liu R, Shibahara D et al (2018) Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 120: 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.005>
- Kokunai T, Sawa H, Tamaki N (1996) Functional analysis of trk proto-oncogene product in medulloblastoma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 36: 796-804. <https://doi.org/10.2176/nmc.36.796>

- Kokunai T, Sawa H, Tatsumi S, Tamaki N (1994) Expression of nerve growth factor receptor by human primitive neuroectodermal tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 34: 523-529. <https://doi.org/10.2176/nmc.34.523>
- Küchler J, Hartmann W, Waha A, Koch A, Endl E, Wurst P et al (2011) p75(NTR) induces apoptosis in medulloblastoma cells. *Int J Cancer* 128: 1804-1812. <https://doi.org/10.1002/ijc.25508>
- Lange AM, Lo HW (2018) Inhibiting TRK proteins in clinical cancer therapy. *Cancers (Basel)* 10(4). pii: E105. <https://doi.org/10.3390/cancers10040105>
- Lassaletta A, Zapotocky M, Bouffet E, Hawkins C, Tabori U (2016) An integrative molecular and genomic analysis of pediatric hemispheric low-grade gliomas: an update. *Childs Nerv Syst* 32: 1789-1797. <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3163-6>
- Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, Qu X, Fenstermacher DA, Fournier M et al Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem* 290: 3814-3824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599373>
- Li C, MacDonald JI, 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: 882-899. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06507.x>
- Li C, MacDonald JI, Talebian A, Leuenberger J, Seah C, Pasternak SH et al (2016) Unravelling the mechanism of TrkA-induced cell death by macropinocytosis in medulloblastoma Daoy cells. *Mol Cell Biol* 36: 2596-2611. <https://doi.org/10.1128/MCB.00255-16>
- Li P, Du F, Yuelling LW, Lin T, Muradimova RE, Tricarico R et al (2013) A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nat Neurosci* 16: 1737-1744. <https://doi.org/10.1038/nn.3553>
- Li Z, Zhang J, Liu Z, Woo CW, Thiele CJ (2007) Downregulation of Bim by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ* 14: 318-326. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401983>
- Li Z, Zhang Y, Tong Y, Tong J, Thiele CJ (2015) Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 16: 477-483. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1016659>
- Liang L, Aiken C, McClelland R, Morrison LC, Tatari N, Remke M et al (2015) Characterization of novel biomarkers in selecting for subtype specific medulloblastoma phenotypes. *Oncotarget* 6: 38881-38900. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6195>
- Liang L, Morrison LC, Tatari N, Stromecki M, Fresnoza A, Porter CJ et al (2018) CD271+ cells are diagnostic and prognostic and exhibit elevated MAPK

- activity in SHH medulloblastoma. *Cancer Res* 78: 4745-4759. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0027>
- Lim WC, Kim H, Kim YJ, Park SH, Song JH, Lee KH et al ((2017) Delphinidin inhibits BDNF-induced migration and invasion in SKOV3 ovarian cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 5337-5343. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.09.024>
- Lin CY, Erkek S, Tong Y, Yin L, Federation AJ, Zapatka M et al (2016) Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature* 530: 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature16546>
- Liu TT, Wang H, Wang FJ, Xi YF, Chen LH (2018) Expression of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in astrocytomas. *Oncol Lett* 15: 533-537. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7333>
- Marchetti D, Mrak RE, Paulsen DD, Sinnappah-Kang ND (2007) Neurotrophin receptors and heparanase: a functional axis in human medulloblastoma invasion. *J Exp Clin Cancer Res* 26: 5-23.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007). Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106-2120. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60983-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60983-0)
- Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG (2014) The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* 14: 277-289. <https://doi.org/10.1038/nrc3679>.
- Massimino M, Biassoni V, Gandola L, Garrè ML, Gatta G, Giangaspero F et al (2016) Childhood medulloblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 105: 35-51. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.05.012>
- Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 55: 1798-1806.
- Mauri G, Valtorta E, Cerea G, Amatu A, Schirru M, Marrapese G et al (2018) TRKA expression and NTRK1 gene copy number across solid tumours. *J Clin Pathol* 71: 926-931. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2018-205124>
- Moriwaki K, Ayani Y, Kuwabara H, Terada T, Kawata R, Asahi M (2018) TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 9: 25225-25243. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25396>
- Morrison LC, McClelland R, Aiken C, Bridges M, Liang L, Wang X et al (2013) Deconstruction of medulloblastoma cellular heterogeneity reveals differences between the most highly invasive and self-renewing phenotypes. *Neoplasia* 15: 384-398.
- Morrissy AS, Cavalli FMG, Remke M, Ramaswamy V, Shih DJH, Holgado BL et al (2017) Spatial heterogeneity in medulloblastoma. *Nat Genet* 49: 780-788. <https://doi.org/10.1038/ng.3838>

- Morrissy AS, Garzia L, Shih DJ, Zuyderduyn S, Huang X, Skowron P et al (2016) Divergent clonal selection dominates medulloblastoma at recurrence. *Nature* 529: 351-357. <https://doi.org/10.1038/nature16478>
- Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci* 17: 530-542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-02-00530.1997>
- Nakagawara A (2001) Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169: 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00530-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00530-4)
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM (1994) Clinical significance of expression of neurotrophic factors and their receptors in neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res* 385: 155-161.
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM (1993) Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328: 847-854. <https://doi.org/10.1056/NEJM199303253281205>
- Ni J, Xie S, Ramkissoon SH, Luu V, Sun Y, Bandopadhyay P et al (2017) Tyrosine receptor kinase B is a drug target in astrocytomas. *Neuro Oncol* 19: 22-30. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now139>
- Nikoletopoulou V, Lickert H, Frade JM, Rencurel C, Giallonardo P, Zhang L et al (2010) Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467: 59-63. <https://doi.org/10.1038/nature09336>
- Nobusawa S, Hirato J, Yokoo H (2014) Molecular genetics of ependymomas and pediatric diffuse gliomas: a short review. *Brain Tumor Pathol* 31: 229-233. <https://doi.org/10.1007/s10014-014-0200-6>
- Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R (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. <https://doi.org/10.1007/s00381-011-1439-4>
- Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T et al (2017) The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 547: 311-317. <https://doi.org/10.1038/nature22973>
- Northcott PA, Dubuc AM, Pfister S, Taylor MD (2012a) Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 12: 871-884. <https://doi.org/10.1586/ern.12.66>
- Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ et al (2012b) Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12: 818-834. <https://doi.org/10.1038/nrc3410>

- Northcott PA, Korshunov A, Pfister SM, Taylor MD (2012c) The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8: 340-351. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.78>
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S et al (2011) Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 29: <https://doi.org/1408-1414>. 10.1200/JCO.2009.27.4324
- Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC et al (2019) Medulloblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 5: 11. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0063-6>
- Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T et al (2012d) Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 488: 49-56. <https://doi.org/10.1038/nature11327>
- Ohta T, Watanabe T, Katayama Y, Kurihara J, Yoshino A, Nishimoto H et al (2006) TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology* 26: 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2006.00678.x>
- Olmez I, Zhang Y, Manigat L, Benamar M, Brenneman B, Nakano I et al (2018) Combined c-Met/Trk inhibition overcomes resistance to CDK4/6 inhibitors in glioblastoma. *Cancer Res* 78: 4360-4369. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3124>
- Ozono K, Ohishi Y, Onishi H, Nakamura K, Motoshita J, Kato M et al (2017) Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B signaling pathway contributes to the aggressive behavior of lung squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 97: 1332-1342. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.45>
- Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14: 7-23. <https://doi.org/10.1038/nrn3379>
- Pinet S, Bessette B, Vedrenne N, Lacroix A, Richard L, Jauberteau MO et al (2016) TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget* 7: 50349-50364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10387>
- Pinheiro KV, Alves C, Buendia M, Gil MS, Thomaz A, Schwartzmann G et al (2017) Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. *Neuro Oncol* 19: 138-139. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now199>
- Pomeroy SL, Sutton ME, Goumnerova LC, Segal RA (1997) Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. *J Neurooncol* 35: 347-352. <https://doi.org/10.1023/A:1005841206252>
- Portich JP, Gil MS, dos Santos RP, Goulart BK, Ferreira MB, Loss JF et al (2016) Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia. *Cancer Biomark* 17: 347-352. <https://doi.org/10.3233/CBM-160646>

- Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D et al (2012) Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature* 488: 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature11329>
- Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M (1982) Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 300: 539–542. <https://doi.org/10.1038/300539a0>
- Radin DP, Patel P (2017) BDNF: an oncogene or tumor suppressor? *Anticancer Res* 37: 3983-3990.
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F et al (2016) Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 131: 821-831. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1569-6>
- Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Faria CC, Perreault S, Cho YJ et al (2013) Recurrence patterns across medulloblastoma subgroups: an integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 14: 1200-1207. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70449-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70449-2)
- Ramaswamy V, Taylor MD (2017) Medulloblastoma: from myth to molecular. *J Clin Oncol* 35: 2355-2363. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7842>
- Ray A, Ho M, Ma J, Parkes RK, Mainprize TG, Ueda S et al (2004) A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 10: 7613-7620. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0499>
- Remke M, Ramaswamy V, Taylor MD (2013) Medulloblastoma molecular dissection: the way toward targeted therapy. *Curr Opin Oncol* 25: 674-681. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000008>
- Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G (2011) BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 11: 1473-1475. <https://doi.org/10.1586/era.11.150>
- Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A (2008) Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* 14: 971-976. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2072>
- Rutkowski S, von Bueren A, von Hoff K, Hartmann W, Shalaby T, Deinlein F et al (2007) Prognostic relevance of clinical and biological risk factors in childhood medulloblastoma: results of patients treated in the prospective multicenter trial HIT'91. *Clin Cancer Res* 13: 2651-2657. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1779>
- Scala S, Wosikowski K, Giannakakou P, Valle P, Biedler JL, Spengler BA et al (1996) Lucarelli E, Bates SE, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer Res* 56: 3737-3742.
- Schecterson LC, Bothwell M (2010) Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Dev Neurobiol* 70: 332-338. <https://doi.org/10.1002/dneu.20767>



- Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, Kapczynski F, Schwartzmann G, Brunetto AL et al (2010) BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 40: 303-310. <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9221-8>
- Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG et al (2008) Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14: 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.005>
- Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D et al (2017) Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol* 18: 958-971. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30243-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30243-7)
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL (1994) Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12867-12871. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12867>
- Sharma T, Schwalbe EC, Williamson D, Sill M, Hovestadt V, Mynarek M et al (2019) Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathol* <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02020-0>
- Shawver LK, Slamon D, Ullrich A (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1: 117-123. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00039-9)
- Shetty AK, Turner DA (1998) In vitro survival and differentiation of neurons derived from epidermal growth factor-responsive postnatal hippocampal stem cells: inducing effects of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurobiol* 35: 395-425. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19980615\)35:4<395::AID-NEU7>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19980615)35:4<395::AID-NEU7>3.0.CO;2-U)
- Shinwari Z, Al-Hindi H, Al-Shail E, Khafaga Y, Al-Kofide A, El-Kum N et al (2011) Response of medulloblastoma cells to vincristine and lomustine: role of TRKC, CTNNB1 and STK15. *Anticancer Res* 31: 1721-1733.
- Sinnappah-Kang ND, Kaiser AJ, Blust BE, Mrak RE, Marchetti D. Heparanase (2005) TrkC and p75NTR: their functional involvement in human medulloblastoma cell invasion. *Int J Oncol* 27: 617-626. <https://doi.org/10.3892/ijo.27.3.617>
- Sinnappah-Kang ND, Mrak RE, Paulsen DB, Marchetti D (2006) Heparanase expression and TrkC/p75NTR ratios in human medulloblastoma. *Clin Exp Metastasis* 23: 55-63. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9017-y>
- Tajima Y, Molina RP Jr, Rorke LB, Kaplan DR, Radeke M, Feinstein SC et al (1998) Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors. *Acta Neuropathol* 95: 325-332. <https://doi.org/10.1007/s004010050806>

- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC et al (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123: 465-472. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0922-z>
- 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: 5962-5967. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0651>
- Thomaz A, Jaeger M, Buendia M, Bambini-Junior V, Gregianin LJ, Brunetto AL et al BDNF/TrkB signaling as a potential novel target in pediatric brain tumors: anticancer activity of selective TrkB inhibition in medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 59: 326-333. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0689-0>
- Thomaz, A., Pinheiro, K. de V., Souza, B. K., Gregianin, L., Brunetto, A. L., Brunetto, A. T., et al. (2019). Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma. *Front. Pharmacol.* 10, 698. doi:10.3389/FPHAR.2019.00698.
- Thompson EM, Hielscher T, Bouffet E, Remke M, Luu B, Gururangan S et al (2016) Prognostic value of medulloblastoma extent of resection after accounting for molecular subgroup: a retrospective integrated clinical and molecular analysis. *Lancet Oncol* 17: 484-495. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00581-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00581-1)
- Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC (2015) TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 5: 25-34. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0765>
- Vanan MI, Underhill DA, Eisenstat DD (2017) Targeting epigenetic pathways in the treatment of pediatric diffuse (high grade) gliomas. *Neurotherapeutics* 14: 274-283. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0514-2>
- Valderrama X, Rapin N, Verge VM, 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. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9682-6>
- Venkatesh H, Monje M (2017) Neuronal activity in ontogeny and oncology. *Trends Cancer* 3: 89-112. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.12.008>
- Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, Farooq H, Holgado BL, Sundaravadanam Y et al (2019) Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1158-7>
- von Bueren AO, Kortmann RD, von Hoff K, Friedrich C, Mynarek M, Müller K et al (2016) Treatment of children and adolescents with metastatic medulloblastoma and prognostic relevance of clinical and biologic parameters. *J Clin Oncol* 34: 4151-4160. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.2428>
- von Levetzow C, Jiang X, Gwee Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A et al (2011) Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One* 6: 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019305>

- Wang X, Cui M, Wang L, Chen X, Xin P (2010) Inhibition of neurotrophin receptor p75 intramembran proteolysis by gamma-secretase inhibitor reduces medulloblastoma spinal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 264-269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.012>
- Washiyama K, Muragaki Y, Rorke LB, Lee VM, Feinstein SC, Radeke MJ 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: 929-940.
- Woo CW, Lucarelli E, Thiele CJ (2004) NGF activation of TrkA decreases N-myc expression via MAPK path leading to a decrease in neuroblastoma cell number. *Oncogene* 23: 1522-1530. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207267>
- Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y et al (2014) The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 46: 444-450. <https://doi.org/10.1038/ng.2938>
- Xu Y, Xu L, Zheng J, Geng L, Zhao S (2017) MiR-101 inhibits ovarian carcinogenesis by repressing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Open Bio* 7: 1258-1266. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12257>
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M et al (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14: 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.07.003>
- Yuan Y, Ye HQ, Ren QC (2018) Upregulation of the BDNF/TrkB pathway promotes epithelial-mesenchymal transition, as well as the migration and invasion of cervical cancer. *Int J Oncol* 52: 461-472. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4230>
- Zapotocky M, Mata-Mbemba D, Sumerauer D, Liby P, Lassaletta A, Zamecnik J et al (2018) Differential patterns of metastatic dissemination across medulloblastoma subgroups. *J Neurosurg Pediatr* 21: 145-152. <https://doi.org/10.3171/2017.8.PEDS17264>
- Zhang P, Xing Z, Li X, Song Y, Zhao J, Xiao Y et al (2016) Tyrosine receptor kinase B silencing inhibits anoikis-resistance and improves anticancer efficiency of sorafenib in human renal cancer cells. *Int J Oncol* 48: 1417-1425. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3356>
- Ziegler DS, Wong M, Mayoh C, Kumar A, Tsoli M, Mould E et al (2018) Brief Report: Potent clinical and radiological response to larotrectinib in TRK fusion-driven high-grade glioma. *Br J Cancer* 119: 693-696. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0251-2>

**Table 1.** Summary of the roles of neurotrophin signaling in MB according to the current literature.

Receptor	TrkA	TrkB		TrkC	truncated TrkC	p75NTR	
<b>Type of alteration</b>	Expression and activation by NGF <sup>1</sup>	Expression and activation by BDNF <sup>6</sup>	Inhibition <sup>9,10</sup>	Overexpression and NT-3 activation <sup>11</sup>	Overexpression <sup>16</sup>	Expression <sup>17</sup>	Inhibition <sup>19</sup>
<b>Main functional effect</b>	<p>↑Cell death (apoptosis<sup>2</sup> or macropinocytosis<sup>3</sup>)</p> <p>↓Proliferation</p> <p>↑Differentiation<sup>4</sup></p>	<p>↓Cell viability<sup>7</sup></p> <p>BDNF+ HDACi</p> <p>↓ Cell viability<sup>8</sup></p>	<p>↓Cell viability, proliferation and survival<sup>9</sup></p> <p>↑Apoptosis and differentiation</p> <p>↓Subcutaneous tumor growth in nude mice<sup>10</sup></p>	<p>↑Apoptosis and differentiation<sup>12</sup></p>	<p>↑Proliferation Targeted by miR-9 and miR-125a to inhibit cell proliferation<sup>16</sup></p>	<p>Marker for SHH progenitor/stem cells<sup>17</sup></p>	<p>↓Migration, proliferation and spinal metastasis<sup>19</sup></p>
<b>Clinical evidence</b>	Apoptotic index and neuronal differentiation <sup>5</sup>	Unknown	Unknown	Higher overall survival <sup>13</sup> favorable outcome <sup>14</sup> high expression in SHH group <sup>15</sup>	Unknown	Potential diagnostic and prognostic marker for SHH group <sup>18</sup>	Unknown

**References:** <sup>1</sup>Mugaraki et al. 1997, <sup>2</sup>Chou et al., 2000, <sup>3</sup>Li et al. 2016, <sup>4</sup>Eberhart et al. 2001, <sup>5</sup>Ohta et al. 2006, <sup>6</sup>Washiyama et al. 1996, <sup>7</sup>Schmidt et al. 2010, <sup>8</sup>Nör et al. 2013, <sup>9</sup>Thomaz et al. 2016, <sup>10</sup>Thomaz et al 2019, <sup>11</sup>Segal et al. 1994, <sup>12</sup>Kim et al. 1999, <sup>13</sup>Grotzer et al. 2000, <sup>14</sup>Rutkowski et al. 2007, <sup>15</sup>Friedrich et al. 2017, <sup>16</sup>Ferretti et al. 2009, <sup>17</sup>Morrison et al. 2013, <sup>18</sup>Liang et al, 2015, 2017, <sup>19</sup>Wang et al. 2010.

## Legends for figures

### **Figure 1. Signaling mechanisms associated with neurotrophins.**

Neurotrophin/Trk signaling involves neurotrophin binding to Trks, leading to receptor dimerization, autophosphorylation of tyrosine residues, and the recruitment of cytosolic adaptor proteins such as Src homology collagen protein (Shc). Shc recruits the adaptor growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) which is linked to the Ras exchange factor son of sevenless (SOS) leading to the activation of a RAS-MAPK pathway (RAS-RAF-MEK-ERK). Activated ERK translocates to the nucleus and transactivates transcription factors such as STAT1/3, Elk1, and Myc, modulating gene expression to induce proliferation, differentiation or development. Shc can also recruit GRB2-associated-binding protein 1 (Gab1), driving activation of the PI3K-PDK1-Akt cascade. Phosphorylated Akt can regulate cell survival, growth and angiogenesis via activation or inactivation of downstream targets. Akt can play an anti-apoptotic role through inactivation of Forkhead box protein O1 (FOXO1) transcription factor, Bcl-2-associated death promoter (BAD) and glycogen synthesis kinase (GSK-3 $\beta$ ). Akt activates several proteins important for cell survival such as mammalian target of rapamycin (mTOR), murine double minute 2 (MDM2) and NF- $\kappa$   $\beta$ . Phosphorylation of PLC $\gamma$  by Trk receptors enables catalysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP 2) cleavage to diacylglycerol (DAG) and inositol triphosphate (IP 3), which releases calcium from intracellular stores, activating calmodulin (CaM) and Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinases (CaMKs). Together, these signaling molecules activate several intracellular enzymes which regulate the activity of transcription factors, such as cAMP response element-

binding protein (CREB) and ion channels involved in the control of synaptic plasticity. Trk transactivation may be mediated by GPCRs. GPCR-activated members of c-Src family induce a neurotrophin-independent transactivation of a Trk via trans-phosphorylation of cytosolic tyrosines, which provide docking sites for triggering intracellular signaling cascades like PI3K-PDK1-Akt and MAPK. Binding of neurotrophins to p75NTR can activate either the NF- $\kappa$ B signaling pathway producing prosurvival signals, or c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling to induce cell death. P75NTR can activate the kinase NIK, which in turn stimulates IKK complexes that phosphorylate I $\kappa$ B, leading to its ubiquitination and proteasomal processing and subsequent releasing of NF- $\kappa$ B. This creates transcriptionally competent NF- $\kappa$ B complexes that translocate to the nucleus and induce the expression of survival genes. Neurotrophin binding to p75NTR can also induce activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) which in turn activates JNK. JNK itself, or via c-JUN phosphorylation, stimulates p53-mediated apoptosis by regulating its targets such as Bcl-2-associated X protein (BAX). Pro-neurotrophins can also bind to p75NTR to initiate cell apoptosis via the JNK signaling pathway.

**Figure 2. TrkB inhibition decreases proliferation and survival pathways leading to reduction of tumor growth and increased apoptosis and differentiation features in MB cells.** Scheme depicting mouse xenografted with MB cells. Under the absence of TrkB antagonist, MB cells continue to grow at high proliferation rates. Treating mice with TrkB antagonist, ANA-12, promotes delay in tumor growth *in vivo* and cellular changes consistent with growth arrest, apoptosis

and differentiation mediated by downregulation of ERK pathway, decreased KI67 and Nestin expression markers and increased expression of p21 and TUBB3 genes.

**Figure 3. Transcript levels of neurotrophin receptors in the 4 MB molecular variants compared to the expression in normal cerebellum.** Expression levels were examined in previously described transcriptome data sets comprising 232 samples from Pfister ( $n= 223$  MB samples) and Roth ( $n= 9$  normal cerebellum samples). Expression of the (A) NTRK1, (B) NTRK2, (C) NTRK3, (D) NGFR, (E) NGF, (F) BDNF, (G) NT-3 and (H) NT-4 markers across all samples was presented in boxplot format as log<sub>2</sub>-transformed signal intensity. All subgroups were compared using a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post hoc test,  $***P \leq 0.01$  for significance. Data are shown as median and whiskers: min to max;  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  compared to normal cerebellum.

**Figure 4. Transcript levels of neurotrophin and their receptors in the 4 MB molecular variants.** Expression levels were examined in previously described transcriptome data set comprising patient samples from Cavalli et al. 2017,  $N=763$  samples. Expression of the (A) NTRK1, (B) NTRK2, (C) NTRK3, (D) NGFR, (E) NGF, (F) BDNF, (G) NT-3 and (H) NT-4 markers across all samples was presented in boxplot format as log<sub>2</sub>-transformed signal intensity. All subgroups were compared using a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post hoc test,  $***P \leq 0.001$  for significance. Data are shown as median and whiskers: min to max; comparisons were made between subgroups.

**Figure 5. Transcript levels of neurotrophins and their receptors across the 12 MB molecular subtypes.** Gene expression data from Cavalli et al. 2017 transcriptome data set representing 763 showing expression levels of (A) NTRK1, (B) NTRK2, (C) NTRK3, (D) NGFR, (E) NGF, (F) BDNF, (G) NT-3 and (H) NT-4. Data was presented in boxplot format as log<sub>2</sub>-transformed signal intensity. All subtypes were compared using a Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post hoc test,  $***P \leq 0.001$  for significance. Data are shown as median and whiskers: min to max; comparisons were made between subgroups. All statistic differences

between subtypes can be consulted in the supplementary material. Note that the NGFR dataset was previously published by Liang et al. 2018.

**Figure 6. Overall survival Kaplan-Meier curve from MB patients according to the expression level neurotrophins and their receptors.** Kaplan–Meier plot of MB overall survival stratified by the median of (A) NTRK1, (B) NTRK2, (C) NTRK3, (D) NGF (E) BDNF and (F) NT-3 expression in the Cavalli cohort and grouped by low and high expression levels. The statistical significance was determined using a log-rank test. n=306 subjects per group, ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 7. Overall survival Kaplan-Meier curve from MB patients according to the expression level of NTRK1, NTRK2, NTRK3 and NT-3 in relevant MB subgroups.** Kaplan-Meier curve of overall survival stratified by the median of (A) NTRK1 and (B) NTRK2 in the set of 172 samples derived from patients with MB-SHH and (C) NTRK3 and (D) NT-3 in the set of 326 samples derived from patients with MB Group 4 from the Cavalli cohort. Patients were grouped by low and high expression of the markers. The statistical significance was determined using a log-rank test ( $p \leq 0.05$ ).



Figure 1.

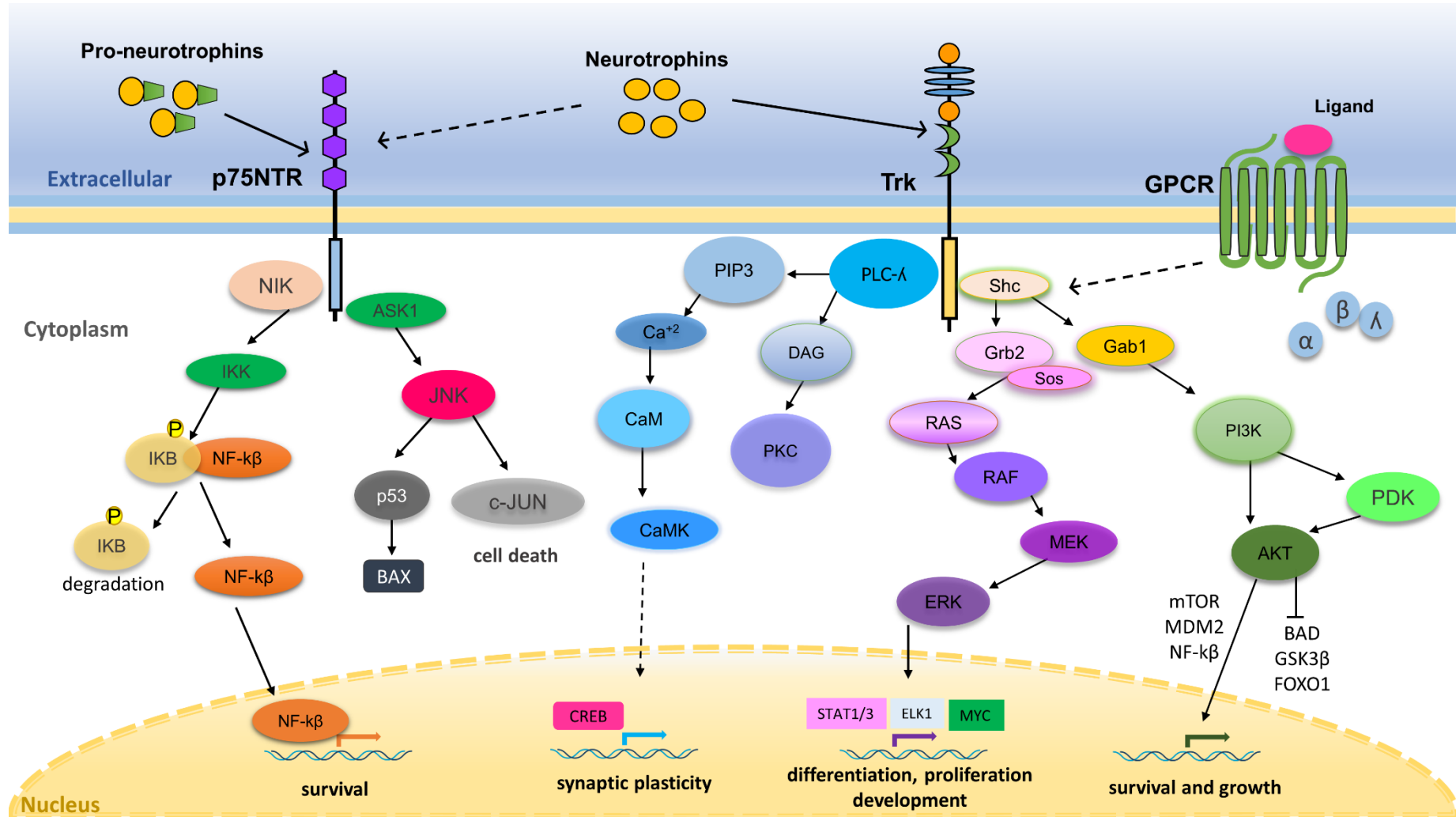


Figure 2.

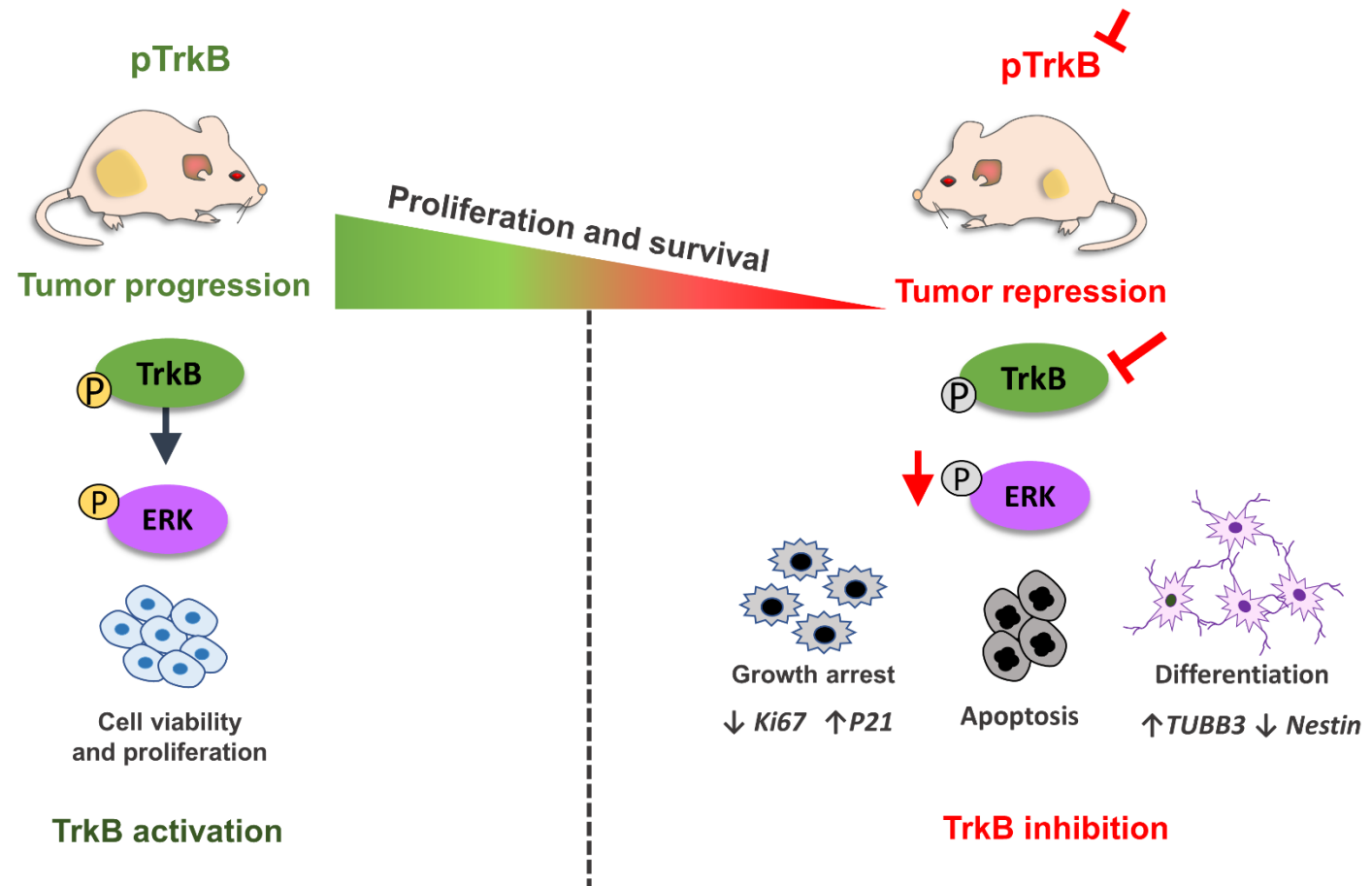


Figure 3.

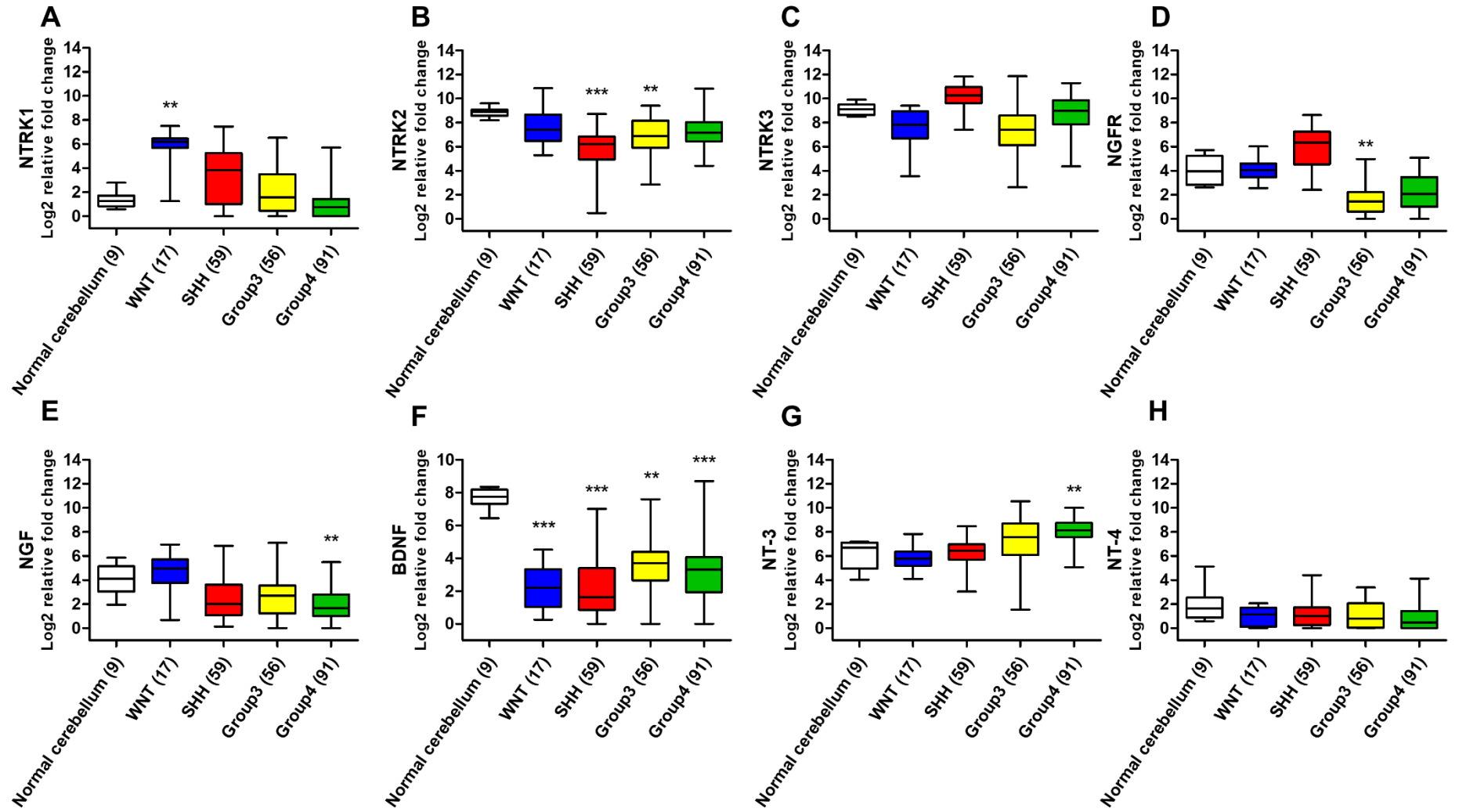


Figure 4.

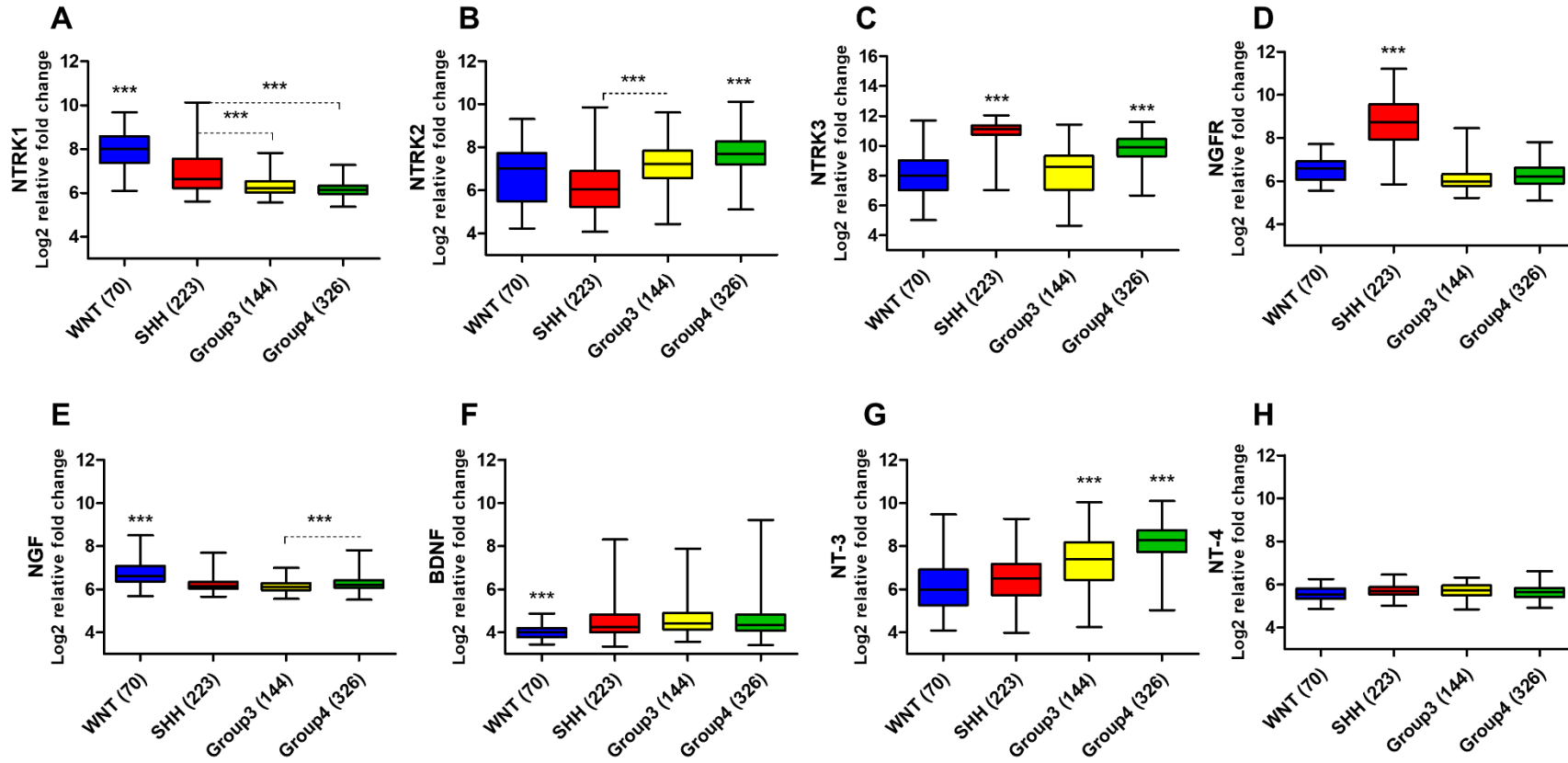


Figure 5.

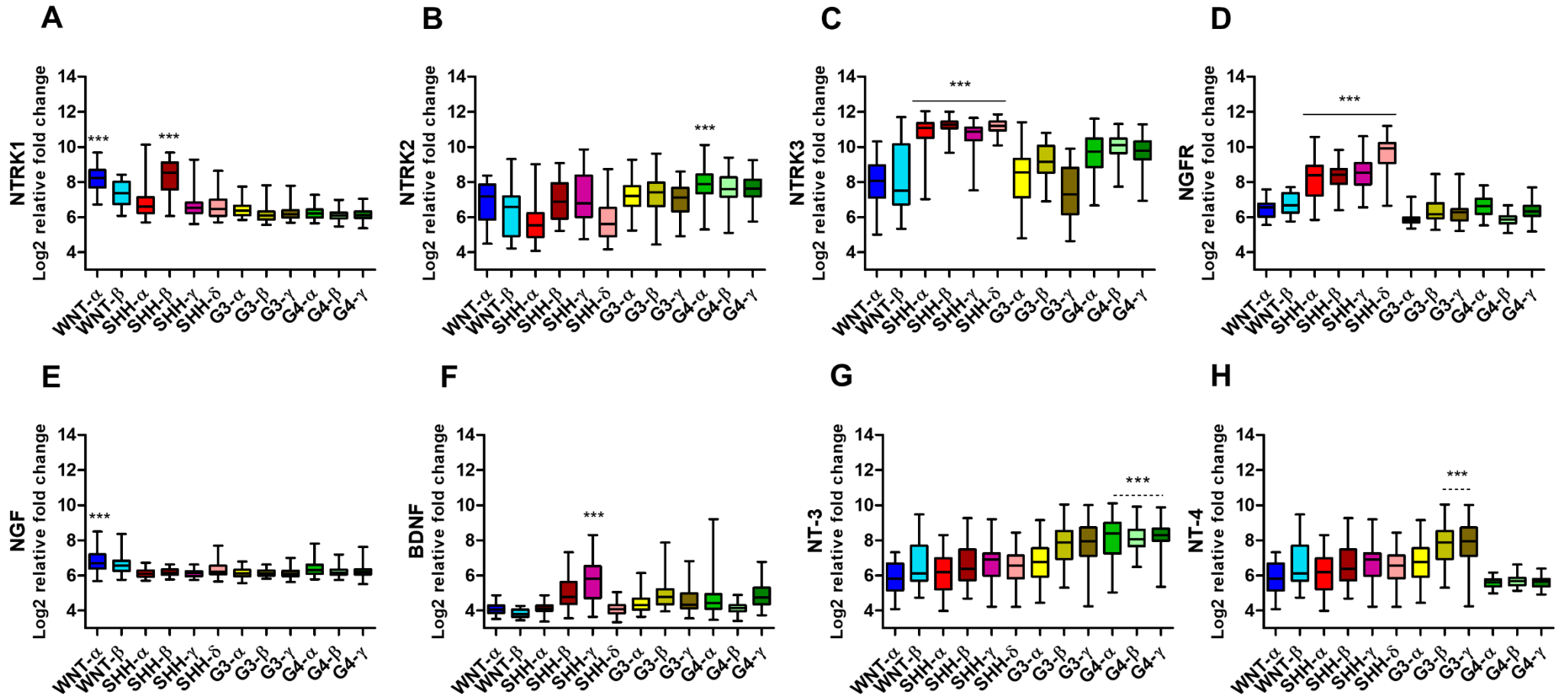


Figure 6.

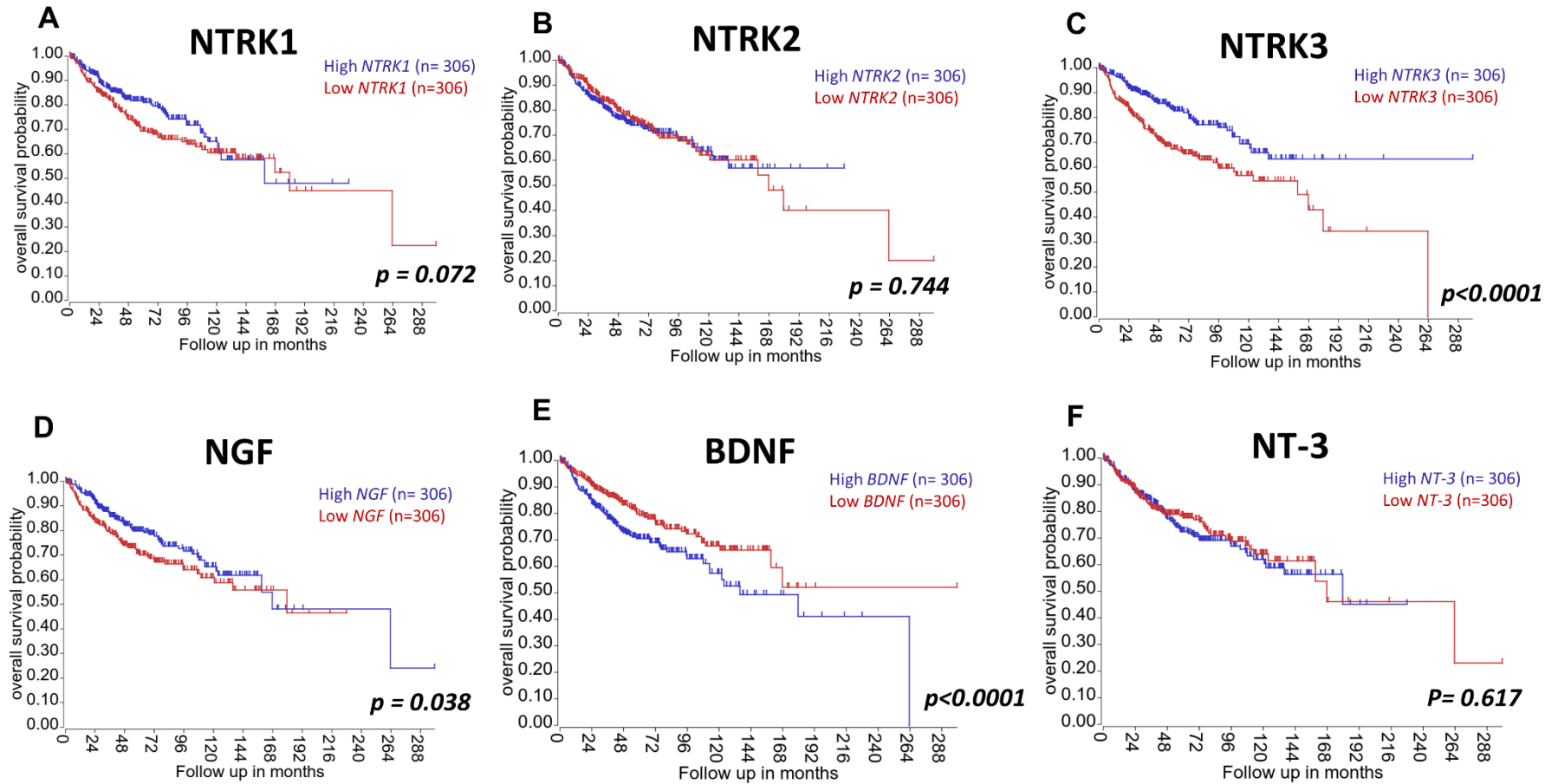
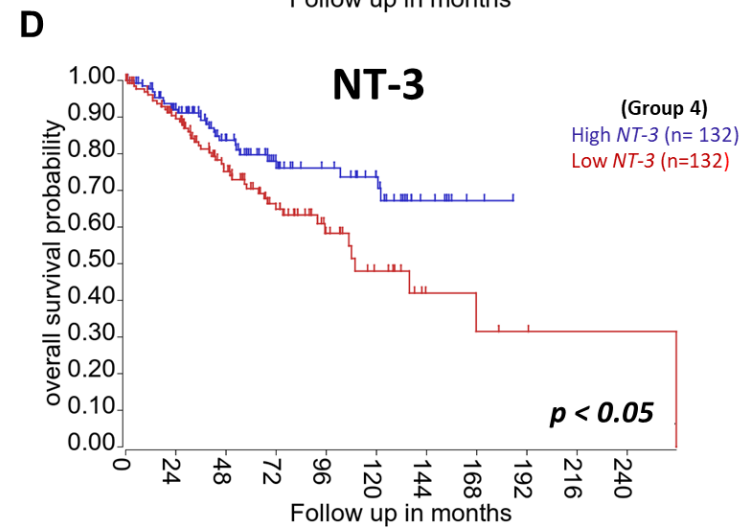
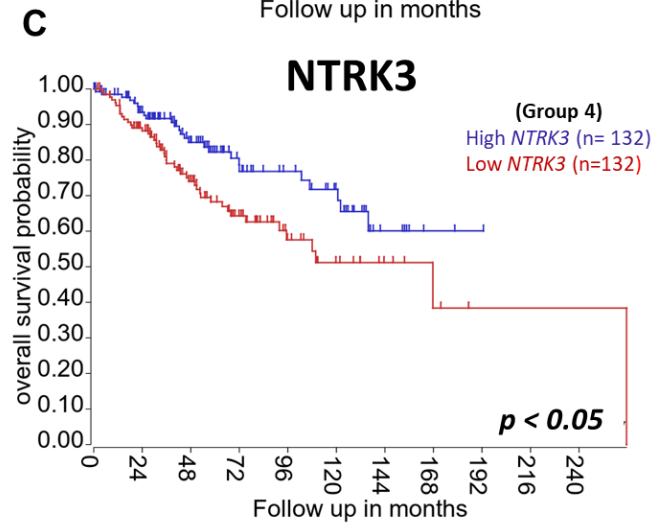
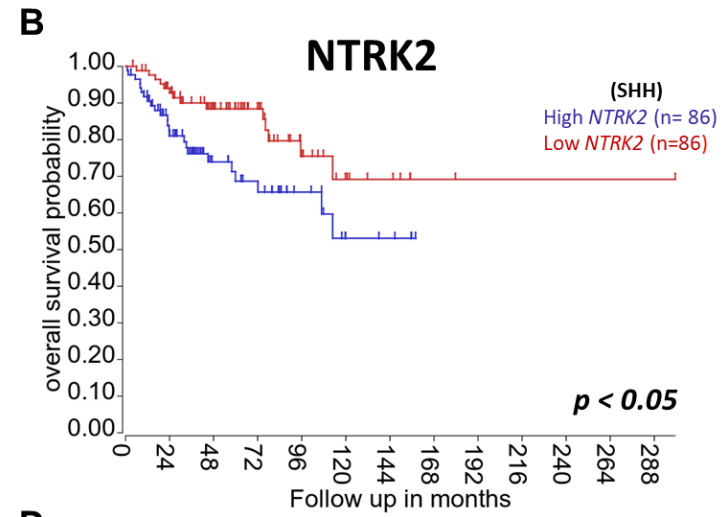
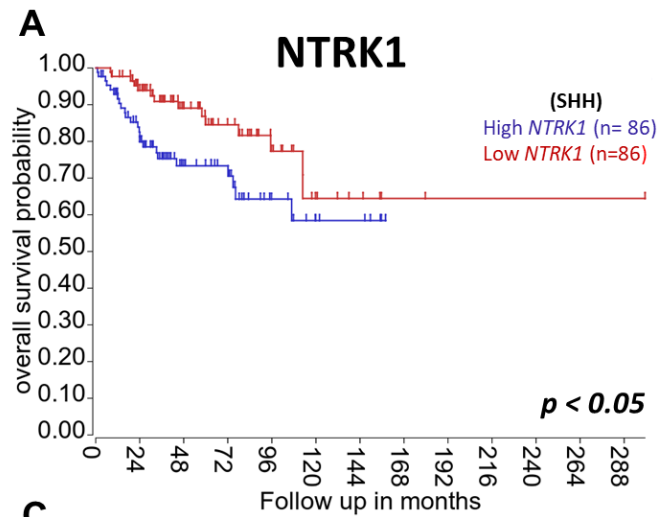


Figure 7.



**REVIEW**

**Neurotrophin signaling in medulloblastoma**

**Amanda Thomaz**<sup>1,2</sup> • **Mariane Jaeger**<sup>1,3</sup> • **Algemir L. Brunetto**<sup>1,3</sup> • **André T. Brunetto**<sup>1,3</sup> • **Lauro Gregianin**<sup>1,4,5</sup> • **Caroline Brunetto de Farias**<sup>1,3</sup> • **Vijay Ramaswamy**<sup>6,7</sup> • **Carolina Nör**<sup>6,8</sup> • **Michael D. Taylor**<sup>6,8,9,10</sup> • **Rafael Roesler**<sup>1,2</sup>

- 1 Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 2 Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 3 Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil
- 4 Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 5 Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
- 6 The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumour Research Centre, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
- 7 Division of Haematology/Oncology, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
- 8 Developmental and Stem Cell Biology Program, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada
- 9 Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada
- 10 Division of Neurosurgery, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada



Correspondence:

Rafael Roesler

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.

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

[rafaelroesler@hcpa.edu.br](mailto:rafaelroesler@hcpa.edu.br)

## Online Resource

### Supplementary material

#### Methods

#### **Analysis of neurotrophins and their receptors expression profiling in MB transcriptome data sets**

*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *NGFR*, *NGF*, *BDNF*, *NT-3* and *NT-4* expression levels were examined in a previously described transcriptome data sets comprising 986 patient samples and 9 normal cerebellum samples from Cavalli ( $n= 763$  samples profiled on the Affymetrix Gene 1.1 ST array as previously described and normalized using the RMA method, and subgrouped using similarity network fusion, GSE85217), Pfister ( $n= 223$  MB samples generated using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array) and Roth ( $n=9$  normal cerebellum samples, generated using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, GSE3526). Expression of the 8 markers across all samples was normalized within the 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)' and presented in box plot format as log<sub>2</sub>-transformed signal intensity. MB subtype was based on work from Cavalli et al. 2017 and the number of patients of each MB subtype was as follows: 49 WNT- $\alpha$ , 21 WNT- $\beta$ , 65 SHH- $\alpha$ , 35 SHH- $\beta$ , 47 SHH- $\gamma$ , 76 SHH- $\delta$ , 67 Group 3- $\alpha$ , 37 Group 3- $\beta$ , 40 Group 3- $\gamma$ , 98 Group 4- $\alpha$ , 109 Group 4- $\beta$  and 119 Group 4- $\gamma$ . All subgroups and subtypes were compared using a Kruskal-Wallis test for significance and Dunn's tests for post hoc comparisons in the Graphpad 5.0 software.  $P \leq 0.001$  was considered statistically significant.

Overall survival was measured from the time of initial diagnosis to the date of death or the date of last follow up using combined overall survival and gene expression data from Cavalli et al. 2017. Survival distribution was estimated according to the Kaplan–Meier method using a median cut-off and log-rank statistics.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with the 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)' software environment.

## **Analysis of neurotrophins and their receptors expression profiling across brain tumors transcriptome data sets.**

*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *NGFR*, *NGF*, *BDNF*, *NT-3* and *NT-4* expression levels were examined in previously described transcriptome data sets comprising 1434 samples from Berchtold ( $n= 172$  normal brain samples, GSE11882), Roth ( $n= 9$  normal cerebellum samples, GSE3526), Gilbertson ( $n= 76$  MB samples, GSE37418), Kool ( $n= 62$  MB samples, GSE10327), Pfister ( $n= 223$  MB samples), Pfister ( $n= 73$  MB-Shh samples, GSE49243), Kool ( $n= 182$  primitive neuroectodermal tumor samples, GSE73038), Gutman ( $n= 41$  pilocytic astrocytoma samples, GSE5675), Kool (atypical teratoid/rhabdoid tumor samples, GSE70678), Gilbertson ( $n= 83$  Ependymoma primary tumor samples), French ( $n= 276$  glioma samples, GSE16011), Paugh ( $n= 53$  pediatric glioma samples, GSE19578), Hegi ( $n= 80$  glioblastoma samples, GSE7696) and Rossing ( $n= 43$  pediatric recurrent tumor samples, GSE108088). All data sets were previously generated using Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Expression of the 8 markers across all samples was normalized within the 'R2: Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>)' and presented in dot plot format as log<sub>2</sub>-transformed signal intensity.

## Supplementary tables

### Statistical analysis

Table Analyzed	<b>NTRK1</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	305,2		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	97,28	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	213,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	13,50	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	232,4	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	277,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	290,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	437,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	391,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	387,8	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	448,2	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	424,4	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	116,3	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-83,78	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	135,1	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	180,4	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	193,3	No	*
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	340,4	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	294,2	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	290,5	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	350,9	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	327,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-200,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	18,73	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	64,10	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	76,92	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	224,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	177,9	No	**
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	174,2	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	234,5	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	210,8	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	218,9	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	264,2	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	277,0	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	424,2	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	378,0	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	374,3	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	434,7	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	410,9	Yes	***

SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	45,37	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	58,20	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	205,4	No	**
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	159,1	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	155,5	No	**
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	215,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	192,0	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	12,82	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	160,0	No	*
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	113,8	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	110,1	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	170,4	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	146,7	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	147,2	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	100,9	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	97,25	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	157,6	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	133,8	No	**
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-46,22	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-49,90	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	10,47	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-13,31	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-3,679	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	56,69	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	32,91	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	60,37	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	36,59	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-23,78	No	ns

Table Analyzed	<b>NTRK2</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	252,2		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	111,0	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	215,8	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	6,363	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-3,265	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	191,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-24,16	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-61,89	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	0,9347	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-178,0	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-120,2	No	ns

WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-120,5	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	104,8	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-104,7	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-114,3	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	80,64	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-135,2	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	-172,9	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-110,1	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-289,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	-231,2	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-231,5	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-209,4	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-219,0	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-24,13	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-239,9	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-277,7	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-214,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-393,7	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-336,0	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-336,2	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-9,629	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	185,3	No	**
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-30,52	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	-68,25	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-5,429	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-184,3	No	**
SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	-126,5	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-126,8	No	ns
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	194,9	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	-20,90	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	-58,62	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	4,200	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-174,7	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-116,9	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-117,2	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	-215,8	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	-253,5	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	-190,7	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	-369,6	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	-311,8	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	-312,1	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-37,73	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	25,10	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-153,8	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-96,01	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-96,29	No	ns
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	62,82	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-116,1	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	-58,29	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-58,56	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-178,9	Yes	***
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-121,1	No	ns

G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-121,4	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	57,79	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	57,51	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-0,2766	No	ns

Table Analyzed	NTRK3		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	450,0		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	-79,84	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	-429,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-514,8	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-413,4	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-514,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-34,56	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-139,6	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	30,38	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-205,2	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-263,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-211,2	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	-349,4	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-434,9	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-333,5	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-434,7	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	45,28	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	-59,73	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	110,2	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-125,4	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	-183,6	No	*
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-131,4	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-85,50	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	15,89	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-85,24	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	394,7	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	289,7	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	459,6	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	224,0	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	165,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	218,0	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	101,4	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	0,2577	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	480,2	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	375,2	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	545,1	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	309,5	Yes	***

SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	251,3	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	303,5	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	-101,1	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	378,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	273,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	443,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	208,1	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	149,9	No	**
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	202,1	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	479,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	374,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	544,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	309,3	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	251,0	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	303,3	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-105,0	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	64,94	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-170,7	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-228,9	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-176,7	Yes	***
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	169,9	No	*
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-65,66	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	-123,9	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-71,67	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-235,6	Yes	***
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-293,9	Yes	***
G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-241,6	Yes	***
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-58,24	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-6,011	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	52,23	No	ns

Table Analyzed	<b>NGFR</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	514,5		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	-53,70	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	-228,2	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-263,0	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-276,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-351,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	193,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	47,92	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	65,69	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-39,71	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	193,8	Yes	***



WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	26,67	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	-174,5	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-209,3	No	*
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-222,8	No	**
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-297,8	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	247,3	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	101,6	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	119,4	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	13,99	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	247,5	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	80,37	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-34,82	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-48,27	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-123,3	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	421,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	276,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	293,9	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	188,5	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	422,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	254,9	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-13,44	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-88,50	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	456,6	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	310,9	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	328,7	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	223,3	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	456,9	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	289,7	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	-75,06	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	470,1	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	324,4	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	342,2	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	236,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	470,3	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	303,1	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	545,1	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	399,4	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	417,2	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	311,8	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	545,4	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	378,2	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-145,7	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-127,9	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-233,3	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	0,2533	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-166,9	Yes	***
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	17,77	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-87,64	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	145,9	No	*
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-21,26	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-105,4	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	128,2	No	ns

G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-39,02	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	233,6	Yes	***
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	66,38	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-167,2	Yes	***

Table Analyzed	NGF		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	119,2		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	57,64	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	331,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	270,5	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	299,1	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	187,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	313,1	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	291,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	318,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	158,3	No	**
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	247,0	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	248,1	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	274,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	212,8	No	*
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	241,5	No	**
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	130,0	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	255,4	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	234,0	No	**
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	260,7	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	100,6	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	189,4	No	*
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	190,5	No	*
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-61,15	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-32,49	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-144,0	No	**
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-18,59	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-39,96	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-13,31	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-173,4	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-84,63	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-83,50	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	28,66	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-82,84	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	42,57	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	21,19	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	47,84	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-112,2	No	ns

SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	-23,48	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-22,34	No	ns
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	-111,5	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	13,90	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	-7,473	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	19,18	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-140,9	No	*
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-52,14	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-51,01	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	125,4	No	*
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	104,0	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	130,7	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	-29,39	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	59,36	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	60,50	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-21,38	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	5,273	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-154,8	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-66,05	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-64,91	No	ns
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	26,65	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-133,4	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	-44,67	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-43,53	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-160,1	No	**
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-71,32	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-70,18	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	88,75	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	89,89	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	1,138	No	ns

Table Analyzed	<b>BDNF</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	253,5		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	126,7	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	-35,39	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-272,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-354,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-0,8930	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-138,6	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-278,8	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-180,0	No	**
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-174,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-15,58	No	ns

WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-280,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	-162,1	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-399,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-481,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-127,6	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-265,3	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	-405,5	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-306,7	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-301,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	-142,3	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-406,7	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-236,9	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-318,9	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	34,49	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-103,2	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-243,4	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-144,6	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-138,9	No	**
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	19,81	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-244,6	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-82,04	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	271,4	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	133,7	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	-6,490	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	92,27	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	97,97	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	256,7	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-7,729	No	ns
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	353,4	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	215,7	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	75,55	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	174,3	No	*
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	180,0	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	338,7	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	74,31	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	-137,7	No	*
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	-277,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	-179,1	No	**
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	-173,4	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	-14,68	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	-279,1	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-140,2	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-41,42	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-35,72	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	123,0	No	*
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-141,4	No	**
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	98,76	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	104,5	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	263,2	Yes	***
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-1,240	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	5,706	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	164,4	No	**

G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-100,0	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	158,7	Yes	***
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-105,7	No	*
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-264,4	Yes	***

Table Analyzed	NT-3		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	349,0		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	-133,7	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	-42,92	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-113,0	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-124,5	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-83,40	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-139,3	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-315,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-305,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-371,3	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-377,7	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-411,5	Yes	***
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	90,76	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	20,67	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	9,193	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	50,28	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-5,623	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	-182,0	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-172,0	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-237,6	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	-244,0	Yes	***
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-277,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-70,10	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-81,57	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-40,48	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-96,39	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-272,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-262,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-328,3	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-334,8	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-368,5	Yes	***
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-11,47	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	29,62	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-26,29	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	-202,7	No	**
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-192,7	No	*
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-258,2	Yes	***

SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	-264,7	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-298,4	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	41,09	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	-14,82	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	-191,2	No	**
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	-181,2	No	**
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-246,8	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-253,2	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-287,0	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	-55,91	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	-232,3	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	-222,3	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	-287,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	-294,3	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	-328,0	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-176,4	No	**
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-166,4	No	*
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	-231,9	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-238,4	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-272,1	Yes	***
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	9,961	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	-55,57	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	-62,00	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-95,76	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	-65,53	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	-71,96	No	ns
G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	-105,7	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-6,434	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-40,20	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	-33,76	No	ns

Table Analyzed	NT-4		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	12		
Kruskal-Wallis statistic	254,9		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.001?	Summary
WNT- $\alpha$ vs WNT- $\beta$	-150,8	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\alpha$	-68,48	No	ns
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-169,9	No	*
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-190,6	No	**
WNT- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-151,0	No	*
WNT- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-193,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-339,6	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-283,8	Yes	***
WNT- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	67,12	No	ns
WNT- $\alpha$ vs G4- $\beta$	34,89	No	ns

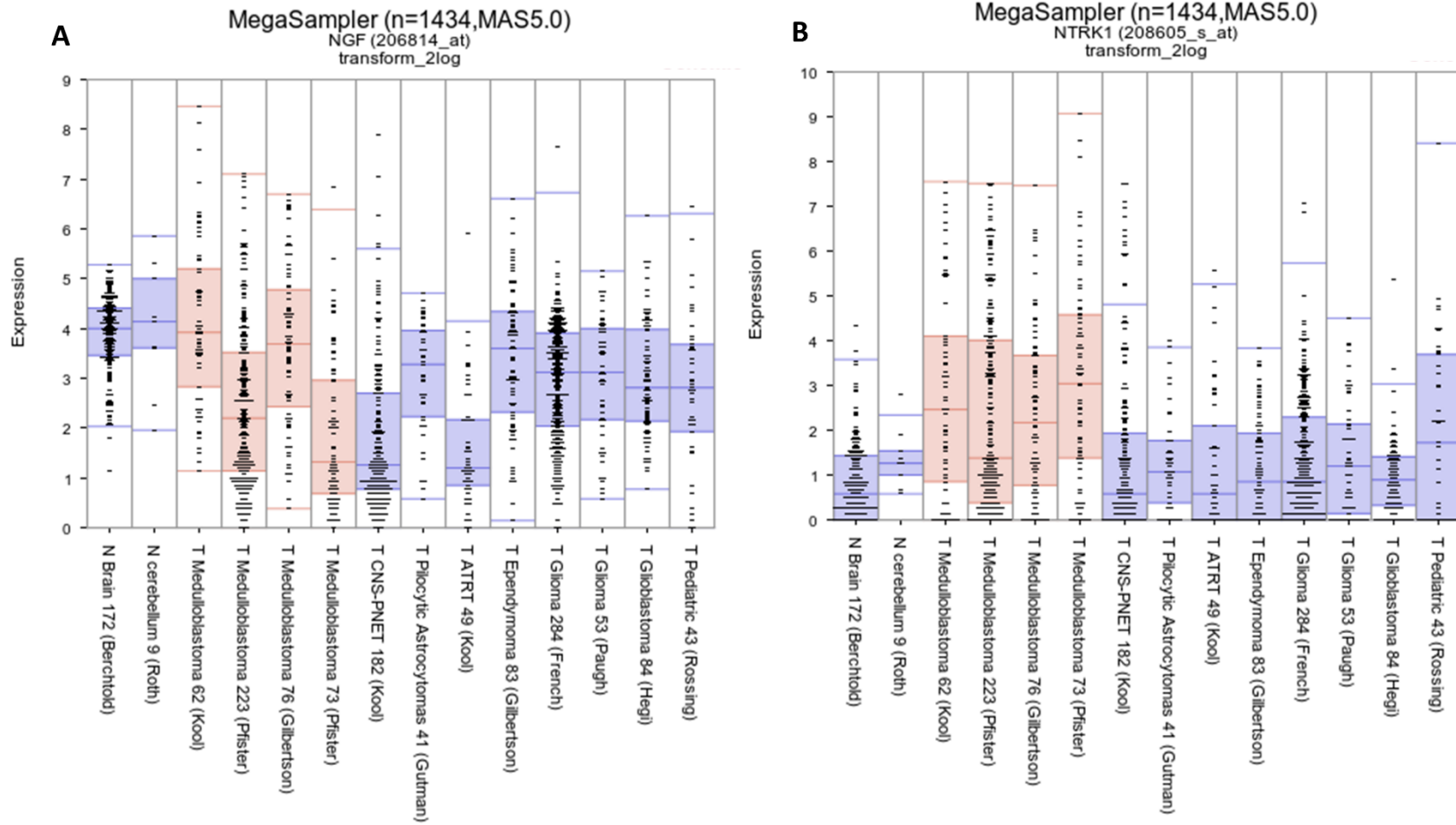
WNT- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	56,03	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\alpha$	82,28	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\beta$	-19,17	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-39,85	No	ns
WNT- $\beta$ vs SHH- $\delta$	-0,2832	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-42,87	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\beta$	-188,8	No	ns
WNT- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-133,1	No	ns
WNT- $\beta$ vs G4- $\alpha$	217,9	No	**
WNT- $\beta$ vs G4- $\beta$	185,7	No	*
WNT- $\beta$ vs G4- $\gamma$	206,8	No	**
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\beta$	-101,4	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\gamma$	-122,1	No	ns
SHH- $\alpha$ vs SHH- $\delta$	-82,57	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\alpha$	-125,2	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-271,1	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-215,4	Yes	***
SHH- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	135,6	No	**
SHH- $\alpha$ vs G4- $\beta$	103,4	No	ns
SHH- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	124,5	No	*
SHH- $\beta$ vs SHH- $\gamma$	-20,69	No	ns
SHH- $\beta$ vs SHH- $\delta$	18,88	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\alpha$	-23,70	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\beta$	-169,6	No	ns
SHH- $\beta$ vs G3- $\gamma$	-113,9	No	ns
SHH- $\beta$ vs G4- $\alpha$	237,1	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\beta$	204,8	Yes	***
SHH- $\beta$ vs G4- $\gamma$	226,0	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs SHH- $\delta$	39,57	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\alpha$	-3,017	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\beta$	-149,0	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G3- $\gamma$	-93,23	No	ns
SHH- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	257,7	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\beta$	225,5	Yes	***
SHH- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	246,6	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G3- $\alpha$	-42,59	No	ns
SHH- $\delta$ vs G3- $\beta$	-188,5	No	**
SHH- $\delta$ vs G3- $\gamma$	-132,8	No	ns
SHH- $\delta$ vs G4- $\alpha$	218,2	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\beta$	185,9	Yes	***
SHH- $\delta$ vs G4- $\gamma$	207,1	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G3- $\beta$	-145,9	No	ns
G3- $\alpha$ vs G3- $\gamma$	-90,22	No	ns
G3- $\alpha$ vs G4- $\alpha$	260,8	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\beta$	228,5	Yes	***
G3- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	249,7	Yes	***
G3- $\beta$ vs G3- $\gamma$	55,73	No	ns
G3- $\beta$ vs G4- $\alpha$	406,7	Yes	***
G3- $\beta$ vs G4- $\beta$	374,5	Yes	***
G3- $\beta$ vs G4- $\gamma$	395,6	Yes	***
G3- $\gamma$ vs G4- $\alpha$	351,0	Yes	***
G3- $\gamma$ vs G4- $\beta$	318,7	Yes	***

G3- $\gamma$ vs G4- $\gamma$	339,9	Yes	***
G4- $\alpha$ vs G4- $\beta$	-32,23	No	ns
G4- $\alpha$ vs G4- $\gamma$	-11,10	No	ns
G4- $\beta$ vs G4- $\gamma$	21,13	No	ns

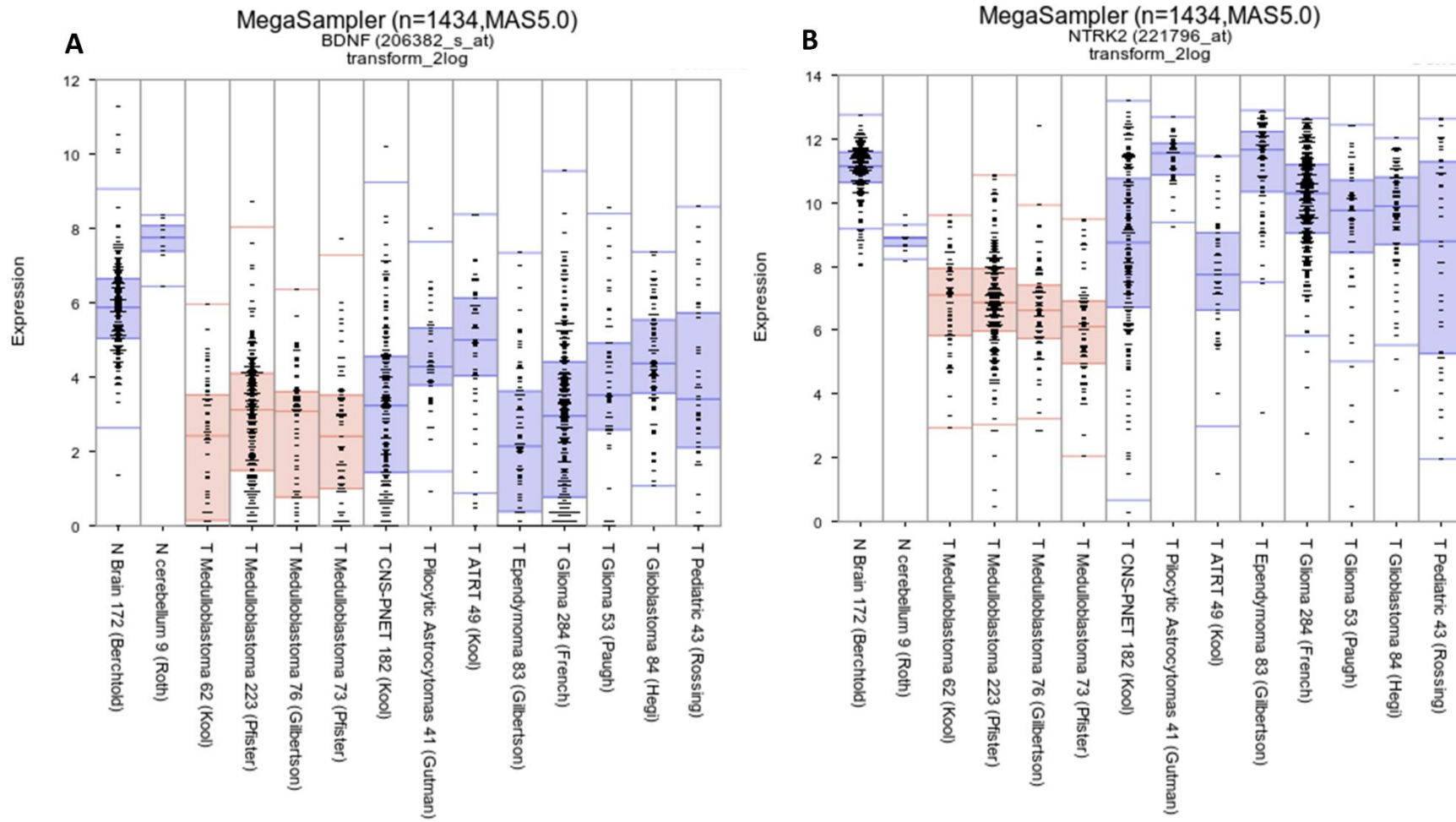


Supplementary figures

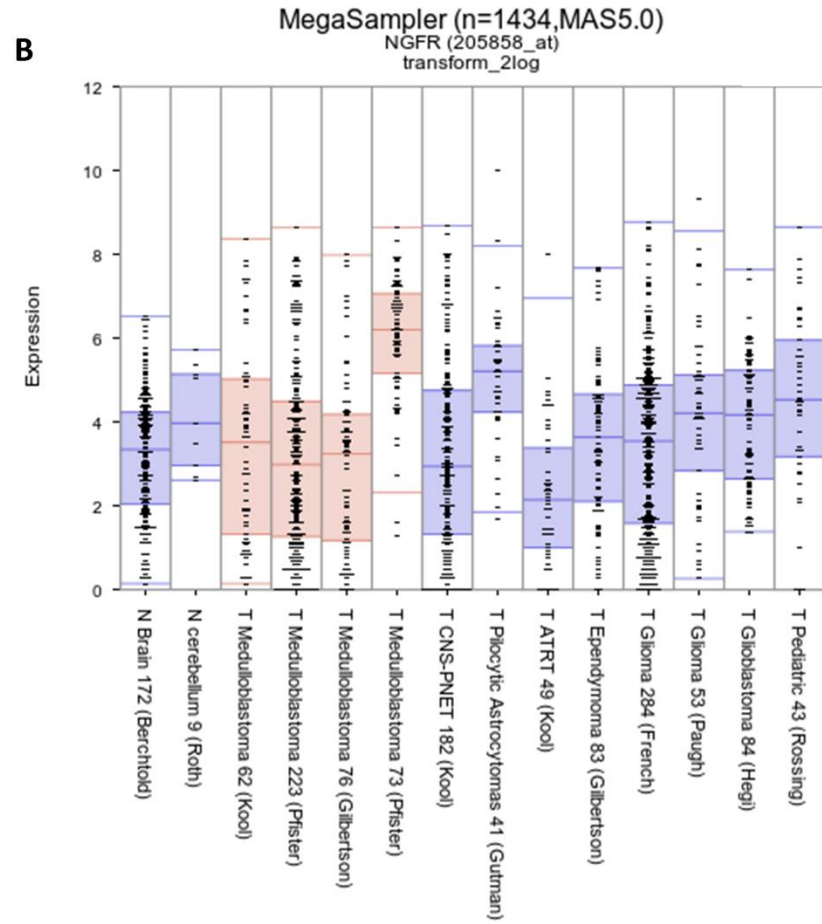
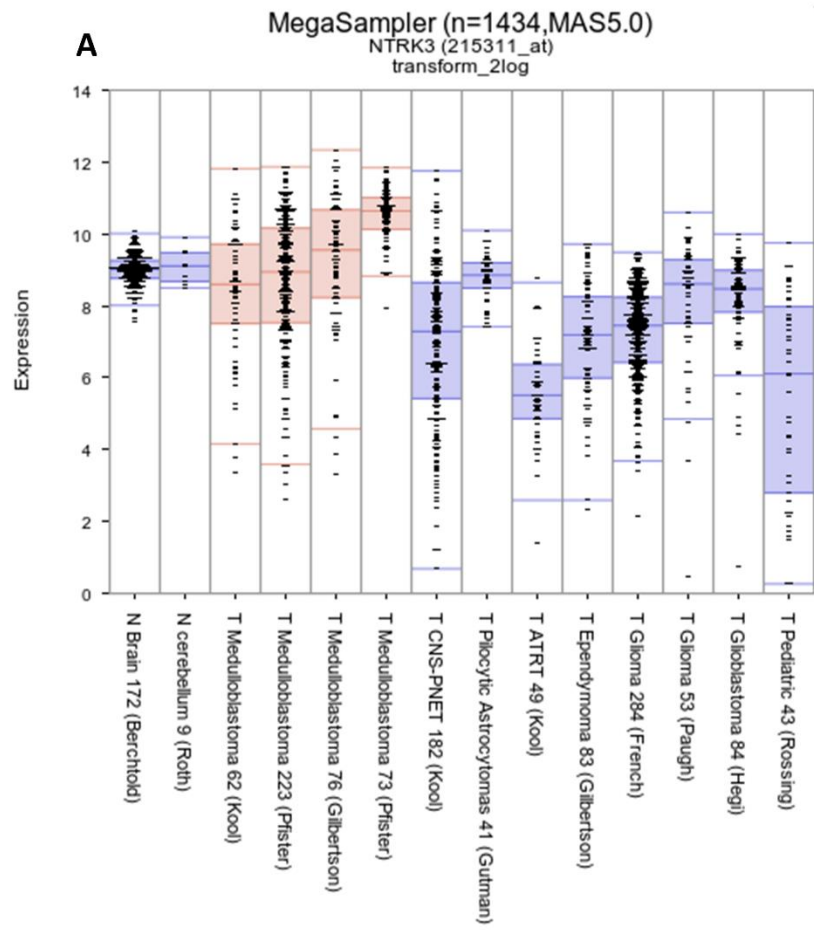
S1. Transcript levels of NGF and NTRK1 across different cohorts of brain tumors.



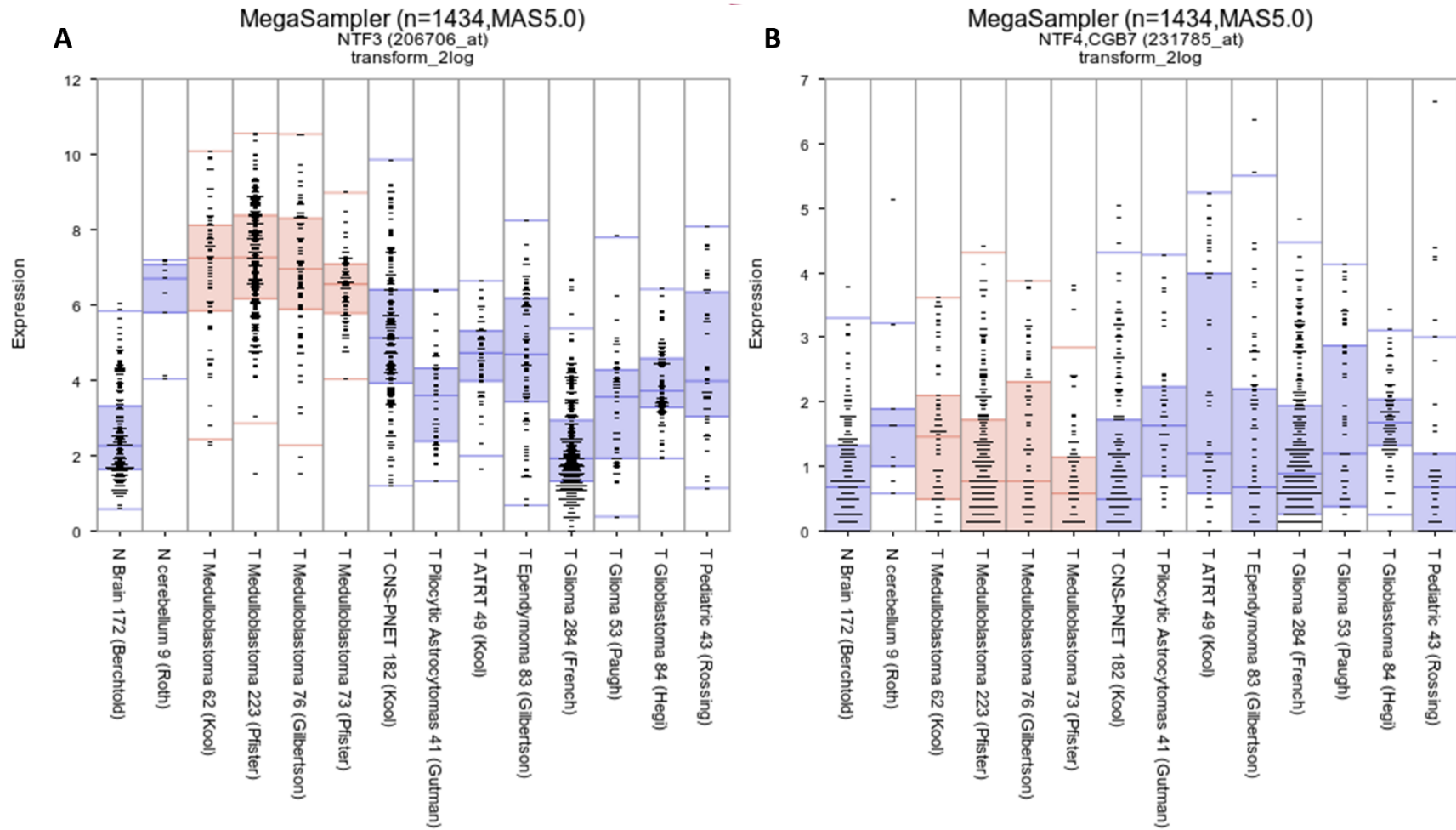
**S2. Transcript levels of BDNF and NTRK2 across different cohorts of brain tumors.**



**S3. Transcript levels of NTRK3 and NGFR across different cohorts of brain tumors.**



S4. Transcript levels of NTF3 and NTF4 across different cohorts of brain tumors.



## 5. DISCUSSÃO

---

Neurotrofinas e seus receptores têm sido apontados como importantes alvos de estudo na biologia do câncer. Esta família de fatores de crescimento pode ter papel dual na tumorigênese atuando como oncogenes ou supressores tumorais de forma contexto-específica (TAN; THIELE; LI, 2014). Em boa parte dos casos, o envolvimento de neurotrofinas e seus receptores em tumores estão relacionados a características de desenvolvimento, progressão e disseminação tumoral, que podem ocorrer a partir de eventos como mutações em genes *NTRK*, fusões oncogênicas, expressão de diferentes isoformas e superexpressão de Trks (GRIFFIN et al., 2018). Por outro lado, dependendo do tipo tumoral, contexto celular e isoforma expressa, estas proteínas também podem desenvolver papel supressor tumoral e estarem correlacionadas a prognóstico clínico favorável (CHOPIN et al., 2016).

A relevância biológica e clínica de neurotrofinas e seus receptores também vem sendo estudadas em MBs. A expressão destas proteínas foi identificada em amostras primárias de MB, e a modulação de TrkA e TrkC por neurotrofinas podem induzir apoptose e diferenciação em linhagens celulares (GRUBER-OLIPITZ et al., 2009; KELES et al., 1993; OHTA et al., 2006). No entanto, pouco se sabe sobre a relevância da sinalização por BDNF e TrkB para estes tumores. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que tanto a ativação de TrkB por BDNF ou a inibição seletiva de TrkB podem promover efeitos antitumorais em células de MB (NÖR et al., 2011; SCHMIDT et al., 2010; THOMAZ et al., 2016). Considerando que a sinalização aberrante por BDNF e TrkB frequentemente confere fenótipos agressivos e com característica de resistência tumoral em diversos cânceres, um dos nossos objetivos foi estudar o papel desta sinalização e sua importância como alvo terapêutico em MBs.

No primeiro capítulo deste trabalho, foram apresentados os dados obtidos na investigação da hipótese de que o bloqueio da sinalização por BDNF-TrkB poderia suprimir vias de sinalização relacionadas a proliferação e sobrevivência levando a redução do crescimento tumoral de MBs em modelos *in vitro* e *in vivo*. Nós observamos que o bloqueio de TrkB por 24, 48 e 72 horas inibe de forma consistente a viabilidade e proliferação celular de forma dose e tempo dependente em ambas linhagens de MB estudadas.

A regulação aberrante da proliferação de células tumorais é frequentemente modulada pela superexpressão do antígeno KI-67 (KI67), que tem sido utilizado por décadas como marcador de proliferação de células tumorais e marcador prognóstico na clínica (MENON et al., 2019). KI67 participa da regulação do ciclo celular e sua expressão se encontra variável em diferentes fases deste ciclo. Os níveis de KI67 começam a aumentar durante a fase G1 e atingem sua expressão máxima durante a mitose, sendo essencial para a formação da camada pericromossomal prevenindo a agregação dos cromossomos durante a divisão celular. Adicionalmente, células quiescentes, senescentes ou em estágios iniciais de parada do ciclo celular comumente apresentam níveis reduzidos de KI67 (SUN; KAUFMAN, 2018). Em nossos resultados nós observamos que as células tratadas com ANA-12 após 24 horas apresentaram a redução da expressão de KI67, o que sugere a redução da proliferação e provável parada no ciclo celular das linhagens de MB. A redução da proliferação e viabilidade de células cancerosas a partir da inibição de TrkB têm sido reportadas em diversos tipos de câncer, incluindo cânceres pediátricos como neuroblastoma (CROUCHER et al., 2015). Além disso, o bloqueio de TrkB por ANA-12 tem sido eficaz na redução do crescimento celular em sarcoma de Ewing, glioblastoma e carcinoma oral de células escamosas (HEINEN et al., 2016; MORIWAKI et al., 2018; PINHEIRO et al., 2017).

Uma das principais características observadas em células cancerosas é o desenvolvimento da capacidade de evasão à apoptose, o que permite que essas células sobrevivam por mais tempo levando ao acúmulo de mutações que influenciam na progressão tumoral, estimulam angiogênese, proliferação celular e interferem na diferenciação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, a ativação de mecanismos de apoptose são importantes alvos para terapias anticâncer (WONG, 2011). Nós notamos características morfológicas condizentes com fenótipo apoptótico após o tratamento das linhagens de MB com ANA-12. Devido a isso nós decidimos investigar se a redução da viabilidade observada a partir da inibição de TrkB acontecia através de mecanismos de ativação de apoptose.

De acordo com os nossos achados, a inibição de TrkB promove efeitos pró-apoptóticos em células de MB. Foi possível observar a cinética do processo de apoptose em que após o tratamento com ANA-12 por 24 horas houve o aumento de células em estágio inicial de apoptose e após 48 horas deste tratamento, nós detectamos o aumento da população de células em estágios tardios de apoptose. A indução de apoptose por ANA-12 foi

anteriormente demonstrada em células de leucemia através de mecanismos envolvendo a modulação de GSK3 $\beta$  (POLAKOWSKI et al., 2014). Adicionalmente, dois estudos prévios do nosso grupo haviam demonstrado que o tratamento de células de MB com BDNF na ausência de sora fetal bovino ou na presença de inibidores de HDACs promovem a redução da viabilidade destas células (NÖR et al., 2011; SCHMIDT et al., 2010). No entanto, no presente trabalho nós não observamos redução da viabilidade ou aumento de apoptose em células de MB expostas à BDNF em condições padrão de cultivo. Dessa forma, o efeito de BDNF em diferentes contextos celulares ainda necessita ser melhor explorado.

Os efeitos anti-proliferativos e pro-apoptóticos devido a inibição de TrkB estão frequentemente relacionados ao bloqueio de vias intracelulares como PI3K/AKT/mTOR e RAS/MEK/ERK (LI et al., 2015; ZHANG et al., 2008). A ativação constitutiva dessas vias de transdução de sinal é uma característica presente no câncer, seja através de mecanismos genéticos, epigenéticos ou através da regulação por receptores tirosina cinases (MANNING; TOKER, 2017; MCCUBREY et al., 2007). Ambas as vias também contribuem para a progressão e disseminação de MBs (WŁODARSKI et al., 2006).

Os nossos resultados sugerem que os efeitos antitumorais observados a partir da inibição de TrkB se devem a redução da ativação de ERK. A ativação de ERK1/2 leva a proliferação celular através da regulação do ciclo celular mediando a progressão da fase G1 para fase S pela regulação de fatores de transcrição como Elk1 e Sep-1a (LU; XU, 2006; SUN et al., 2015) . Além disso, a sinalização por ERK1/2 promove a sobrevivência celular através de mecanismos pós-traducionais e inativação de componentes da maquinaria de morte celular e transcrição de genes de sobrevivência. A inibição de ERK1/2 conseqüentemente leva à indução de apoptose (MEBRATU; TESFAIGZI, 2009). No contexto de MBs, a ativação aberrante da cascata de ERK é relevante para a promoção de estímulos proliferativos nos grupos SHH e grupo 4 (BADODI et al., 2017; BRECHBIEL; MILLER-MOSLIN; ADJEI, 2014). Ademais, estudos com a molécula ANA-12 revelam que está é capaz de reduzir a ativação de ERK induzida por BDNF em astrócitos (SABA et al., 2018) e que a ativação de ERK mediada pelo receptor do ácido g-aminobutírico (GABA) em neurônios pode ser prevenida pelo ANA-12 (BRADY et al., 2018). Estes achados são consistentes com a possibilidade de que o bloqueio de TrkB suprimir o crescimento e sobrevivência de células de MB através da inibição de ERK.

Neste estudo nós também avaliamos o estado de ativação de AKT após o bloqueio de TrkB. Diferente da nossa hipótese inicial, AKT permaneceu ativa após a inibição de TrkB,

e notamos um aumento significativo nos níveis de RNAm de STAT3 após o tratamento com ANA-12 em concentrações próximas a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ). STAT3 desempenha um papel importante como uma molécula intermediária ligada à ativação de TrkB e AKT (RADIN; PATEL, 2017), além disso, os MBs comumente apresentam desregulação e expressão aberrante de AKT e STAT3 e a ativação dessas vias está associada à sobrevivência celular, migração, angiogênese e resistência a agentes quimioterápicos (DIMITROVA; ARCARO, 2015; EHRHARDT et al., 2015; HARTMANN et al., 2006; XIAO et al., 2015). Células tronco tumorais de MB prominina 1 (CD133) positivas desenvolvem resistência a terapia através de mecanismos envolvendo a ativação de STAT3 (GARG et al., 2017). Foi demonstrado que a inibição de receptores tirosina cinase, tais como EGFR, receptor do fator de crescimento fibroblástico (FGFR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2), desencadeia a ativação STAT3, que pode ser uma causa comum de resistência às terapias alvo dirigidas (POLI; CAMPOREALE, 2015). Dessa forma, as nossas descobertas fornecem evidências iniciais de que a expressão de STAT3 pode ser associada à resistência à terapia dirigida ao TrkB em MB, e que a inibição de TrkB poderia ser possivelmente usada em combinação com outras terapias direcionadas contra STAT3 ou AKT para evitar a possível resistência à terapia anti-TrkB.

Um dos eventos importantes para a transformação oncogênica de células é a perda do controle do ciclo celular, que pode acontecer a partir do bloqueio da expressão de genes supressores tumorais (SHERR, 2004). Como nosso objetivo era desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-proliferativos observados em decorrência do bloqueio de TrkB, nós decidimos avaliar a expressão gênica do inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (*CDKN1A*; p21), conhecido supressor tumoral que atua através da regulação transcricional, parada do ciclo celular e modulação de apoptose (ABBAS; DUTTA, 2009). Nós observamos que a inibição de TrkB pode modular diferencialmente a expressão de p21 em linhagens celulares que apresentam diferentes características moleculares. As células UW228 expostas ao ANA-12 demonstraram um aumento da expressão de p21, enquanto efeitos opostos foram observados nas células D283 avaliadas nas mesmas condições.

Uma das possíveis explicações para a identificação de efeitos oposto quanto à expressão de p21 nas linhagens de MB pode estar associado a expressão de p53 nestas células. A linhagem UW228 apresenta características correspondentes a assinatura



molecular observada em tumores SHH, e apresentam mutação em *TP53* (T155N) (IVANOV et al., 2016; KUNKELE et al., 2012; TRISCOTT et al., 2013). Esta é uma mutação missense, localizada no éxon 5 no domínio de ligação ao DNA em *TP53* e que promove a tradução de uma proteína não funcional (<http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx#>). As células D283 apresentam características moleculares relacionadas a MBs do subgrupo 3 e 4 e apresentam status de p53 normal (IVANOV et al., 2016; KALLAY et al., 2019). P21 pode ser considerado um regulador negativo de apoptose dependente de p53 e o papel anti-apoptótico de p21 ocorre através da parada do ciclo celular ou por sua interação com diferentes proteínas pró-apoptóticas (PICCOLO; CRISPI, 2012). Paradoxalmente, p21 também pode induzir a apoptose através de mecanismos dependentes e independentes de p53 sob certas condições celulares (ABBAS; DUTTA, 2009). Exatamente como p21 promove a apoptose não é completamente compreendido e pode depender do aumento nos níveis da proteína pró-apoptótica BAX, ativação de membros da família de receptores do fator de necrose tumoral ou efeitos no reparo do DNA (GARTEL, 2005). Notavelmente, p21 foi regulado positivamente em células UW228, que além dos efeitos pró-apoptóticos e anti-proliferativos, também apresentaram características de diferenciação após a inibição de TrkB. O aumento dos níveis de expressão de p21 também são considerados críticos para induzir a diferenciação celular e este mecanismo é observado em células deficientes em p53 (ABBAS; DUTTA, 2009; NICOLAE et al., 2018). Além disso, é necessária uma análise adicional para investigar o papel exato de p21 sob exposição ao ANA-12.

Níveis elevados de expressão de TrkB em pacientes com tumores sólidos estão relacionados ao mau prognóstico (ZHANG et al., 2017) em cânceres como neuroblastoma (BRODEUR et al., 2009), câncer de mama (KIM et al., 2015), câncer colorretal (FUJIKAWA et al., 2012) e câncer pancreático (SCLABAS et al., 2005). Recentemente, a expressão aumentada de TrkB também foi associada com tipos tumorais menos diferenciados em câncer de pulmão e carcinoma de células escamosas (MORIWAKI et al., 2018; SINKEVICIUS et al., 2014). O estágio de diferenciação está fortemente associado à invasão e metástase, e os tumores pouco diferenciados apresentam fenótipos mais agressivos. Neste estudo, observamos que as células UW228 expostas ao ANA-12 desenvolveram morfologia celular mais diferenciada e apresentaram maior complexidade celular quando comparadas às células não tratadas.

Em concordância com este estudo, um trabalho anterior mostrou alterações morfológicas com características de diferenciação neuronal em linhagens de sarcoma de

Ewing tratadas com um inibidor de pan-Trk K252a (HEINEN et al., 2016). Consistentemente com alterações morfológicas, as células UW228 mostraram um aumento nos níveis de mRNA da  $\beta$ -III tubulina após a inibição de TrkB. A expressão da  $\beta$ -III tubulina é normalmente detectada em níveis elevados em células com origens neuronais e aumento da expressão desse marcador foi previamente associada à diferenciação em células de MB (FIASCHETTI et al., 2014; SANCHEZ-DIAZ et al., 2008). Em relação ao efeito de ANA-12 nos níveis proteicos de  $\beta$ -III tubulina, uma possível explicação para a não concordância dos nossos dados de expressão de RNAm e proteína poderia se dever ao fato de que nós avaliamos a expressão de  $\beta$ -III tubulina após 24h de tratamento. No entanto, verificamos alguns outros estudos mostrando a modulação desta proteína apenas após 72 horas de exposição a diferentes tratamentos (SOUZA et al., 2018; WANG et al., 2018).

A expressão diminuída do marcador Nestina foi detectado em ambas as células de MB tratadas com ANA-12. Nestina é comumente utilizado como um marcador para populações de células-tronco neurais e tem sido empregado para identificar subtipos de células tronco tumorais (NERADIL; VESELSKA, 2015). A expressão dessa proteína aumenta progressivamente durante o desenvolvimento de MB. Nestina se liga ao fator de transcrição GLI da família zinc finger 3 (GLI3) mediando assim o desenvolvimento de MBs do tipo SHH (LI et al., 2013). Além disso, Nestina coopera com a via SHH para estimular o crescimento do tumoral e a sua supressão inibe a proliferação e promove a diferenciação de células tumorais de MB (LI et al., 2016).

Alguns trabalhos na literatura já abordaram o papel de TrkB na proliferação, viabilidade e manutenção de células cancerosas menos diferenciadas. Foi demonstrado que células tronco cancerosas TrkB positivas são responsáveis pela recorrência de tumores após tratamento de modelo animal com câncer de mama triplo-negativo (TSAI et al., 2017). Em células tronco de glioma, TrkB aumenta a viabilidade destas células e a sinalização por neurotrofinas é capaz de manter o crescimento a longo prazo de esferas tumorais na ausência de fatores de crescimento como EGF e FGF (LAWN et al., 2015). Ademais, tumoresferas de sarcoma de Ewing mostraram níveis elevados de TrkB quando comparados a monocamadas (SOUZA et al., 2018). Apesar do inegável papel da sinalização BDNF-TrkB na diferenciação neuronal em células normais, em células cancerosas a expressão de TrkB pode estar aumentada e possui função na manutenção de células tronco tumorais. A partir disso, os nossos achados fornecem uma evidência

inicial de que o TrkB poderia ser um possível alvo para induzir diferenciação em tumores SHH.

A sinalização aberrante de proteínas Trk está implicada numa variedade de malignidades, devido a isso, inibidores de Trk foram desenvolvidos e estudados como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de câncer (MELDOLESI, 2017). Os primeiros ensaios clínicos com inibidores de Trk, como Larotrectinibe, Entrectinibe e Cabozantinibe, demonstraram sucesso no tratamento de cânceres de pulmão, glioblastomas, carcinomas colorretais, renais, mamários e melanomas (LANGE; LO, 2018). No entanto, o estudo dos inibidores seletivos de TrkB como alvo para o tratamento de câncer permanece apenas no campo da pesquisa pré-clínica. Neste trabalho, nós usamos uma pequena molécula antagonista de TrkB para o tratamento de modelo animal subcutâneos xenográfico de MB. Pela primeira vez demonstramos que a inibição de TrkB por ANA-12, na dose de 1 mg/kg/dia por 15 dias, retarda o crescimento do tumor, reduz a fosforilação de TrkB e diminui a expressão de KI67 neste modelo.

Em estudo publicado em 2018, ANA-12 foi empregado no tratamento de um modelo animal ortotópico de carcinoma oral de células escamosas. Foi utilizada a dose de 0,5 mg/kg de ANA-12 duas vezes ao dia por 20 dias, e consistentemente com nossos resultados, eles também observaram a redução do crescimento tumoral (MORIWAKI et al., 2018). Apoiando esses achados, a eficácia da inibição de TrkB também foi demonstrada em modelos *in vivo* de neuroblastoma e a utilização de inibidor pan-Trk retardou o crescimento do tumoral em combinação com quimioterapia (CROUCHER et al., 2015; LI et al., 2015). Quanto à viabilidade dessa abordagem terapêutica, ANA-12 pode atravessar a barreira hematoencefálica, característica essencial no tratamento de tumores cerebrais, no entanto, não conseguimos testar doses mais elevadas de ANA-12 em experimentos *in vivo*, devido à elevada insolubilidade desta droga em veículos aquosos. Assim, mais pesquisas são necessárias para melhorar a solubilidade desta molécula para fins de estudos pré-clínicos.

Contudo, nós demonstramos evidências de que a que a inibição TrkB resulta na diminuição na viabilidade e proliferação celular, indução de apoptose e comprometimento das vias de sobrevivência e proliferação em células de MB com características moleculares dos grupos SHH e grupo 3-4. Curiosamente, a inibição de TrkB foi capaz de promover características de diferenciação celular apenas em células SHH-TP53 mutadas e os pacientes que apresentam essas características têm o pior prognóstico clínico de todos os

subgrupos (RAMASWAMY et al., 2016). Além disso, o tratamento com ANA-12 prejudica o crescimento do tumor em xenoenxerto subcutâneo *in vivo*. Dado o papel crítico da sinalização BDNF / TrkB no desenvolvimento e plasticidade do SNC, podem surgir preocupações potenciais efeitos adversos dos inibidores de TrkB em pacientes de MB. Embora esta questão deva ser cuidadosamente considerada e investigada, estudos clínicos recentes com inibidores de Trks em pacientes pediátricos que apresentam fusões de NTRKs sugeriram um bom perfil de segurança destes tratamentos (COCCO; SCALTRITI; DRILON, 2018). Além disso, estudos de fase II para o tratamento de MBs recorrentes com Larotrectinibe estão atualmente em andamento (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03213704>), e os efeitos deste fármaco na cognição poderão ser melhor estimados com o acompanhamento a longo prazo destes pacientes.

No capítulo II deste estudo nós apresentamos uma ampla revisão da literatura sobre a sinalização por neurotrofinas e seus receptores em MB somada a resultados originais da expressão desses genes a partir de dados de transcriptoma de amostras de subtipos e subgrupos de pacientes com MB (CAVALLI et al., 2017). A última revisão da literatura exclusivamente dedicada a este tema foi realizada por Chou *et al.* em 1997 (CHOU; TROJANOWSKI; LEE, 1997), desde então, cerca de 70 novos artigos com dados originais foram publicados neste tópico. Conseqüentemente, esta parte do trabalho representa uma contribuição importante à literatura, que resume o atual “estado da arte” da sinalização por neurotrofinas em MB e discute potenciais implicações biológicas, prognósticas e clínicas. Nesta discussão, nós vamos destacar os pontos mais relevantes quanto a expressão e função de neurotrofinas em MB obtidos da literatura em conjunto com os resultados adquiridos de expressão de neurotrofinas em subgrupos e subtipos moleculares nestes tumores.

Muito das informações disponíveis sobre a expressão de neurotrofinas e Trks em amostras primárias de MBs foram realizados por experimentos de imuno-histoquímica e northern blot durante a década de 1990 (POMEROY et al., 1997; SEGAL et al., 1994; TAJIMA et al., 1998; WASHIYAMA et al., 1996). Com o objetivo de contribuir com o conhecimento da relevância clínica dessa sinalização em subgrupos e subtipos de MB, nós realizamos análise de dados de transcriptoma provenientes de diferentes coortes de amostras de MB. Primeiramente nós verificamos os níveis de expressão de genes de neurotrofinas, Trks e p75NTR dentre os 4 subgrupos moleculares e em cerebelo normal. Em seguida, as amostras foram subdivididas nos 12 subtipos moleculares quanto aos níveis

de expressão dos mesmos genes. Nós também analisamos a expressão de neurotrofinas e seus receptores em diferentes coortes de tumores cerebrais (dados suplementares), e avaliamos a expressão destes marcadores quanto à sobrevida.

De acordo com dados da literatura, a expressão de TrkA e NGF pode ser observada em amostras tumorais de MB desmoplásico nodular especialmente nas regiões nodulares do tumor, consideradas regiões mais diferenciadas (EBERHART et al., 2001). Adicionalmente, a expressão de TrkA e NGF foi correlacionada com índice apoptótico em amostras de pacientes recentemente diagnosticados com MB (OHTA et al., 2006). Os estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares têm corroborado com a hipótese de que a ativação de TrkA por NGF estimula morte e dificulta o crescimento celular, e que a expressão de TrkA se relaciona com proliferação reduzida, apoptose e diferenciação neuronal em MB (CHOU; TROJANOWSKI; LEE, 2000; COSTA et al., 2012; HAREL et al., 2009; LI et al., 2016; MURAGAKI et al., 1997; VALDERRAMA et al., 2009).

Nos nossos resultados, nós detectamos elevada expressão de NGF e *NTRK1* sobretudo em tumores WNT, particularmente em tumores do subtipo WNT- $\alpha$ . Este subtipo é comumente observado em crianças, apresentando monossomia do cromossomo 6 e excelente prognóstico (CAVALLI et al., 2017). Inesperadamente, os níveis elevados de *NTRK1* foram também observados em pacientes do subtipo SHH- $\beta$ , que são frequentemente metastáticos, apresentam deleções em *PTEN* e exibem a pior sobrevida global do subgrupo SHH (CAVALLI et al., 2017). A fim de investigar o impacto da expressão de *NTRK1* na sobrevida de pacientes com MB SHH, nós utilizamos o método de Kaplan-Meier dividindo os pacientes com alta e baixa expressão de *NTRK1*. Nós observamos que pacientes com elevada expressão deste gene apresentaram probabilidade de sobrevida reduzida, quando comparados a pacientes com baixa expressão. Curiosamente, a expressão de NGF não se apresentou elevada em pacientes SHH- $\beta$ . Os nossos resultados estão de acordo com a literatura prévia que mostra associação de TrkA e NGF com características supressoras tumorais, já que nós observamos elevada expressão de NGF e *NTRK1* principalmente em pacientes com bom prognóstico. No entanto, é importante ressaltar que o receptor TrkA é conhecido como um receptor de dependência, que na ausência do seu ligante promove atividades opostas às atividades normais do receptor. No caso de neurônios, durante o desenvolvimento, a expressão de NGF e TrkA promove proliferação e sobrevivência destas células, enquanto na ausência de NGF, TrkA envia sinais de morte celular para estas células (NIKOLETOPOULOU et al., 2010).

Funcionalmente TrkA na presença de NGF resulta na morte celular por apoptose em células de MB (MURAGAKI et al., 1997). Uma possível explicação à elevada expressão apenas de *NTRK1* em pacientes com pior sobrevida poderia se dar devido à reduzida expressão de NGF neste subtipo, conferindo efeitos pró-tumorais ao TrkA. Seria talvez interessante avaliar se pacientes com tumores SHH- $\beta$  poderiam se beneficiar de terapias disponíveis em ensaios clínicos com inibidores de Trks.

As implicações da expressão de TrkC em MB têm sido avaliadas por diversos estudos e consistentemente apresenta-se associada à prognóstico favorável nestes pacientes (GROTZER et al., 2000, 2001; SEGAL et al., 1994). Pacientes que apresentam elevados níveis de RNAm de TrkC apresentam significativamente maiores intervalos com doença livre de progressão e melhor sobrevida global (SEGAL et al., 1994). Além disso, a expressão de TrkC foi relacionada com aumento da sobrevida em cinco anos quando comparado a pacientes com baixa expressão deste receptor (GROTZER et al., 2000), e um melhor prognóstico foi observado em pacientes com elevados níveis de TrkC e baixos níveis de *MYC* (GROTZER et al., 2001; RUTKOWSKI et al., 2007). A partir da classificação molecular de MBs, foi observado que TrkC encontra-se particularmente expresso em tumores do subgrupo SHH (FRIEDRICH et al., 2017). Os nossos resultados estão em concordância com a literatura prévia, visto que nós observamos elevada expressão de *NTRK3* em tumores SHH, entretanto a expressão de *NTRK3* não apresenta diferenças entre os subgrupos de MB quando comparado a expressão no cerebelo normal. Além disso, a análise entre os 12 subtipos moleculares revelou que a expressão de TrkC está presente em todos os subtipos SHH. Dessa forma, podemos sugerir que TrkC possa ser útil na identificação de tumores SHH, no entanto, sem validade para a diferenciação entre amostras de diferentes subtipos.

A presença de p75NTR já foi identificada em amostras primárias de MB (BARNES et al., 2009; BÜHREN et al., 2000) e a sua função biológica, obtida através de estudos experimentais *in vitro*, parece estar envolvida na modulação de apoptose, migração, invasão e metástase (KÜCHLER et al., 2011; MARCHETTI et al., 2007; WANG et al., 2010). A expressão de p75NTR em populações celulares de linhagens de MB pode estar associada a elevada capacidade de auto-renovação (MORRISON et al., 2013), embora outros achados sugeriram que está expressão identifica células progenitoras com baixa capacidade de auto-renovação (LIANG et al., 2015). A partir da nossa investigação da expressão de *NGFR* em diferentes cortes de tumores cerebrais, nós identificamos elevada

expressão de *NGFR* em MBs SHH quando comparados a cerebelo normal ou diversos outros tumores de SNC. Resultados similares foram observados também por Morrison e Liang que demonstraram elevada expressão de *NGFR* no subgrupo SHH (MORRISON et al., 2013), especialmente no subtipo SHH- $\delta$  (LIANG et al., 2018), mais comum em pacientes adultos com prognóstico favorável e que apresentam mutações no promotor de TERT. Este subtipo também apresenta o enriquecimento de redes com genes envolvidos na manutenção de telômeros (CAVALLI et al., 2017). A expressão de *NGFR* tem sido proposta como marcador diagnóstico e prognóstico para MBs SHH (LIANG et al., 2018).

A expressão de TrkB e BDNF havia sido previamente detectada em amostras primárias de MB (TAJIMA et al., 1998; WASHIYAMA et al., 1996). No entanto, a significância biológica e clínica desta sinalização ainda permanece pouco estudada. Dessa forma, o nosso grupo vem tentando contribuir com o conhecimento principalmente do papel de TrkB em cultivos celulares de MB. A ativação de TrkB por BDNF pode estar associada a redução de viabilidade dependendo das condições experimentais (NÖR et al., 2011; SCHMIDT et al., 2010). Por outro lado, o bloqueio de TrkB demonstrou apresentar efeitos antitumorais em MB (THOMAZ et al., 2016, 2019). Ao analisar a expressão de BDNF e *NTRK2* em dados de transcriptoma de amostras primárias de MB, nós observamos que a expressão destes genes foi menor em amostras de MB quando comparado ao cerebelo normal. De acordo com as nossas análises e dados disponíveis na literatura (LAWN et al., 2015), a baixa expressão de BDNF parece ser um padrão não só em MBs, mas em diversos tumores cerebrais como glioblastoma, ependimoma e tumores teratóides rabdóides atípicos. Em relação a distribuição destes marcadores em subtipos de MB nós detectamos maior expressão de BDNF no subtipo SHH- $\gamma$ . Este subtipo é mais prevalente em crianças e apresenta bom prognóstico. Além disso, genes envolvidos em vias de desenvolvimento e de receptores tirosina cinases estão enriquecidas neste subtipo (CAVALLI et al., 2017). Nós observamos elevados níveis de expressão de *NTRK2* principalmente no subgrupo 4 e subtipo grupo 4- $\alpha$ . O grupo 4 é o subgrupo mais prevalente compreendendo 40% de todos os MBs, e o grupo 4- $\alpha$  é enriquecido para amplificação de *MYCN* e *CDK6*. Genes ligados à migração celular e desenvolvimento neuronal também são enriquecidos neste subtipo.

É importante citar que recentemente o papel de BDNF como supressor tumoral têm sido relatados por alguns estudos (RADIN; PATEL, 2017). A superexpressão de BDNF no hipotálamo pode exercer propriedades imunomoduladoras induzindo resposta antitumoral através da regulação de proteínas envolvidas na resistência tumoral (MENG et al., 2018;

RADIN; PATEL, 2017). Pesquisadores observaram que camundongos com xenoenxerto de células de melanoma apresentavam tumores menores quando mantidos em condições de enriquecimento ambiental quando comparados aos animais que viviam em condições padrão (CAO et al., 2010). A expressão de BDNF apresentou-se aumentada no hipotálamo de camundongos em condições de enriquecimento ambiental durante o período deste estudo, e o silenciamento da expressão de BDNF no hipotálamo foi capaz de inibir este efeito de retardo da progressão tumoral (CAO et al., 2010). Estudos adicionais indicaram que o aumento da expressão de BDNF no hipotálamo através de modificações ambientais ou genéticas promovem o aumento da citotoxicidade de células T e apresentam um fenótipo anticâncer em melanoma, glioma e câncer de mama (GAROFALO et al., 2015; LIU et al., 2014; XIAO et al., 2016). No entanto, quando comparamos a expressão de BDNF quanto à sobrevida em pacientes de MB observamos que pacientes expressando elevados níveis de BDNF apresentam pior sobrevida global quando comparados a pacientes com baixa expressão desta neurotrofina.

Nos nossos resultados, nós observamos de forma geral que MBs apresentam maior expressão de *NTRK2* do que de BDNF. Em outro trabalho, níveis de TrkB e BDNF semelhantes ao do nosso estudo foram detectados em dados de microarranjo de glioblastoma primários presentes nas bases de dados “Cancer Genome Atlas Portal” (TCGA) e dados do programa “Moffitt's Total Cancer Care” (LAWN et al., 2015). Este estudo demonstrou que TrkB se encontra duas vezes mais expresso do que BDNF nestes tumores. Portanto, mais estudos com modelos experimentais ainda serão necessários para avaliar o impacto da estimulação e inibição da sinalização BDNF-TrkB em tumores cerebrais, incluindo MBs. Além disso, seria importante investigar se TrkB promove efeitos pró-tumorais na ausência de BDNF em tumores de SNC.

A elevada expressão de NT-3 foi observada no grupo 4 quando comparada com a expressão em amostras de cerebelo normal, e elevada expressão desta neurotrofina também foi observada em todos subtipos do grupo 4. Quando avaliamos a probabilidade de sobrevivência dos pacientes do grupo 4 de acordo com os níveis de expressão de NT-3, descobrimos que a alta expressão de NT-3 estava relacionada ao aumento da probabilidade de sobrevida global no grupo 4. Estes resultados sugerem que o NT-3 poderia ser potencialmente usado como um marcador de sobrevivência em MBs do grupo 4.

A revisão da literatura assim como os resultados gerados a partir de dados de transcriptoma fornecem evidências da importância clínica da sinalização por neurotrofinas



em MB, o que pode permitir um maior refinamento de alguns destes genes como potenciais biomarcadores de subgrupos e subtipos moleculares de MB.

## 6. CONCLUSÕES

---

### 6.1. Conclusões gerais

Através da realização deste trabalho foi possível confirmar a importância da sinalização por neurotrofinas em MB. Nós demonstramos que o bloqueio de TrkB confere atividades antitumorais a linhagens celulares de MB, através de mecanismos reguladores de proliferação, sobrevivência e diferenciação. Além disso, nós observamos que o bloqueio de TrkB *in vivo*, através do tratamento com a pequena molécula ANA-12, retarda o crescimento de tumores subcutâneos em modelo animal de MB xenográfico.

Nós também buscamos avaliar as possíveis implicações translacionais da expressão de componentes da via de sinalização por neurotrofinas ao avaliarmos a expressão destes genes em dados de transcriptoma de amostras primárias de subgrupos e subtipos de MB. Apesar dos nossos resultados de expressão de TrkB e BDNF em MBs primários não terem suportado a nossa hipótese inicial de que a sinalização por BDNF/TrkB promove tumorigênese em MBs, nós acreditamos que mais estudos sejam necessários para esclarecer por que os níveis elevados de BDNF e TrkB foram associados com redução da sobrevida em pacientes com MB.

Este estudo também confirmou alguns achados prévios da literatura como a elevada expressão de *NGFR* e *NTRK3* em MBs do tipo SHH que poderão potencialmente servir como marcadores diagnóstico e prognóstico para este subgrupo. Adicionalmente, nós identificamos *NTRK1* como potencial marcador de sobrevivência em MBs SHH- $\beta$  e identificamos NT-3 como possível marcador de sobrevivência no subgrupo 4.

## **6.2. Conclusões específicas**

### **6.2.1. Capítulo 1**

- A inibição de TrkB, pelo antagonista ANA-12, reduz a viabilidade e proliferação celular de forma dose e tempo-dependente em linhagens celulares de MB representativas dos subtipos moleculares SHH e grupo 3-4.
- A inibição de TrkB induz apoptose em linhagens celulares de MB, e a estimulação de TrkB por BDNF não afeta a sobrevivência destas células nas condições experimentais avaliadas neste estudo.
- A inibição de TrkB promove a redução da ativação de ERK em células de MB, e este efeito foi associado a redução da proliferação e sobrevivência celulares. O tratamento com ANA-12 não alterou a atividade de AKT.
- O bloqueio de TrkB promove a modulação diferencial da expressão de p21 nas linhagens de MB. O tratamento com doses intermediárias de ANA-12 promoveu o aumento da expressão de STAT3 nestas células. A inibição de TrkB também promoveu a redução da expressão do marcador de pluripotência Nestina em ambas as células, e aumentou a expressão de RNAm de TUBB3 apenas na linhagem celular com características moleculares do subgrupo SHH.
- O tratamento de modelo animal subcutâneo xenográfico de MB com a pequena molécula ANA-12, reduziu as taxas de crescimento tumorais, assim como reduziu a ativação de TrkB e a expressão do marcador de proliferação KI67.

### 6.2.2. Capítulo 2

- Através do artigo de revisão nós concluímos que o papel de Trks em MB ilustra como os cânceres cerebrais na infância podem sequestrar vias moleculares envolvidas na regulação da sobrevivência, morte e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento embrionário. A expressão de Trk pode influenciar a progressão da MB e está sinalização deveria ser explorada como um alvo terapêutico. No entanto, os papéis diferenciais de subtipos de receptores Trk em MB, onde a estimulação de TrkA e TrkC podem promover a morte celular, enquanto TrkB pode apresentar ações pró ou antitumorais, torna mais difícil prever quais seriam os efeitos clínicos dos inibidores de pan-Trks em pacientes com MB.
- Nós identificamos a expressão diferencial de componentes da sinalização de neurotrofinas através de dados de transcriptoma de amostras primárias de MB em diferentes subgrupos e subtipos moleculares. Nós concluímos que esses genes possuem potencial para serem utilizados como marcadores diagnósticos, prognósticos e de sobrevivência em pacientes com MB.

## 7. QUESTÕES EM ABERTO E PERSPECTIVAS

---

### 7.1. Questões em aberto

- Quais os mecanismos envolvidos na diferenciação observada em células UW228, representativas do subgrupo SHH? Esse efeito permanece a longo prazo?
- Como o status de p53 interfere na regulação de p21 após bloqueio de TrkB, e quais as implicações nas respostas de apoptose, parada no ciclo celular e diferenciação?
- STAT3 atua como via compensatória para a manutenção de crescimento tumoral em resposta a inibição de TrkB?
- O bloqueio de TrkB reduz o crescimento tumoral e influência na sobrevida em modelos animais de MB ortotópico?
- Os reduzidos níveis de expressão de BDNF observados em amostras primárias com tumores de SNC incluindo MBs podem estar relacionados com atividades oncogênicas ou oncolíticas?
- Quais dos componentes da via de sinalização por neurotrofinas poderiam ser alvos de manipulação farmacológica em pacientes com MB?

## 7.2. Perspectivas

- Confirmar a redução ou aumento da expressão de ERK, Nestina, TUBB3, STAT3, TrkB e fosfo-TrkB por outras técnicas como WB e imunocitoquímica decorrente da inibição de TrkB.
- Avaliar a localização sub-celular e fosforilação de p21 e p53 por microscopia confocal e a expressão dos alvos de p21 como ciclinas, E2F1, MYC, ASK1, “stress-activated protein kinase” (SAPK), procaspase 3 e caspases 8 e 10 em linhagens de MB após o bloqueio de TrkB.
- Investigar os impactos do silenciamento de TrkB e BDNF em linhagens celulares de MB sobre parâmetros de crescimento tumoral, apoptose e diferenciação celular em linhagens de MB.
- Acessar o perfil global do transcriptoma baseado nos painéis NanoString para classificação molecular de MBs de células e tumores de xenoinxerto de MB após a inibição de TrkB.
- Avaliar os efeitos de ANA-12 sobre o crescimento tumoral e sobrevivência em modelo animal de MB ortotópico.
- Verificar os efeitos da ativação genética de BDNF, bem como do silenciamento de BDNF e TrkB sobre o crescimento tumoral em modelos animais de MB ortotópico.

## 8. REFERÊNCIAS

---

- ABBAS, Tarek; DUTTA, Anindya. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400–414, 2009.
- ALDOSARI, Naji et al. Comprehensive molecular cytogenetic investigation of chromosomal abnormalities in human medulloblastoma cell lines and xenograft. **Neuro-Oncology**, v. 4, n. 2, p. 75–85, 2002.
- ALOE, Luigi. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 7, p. 395–9, 2004.
- ALOE, Luigi et al. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 239, 2012.
- ALSHEHRI, M. M.; ROBBINS, S. M.; SENGER, D. L. The Role of Neurotrophin Signaling in Gliomagenesis. In: **Vitamins and hormones**, v. 104p. 367–404.
- AMATU, Alessio; SARTORE-BIANCHI, Andrea; SIENA, Salvatore. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. **ESMO Open**, v. 1, n. 2, p. e000023, 2016.
- ARDINI, E. et al. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 4, p. 628–639, 2016.
- AYRAULT, Olivier et al. Two Tumor Suppressors, p27<sup>Kip1</sup> and Patched-1, Collaborate to Prevent Medulloblastoma. **Molecular Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. 33–40, 2009.
- BADODI, Sara et al. Convergence of BMI1 and CHD7 on ERK Signaling in Medulloblastoma. **CellReports**, v. 21, p. 2772–2784, 2017.
- BAI, R. Y. et al. OTX2 Represses Myogenic and Neuronal Differentiation in Medulloblastoma Cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 22, p. 5988–6001, 2012.
- BANDOPADHAYAY, Pratiti et al. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. **Clinical cancer research**, v. 20, n. 4, p. 912–25, 2014.
- BAO, Wei et al. Upregulation of TrkB Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Anoikis Resistance in Endometrial Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70616, 2013.
- BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549–53, 1982.
- BARNES, Michael et al. Expression of p75<sup>NTR</sup> in fetal brain and medulloblastomas: evidence of a precursor cell marker and its persistence in neoplasia. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 92, n. 2, p. 193–201, 2009.
- BATES, Brian et al. Neurotrophin–3 is required for proper cerebellar development. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 115–117, 1999.
- BEBY, Francis; LAMONERIE, Thomas. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. **Experimental Eye Research**, v. 111, p. 9–16, 2013.
- BHAKTA, Nickhill et al. Childhood cancer burden: a review of global estimates. **The Lancet**

**Oncology**, v. 20, n. 1, p. e42–e53, 2019.

BHATIA, Aashim; PRUTHI, Sumit. Pediatric Brain Tumors: A Different Ball Game. **Seminars in Roentgenology**, v. 53, n. 1, p. 77–100, 2018.

BIGNER, S. H. et al. Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. **Cancer research**, v. 50, n. 8, p. 2347–50, 1990.

BINDER, Devin K.; SCHARFMAN, Helen E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth factors**, v. 22, n. 3, p. 123–31, 2004.

BOULAY, Gaylor et al. OTX2 Activity at Distal Regulatory Elements Shapes the Chromatin Landscape of Group 3 Medulloblastoma. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 3, p. 288–301, 2017.

BOULLE, Fabien et al. TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. **Progress in neurobiology**, v. 98, n. 2, p. 197–206, 2012.

BOURDEAUT, Franck; DELATTRE, Olivier. Genetic predisposition to medulloblastomas: just follow the tumour genome. **The Lancet. Oncology**, v. 19, n. 6, p. 722–723, 2018.

BOURGEOIS, J. M. et al. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 24, n. 7, p. 937–46, 2000.

BOUZAS-RODRIGUEZ, Jimena et al. Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 850–858, 2010.

BRADY, Megan L. et al. Depolarizing, inhibitory GABA type A receptor activity regulates GABAergic synapse plasticity via ERK and BDNF signaling. **Neuropharmacology**, v. 128, p. 324–339, 2018.

BRECHBIEL, Jillian; MILLER-MOSLIN, Karen; ADJEI, Alex A. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 6, p. 750–759, 2014.

BRODEUR, Garrett M. et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 10, p. 3244–50, 2009.

BÜHREN, J. et al. 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. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 59, n. 3, p. 229–40, 2000.

CAO, Lei et al. Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 52–64, 2010.

CARBALLO, Gabriela Basile et al. A highlight on Sonic hedgehog pathway. **Cell Communication and Signaling**, v. 16, n. 1, p. 11, 2018.

CARTER, B. D. et al. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. **Science**, v. 272, n. 5261, p. 542–5, 1996.

CASSIA, Guilherme de Souza e et al. Childhood Medulloblastoma Revisited. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 27, n. 6, p. 479–502, 2018.

CASTELLANO, Esther; DOWNWARD, Julian. RAS Interaction with PI3K: More Than Just



- Another Effector Pathway. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–74, 2011.
- CAVALLI, Florence MG et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. , 2017.
- CAZORLA, Maxime et al. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 5, p. 1846–57, 2011.
- CHANG, Chu H.; HOUSEPIAN, Edgar M.; HERBERT, Charles. An Operative Staging System and a Megavoltage Radiotherapeutic Technic for Cerebellar Medulloblastomas. **Radiology**, v. 93, n. 6, p. 1351–1359, 1969.
- CHAO, Moses V.; RAJAGOPAL, Rithwick; LEE, Francis S. Neurotrophin signalling in health and disease: Figure 1. **Clinical Science**, v. 110, n. 2, p. 167–173, 2006.
- CHAO, Moses V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 299–309, 2003.
- CHATURVEDI, Nagendra K. et al. Improved therapy for medulloblastoma: targeting hedgehog and PI3K-mTOR signaling pathways in combination with chemotherapy. **Oncotarget**, v. 9, n. 24, p. 16619–16633, 2018.
- CHODROFF, Leah et al. EXPRESS: BDNF Signaling Contributes to Oral Cancer Pain in a Preclinical Orthotopic Rodent Model. **Molecular pain**, v. 12, 2016.
- CHOI, D. Y. et al. Sustained Signaling by Phospholipase C- Mediates Nerve Growth Factor-Triggered Gene Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 8, p. 2695–2705, 2001.
- CHOPIN, Valérie et al. Neurotrophin signaling in cancer stem cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 9, p. 1859–1870, 2016.
- CHOU, T. T.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 1, p. 565–70, 2000.
- CHOU, Thomas T.; TROJANOWSKI, John Q.; LEE, Virginia M. Y. Neurotrophin signal transduction in medulloblastoma. **Journal of Neuroscience Research**, v. 49, n. 5, p. 522–527, 1997.
- CHOUDHRY, Zia et al. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. **Annals of neurosciences**, v. 21, n. 1, p. 28–31, 2014.
- COCCO, Emiliano; SCALTRITI, Maurizio; DRILON, Alexander. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 12, p. 731–747, 2018.
- CONTRERAS-ZÁRATE, Maria J. et al. Estradiol induces BDNF/TrkB signaling in triple-negative breast cancer to promote brain metastases. **Oncogene**, 2019.
- COOK SANGAR, Michelle L. et al. Inhibition of CDK4/6 by Palbociclib Significantly Extends Survival in Medulloblastoma Patient-Derived Xenograft Mouse Models. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 19, p. 5802–5813, 2017.
- CORBIT, K. C.; FOSTER, D. A.; ROSNER, M. R. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells.

**Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 6, p. 4209–18, 1999.

COSTA, B. et al. STK25 Protein Mediates TrkA and CCM2 Protein-dependent Death in Pediatric Tumor Cells of Neural Origin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29285–29289, 2012.

CROUCHER, Jamie L. et al. TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 75, n. 1, p. 131–141, 2015.

DANG, Chengxue et al. Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 850–858, 2006.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Acts. **Genes & Development**, v. 13, n. 22, p. 2905–2927, 1999.

DE FARIAS, Caroline Brunetto et al. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 2, p. 328–332, 2012.

DEINHARDT, Katrin; CHAO, Moses V. Trk Receptors. In: **Handbook of experimental pharmacology**. v. 220p. 103–119.

DENKINS, Yvonne et al. Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins. **Neuro-oncology**, v. 6, n. 2, p. 154–65, 2004.

DESMET, C. J.; PEEPER, D. S. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? **Cellular and molecular life sciences**, v. 63, n. 7–8, p. 755–9, 2006.

DESOUZA, Ruth-Mary et al. Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 176, 2014.

DIMITROVA, V.; ARCARO, A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Medulloblastoma. **Current Molecular Medicine**, v. 15, n. 1, p. 82–93, 2015.

DOUSSOUKI, Maher El; GAJJAR, Amar; CHAMDINE, Omar. Molecular genetics of medulloblastoma in children: diagnostic, therapeutic and prognostic implications. **Future Neurology**, v. 14, n. 1, p. FNL8, 2019.

DRILON, Alexander et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). **Cancer Discovery**, v. 7, n. 4, p. 400–409, 2017.

DRILON, Alexander et al. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion–Positive Solid Tumors. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 9, p. 963–972, 2017.

DRILON, Alexander et al. Efficacy of Larotrectinib in *TRK* Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 8, p. 731–739, 2018.

EBERHART, C. G. et al. Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 60, n. 5, p. 462–9, 2001.

EGGERT, A. et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. **Journal of clinical oncology**, v. 19, n. 3, p. 689–96,

2001.

EHRHARDT, Michael et al. The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 802–13, 2015.

EISNER, Adriana et al. The Eya1 Phosphatase Promotes Shh Signaling during Hindbrain Development and Oncogenesis. **Developmental Cell**, v. 33, n. 1, p. 22–35, 2015.

ESPOSITO, D. et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 35, p. 32687–95, 2001.

EZZAT, Sameera et al. Pediatric brain tumors in a low/middle income country: does it differ from that in developed world? **Journal of Neuro-Oncology**, v. 126, n. 2, p. 371–376, 2016.

FARRELL, Christopher J.; PLOTKIN, Scott R. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. **Neurologic Clinics**, v. 25, n. 4, p. 925–946, 2007.

FERNANDEZ-MIRANDA, Juan C. et al. Craniopharyngioma: A pathologic, clinical, and surgical review. **Head & Neck**, v. 34, n. 7, p. 1036–1044, 2012.

FIASCHETTI, G. et al. Epigenetic silencing of miRNA-9 is associated with HES1 oncogenic activity and poor prognosis of medulloblastoma. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 3, p. 636–647, 2014.

FILBIN, Mariella; MONJE, Michelle. Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. **Nature Medicine**, v. 25, n. 3, p. 367–376, 2019.

FILIPP, Fabian V.; LI, Chen; BOIKO, Alexander D. CD271 is a molecular switch with divergent roles in melanoma and melanocyte development. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7696, 2019.

FORGET, Antoine et al. Aberrant ERBB4-SRC Signaling as a Hallmark of Group 4 Medulloblastoma Revealed by Integrative Phosphoproteomic Profiling. **Cancer Cell**, v. 34, n. 3, p. 379- 395.e7, 2018.

FRIED, Iris et al. Optic pathway gliomas: a review. **CNS oncology**, v. 2, n. 2, p. 143–59, 2013.

FRIEDMAN, H. S. et al. Establishment and Characterization of the Human Medulloblastoma Cell Line and Transplantable Xenograft D283 Med. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 44, n. 6, p. 592–605, 1985.

FRIEDMAN, H. S. et al. Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. **The American journal of pathology**, v. 130, n. 3, p. 472–84, 1988.

FRIEDRICH, Carsten et al. Tropomyosin receptor kinase C (TrkC) expression in medulloblastoma: relation to the molecular subgroups and impact on treatment response. **Child's Nervous System**, v. 33, n. 9, p. 1463–1471, 2017.

FUJIKAWA, Hiroyuki et al. High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT induction in colorectal cancer cells. **Journal of Gastroenterology**, v. 47, n. 7, p. 775–784, 2012.

GAJJAR, A. et al. Phase I Study of Vismodegib in Children with Recurrent or Refractory Medulloblastoma: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 22, p. 6305–6312, 2013.

GAJJAR, Amar J.; ROBINSON, Giles W. Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. **Nature reviews. Clinical oncology**, 2014.

GARG, N. et al. CD133+ brain tumor-initiating cells are dependent on STAT3 signaling to drive medulloblastoma recurrence. **Oncogene**, v. 36, n. 5, p. 606–617, 2017.

GAROFALO, Stefano et al. Enriched environment reduces glioma growth through immune and non-immune mechanisms in mice. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6623, 2015.

GARTEL, Andrei L. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. **Leukemia research**, v. 29, n. 11, p. 1237–8, 2005.

GENEVOIS, A. L. et al. Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 3017–3022, 2013.

GENOVESI, L. A. et al. Sleeping Beauty mutagenesis in a mouse medulloblastoma model defines networks that discriminate between human molecular subgroups. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. E4325–E4334, 2013.

GIBERT, B.; MEHLEN, P. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. **Cancer Research**, v. 75, n. 24, p. 5171–5175, 2015.

GIBSON, Paul et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. **Nature**, v. 468, n. 7327, p. 1095–9, 2010.

GILBERTSON, Richard J.; ELLISON, David W. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 341–365, 2008.

GÓMEZ-PALACIO-SCHJETNAN, Andrea; ESCOBAR, Martha L. Neurotrophins and Synaptic Plasticity. In: **Current topics in behavioral neurosciences**. [s.l: s.n.]. v. 15p. 117–136.

GONZALEZ, Andres et al. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. **Cytoskeleton**, v. 73, n. 10, p. 612–628, 2016.

GOODRICH, L. V et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1109–13, 1997.

GÖTZ, Rudolf; SENDTNER, Michael. Cooperation of Tyrosine Kinase Receptor TrkB and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Enhances Migration and Dispersal of Lung Tumor Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100944, 2014.

GRIFFIN, Nathan et al. Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. **Pharmacological Research**, v. 135, p. 12–17, 2018.

GRIMM, Sean A.; CHAMBERLAIN, Marc C. Brainstem Glioma: A Review. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 5, p. 346, 2013.

GROTZER, M. A. et al. TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 18, n. 5, p. 1027–35, 2000.

- GROTZER, M. A. et al. MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. **Clinical cancer research**, v. 7, n. 8, p. 2425–33, 2001.
- GRUBER-OLIPITZ, Mariella et al. Neurotrophin 3/TrkC-regulated proteins in the human medulloblastoma cell line DAOY. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. 3, p. 540–549, 2009.
- GUESSOUS, Fadila; LI, Yunqing; ABOUNADER, Roger. Signaling pathways in medulloblastoma. **Journal of cellular physiology**, v. 217, n. 3, p. 577–83, 2008.
- GUSTAFSON, William Clay et al. Drugging MYCN through an Allosteric Transition in Aurora Kinase A. **Cancer Cell**, v. 26, n. 3, p. 414–427, 2014.
- HAMANOUE, Makoto et al. p75-Mediated NF- $\kappa$ B Activation Enhances the Survival Response of Developing Sensory Neurons to Nerve Growth Factor. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 28–40, 1999.
- HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- HAREL, Liraz et al. CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase. **Neuron**, v. 63, n. 5, p. 585–91, 2009.
- HARTMANN, Wolfgang et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 10, p. 3019–27, 2006.
- HATTEN, Mary E.; ROUSSEL, Martine F. Development and cancer of the cerebellum. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 3, p. 134–42, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3051031&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 nov. 2013.
- HATTON, B. A. et al. The Smo/Smo Model: Hedgehog-Induced Medulloblastoma with 90% Incidence and Leptomeningeal Spread. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1768–1776, 2008.
- HAYAT, M. A. (ED.). **Tumors of the Central Nervous System, Volume 8**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.
- HEINEN, Tiago Elias et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34860–80, 2016.
- HOHN, Andreas et al. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. **Nature**, v. 344, n. 6264, p. 339–341, 1990.
- HSIAO, Susan J. et al. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from TRK Inhibitor Therapy. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 2019.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.
- HUANG, Eric J.; REICHARDT, Louis F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annual review of biochemistry**, v. 72, p. 609–42, 2003.
- HUANG, Huatao et al. APC Mutations in Sporadic Medulloblastomas. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 2, p. 433–437, 2000.

- HUANG, Ssu-Ming et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cell motility in human colon cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 22, n. 3, p. 455–464, 2015.
- INDO, Yasuhiro. Neurobiology of pain, interoception and emotional response: lessons from nerve growth factor-dependent neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 3, p. 375–391, 2014.
- IVANOV, Delyan P. et al. In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 10–25, 2016.
- JABOIN, Jerry et al. Cisplatin-induced cytotoxicity is blocked by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB signal transduction path in neuroblastoma. **Cancer letters**, v. 193, n. 1, p. 109–14, 2003.
- JACOBSEN, P. F.; JENKYN, D. J.; PAPADIMITRIOU, J. M. Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 44, n. 5, p. 472–85, 1985.
- JIN, Haifeng et al. p75 Neurotrophin Receptor Suppresses the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells. **Neoplasia**, v. 9, n. 6, p. 471–478, 2007.
- JOHNSTON, Donna L. et al. Incidence of medulloblastoma in Canadian children. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 120, n. 3, p. 575–579, 2014.
- JOHNSTON, Donna L. et al. Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 3, p. e159–e163, 2018.
- JONES, David T. W. et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 100–5, 2012.
- KALLAY, Laura et al. Modulating native GABAA receptors in medulloblastoma with positive allosteric benzodiazepine-derivatives induces cell death. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 142, n. 3, p. 411–422, 2019.
- KARAR, Jayashree; MAITY, Amit. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 51, 2011.
- KATOH-SEMBA, R. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 34–42, 1997.
- KAWAUCHI, D. et al. Novel MYC-driven medulloblastoma models from multiple embryonic cerebellar cells. **Oncogene**, v. 36, n. 37, p. 5231–5242, 2017.
- KELES, G. E. et al. Nerve growth factor receptor expression in medulloblastomas and the potential role of nerve growth factor as a differentiating agent in medulloblastoma cell lines. **Neurosurgery**, v. 32, n. 2, p. 274–80; discussion 280, 1993.
- KELES, G. E. et al. Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. **Oncology research**, v. 7, n. 10–11, p. 493–503, 1995.
- KENDALL, Sharon et al. Alternative Splicing of the Neurotrophin-3 Gene Gives Rise to Different Transcripts in a Number of Human and Rat Tissues. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 1, p. 41–47, 2001.

- KHANNA, Vishesh et al. Incidence and survival trends for medulloblastomas in the United States from 2001 to 2013. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 135, n. 3, p. 433–441, 2017.
- KHATUA, Soumen et al. Childhood Medulloblastoma: Current Therapies, Emerging Molecular Landscape and Newer Therapeutic Insights. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1045–1058, 2018.
- KHOTSKAYA, Yekaterina B. et al. Targeting TRK family proteins in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 173, p. 58–66, 2017.
- HWAJA, Fatima et al. The p75NTR tumor suppressor induces cell cycle arrest facilitating caspase mediated apoptosis in prostate tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p. 1184–1192, 2006.
- KIM, J. Y. et al. Activation of neurotrophin-3 receptor TrkC induces apoptosis in medulloblastomas. **Cancer research**, v. 59, n. 3, p. 711–9, 1999.
- KIM, James et al. Itraconazole and Arsenic Trioxide Inhibit Hedgehog Pathway Activation and Tumor Growth Associated with Acquired Resistance to Smoothed Antagonists. **Cancer Cell**, v. 23, n. 1, p. 23–34, 2013.
- KIM, Min Soo et al. TrkC promotes survival and growth of leukemia cells through Akt-mTOR-Dependent Up-Regulation of PLK-1 and Twist-1. **Molecules and Cells**, v. 36, n. 2, p. 177–184, 2013.
- KIM, Min Soo et al. Induction of metastatic potential by TrkB via activation of IL6/JAK2/STAT3 and PI3K/AKT signaling in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 40158–71, 2015.
- KIM, Min Soo et al. TrkC promotes colorectal cancer growth and metastasis. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 41319–41333, 2017.
- KLEIN, R. et al. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 189–97, 1991.
- KOBAYASHI, Kenya et al. Nerve Growth Factor Signals as Possible Pathogenic Biomarkers for Perineural Invasion in Adenoid Cystic Carcinoma. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 153, n. 2, p. 218–224, 2015.
- KOKUNAI, T. et al. Expression of nerve growth factor receptor by human primitive neuroectodermal tumors. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 34, n. 8, p. 523–9, 1994.
- KOLOKYTHAS, Antonia et al. Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 68, n. 6, p. 1290–5, 2010.
- KOOL, Marcel et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 473–84, 2012.
- KÜCHLER, Jan et al. p75(NTR) induces apoptosis in medulloblastoma cells. **International journal of cancer**, v. 128, n. 8, p. 1804–12, 2011.
- KUMMAR, Shivaani; LASSEN, Ulrik N. TRK Inhibition: A New Tumor-Agnostic Treatment Strategy. **Targeted Oncology**, v. 13, n. 5, p. 545–556, 2018.

- KUNKELE, A. et al. Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 7, p. 859–869, 2012.
- KUZAN-FISCHER, Claudia Miranda; JURASCHKA, Kyle; TAYLOR, Michael D. Medulloblastoma in the Molecular Era. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 61, n. 3, p. 292, 2018.
- LAETSCH, Theodore W. et al. Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 5, p. 705–714, 2018.
- LAGADEC, Chann et al. Ku86 is important for TrkA overexpression-induced breast cancer cell invasion. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 4, n. 6–7, p. 580–590, 2010.
- LANGE, Allison; LO, Hui-Wen. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. **Cancers**, v. 10, n. 4, p. 105, 2018.
- LANNERING, Birgitta et al. Hyperfractionated Versus Conventional Radiotherapy Followed by Chemotherapy in Standard-Risk Medulloblastoma: Results From the Randomized Multicenter HIT-SIOP PNET 4 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 26, p. 3187–3193, 2012.
- LAWN, Samuel et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 6, p. 3814–24, 2015.
- LEE, Francis S. et al. Activation of Trk neurotrophin receptor signaling by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9096–102, 2002.
- LEE, Junegoo; JIFFAR, Tilahun; KUPFERMAN, Michael E. A novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30246, 2012.
- LEE, Y. et al. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 44, p. 6442–6447, 2007.
- LEIBROCK, Joachim et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. **Nature**, v. 341, n. 6238, p. 149–152, 1989.
- LI, Chunhui et al. Unravelling the Mechanism of TrkA-Induced Cell Death by Macropinocytosis in Medulloblastoma Daoy Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 20, p. 2596–2611, 2016.
- LI, Peng et al. A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 1737–1744, 2013.
- LI, Peng et al. Nestin Mediates Hedgehog Pathway Tumorigenesis HHS Public Access. **Cancer Res**, v. 76, n. 18, p. 5573–5583, 2016.
- LI, Zhijie et al. Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide in vitro and in vivo. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 3, p. 477–83, 2015.
- LIANG, Lisa et al. Characterization of novel biomarkers in selecting for subtype specific



- medulloblastoma phenotypes. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 38881–900, 2015.
- LIANG, Lisa et al. CD271<sup>+</sup> Cells Are Diagnostic and Prognostic and Exhibit Elevated MAPK Activity in SHH Medulloblastoma. **Cancer Research**, v. 78, n. 16, p. 4745–4759, 2018.
- LIM, Shuhui; KALDIS, Philipp. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, 2013.
- LIN, Zhi et al. Structural basis of death domain signaling in the p75 neurotrophin receptor. **eLife**, v. 4, 2015.
- LINDSEY, J. C. et al. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 661–668, 2003.
- LIU, Xianglan et al. Hypothalamic Gene Transfer of BDNF Inhibits Breast Cancer Progression and Metastasis in Middle Age Obese Mice. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 7, p. 1275–1284, 2014.
- LOUIE, E. et al. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. **Oncogene**, v. 32, n. 35, p. 4064–4077, 2013.
- LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.
- LU, Zhimin; XU, Shuichan. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. **IUBMB Life**, v. 58, n. 11, p. 621–631, 2006.
- LUO, Yanxin et al. NTRK3 Is a Potential Tumor Suppressor Gene Commonly Inactivated by Epigenetic Mechanisms in Colorectal Cancer. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 7, p. e1003552, 2013.
- MA, Jun et al. Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. 12, p. 1852–1859, 2008.
- MAISONPIERRE, P. C. et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. **Neuron**, v. 5, n. 4, p. 501–9, 1990.
- MANNING, Brendan D.; TOKER, Alex. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.
- MARCHETTI, D. et al. Neurotrophin receptors and heparanase: a functional axis in human medulloblastoma invasion. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 26, n. 1, p. 5–23, 2007.
- MARIN NAVARRO, Ana et al. Modeling cancer using patient-derived induced pluripotent stem cells to understand development of childhood malignancies. **Cell Death Discovery**, v. 4, n. 1, p. 7, 2018.
- MARSHALL, Glenn M. et al. The prenatal origins of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 4, p. 277–289, 2014.
- MASSIMINO, Maura et al. Childhood medulloblastoma. **Critical reviews in**

**oncology/hematology**, v. 79, n. 1, p. 65–83, 2011.

MCCUBREY, James A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1263–1284, 2007.

MEBRATU, Yohannes; TESFAIGZI, Yohannes. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? **Cell cycle**, v. 8, n. 8, p. 1168–75, 2009.

MELDOLESI, Jacopo. Neurotrophin Trk Receptors: New Targets for Cancer Therapy. In: [s.l: s.n.]. p. 67–79.

MELDOLESI, Jacopo. Neurotrophin receptors in the pathogenesis, diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research**, v. 121, p. 129–137, 2017.

MENG, Lingbin et al. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors (Review). **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 2031–2039, 2018.

MENON, Sunil Sankunny et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica chimica acta**, v. 491, p. 39–45, 2019.

METSIS, M. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 8, p. 1014–1020, 2001.

MILDE, Till et al. HD-MB03 is a novel Group 3 medulloblastoma model demonstrating sensitivity to histone deacetylase inhibitor treatment. **Journal of neuro-oncology**, v. 110, n. 3, p. 335–48, 2012.

MILLARD, Nathan E.; DE BRAGANCA, Kevin C. Medulloblastoma. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n. 12, p. 1341–1353, 2016.

MILLER, F. D.; KAPLAN, D. R. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 8, p. 1045–1053, 2001.

MOLLOY, Niamh H.; READ, Danielle E.; GORMAN, Adrienne M. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 510–30, 2011.

MORFOUACE, Marie et al. Pemetrexed and Gemcitabine as Combination Therapy for the Treatment of Group3 Medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 516–529, 2014.

MORIWAKI, Kazumasa et al. TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 9, n. 38, p. 25225–25243, 2018.

MORRISON, Ludivine Coudière et al. Deconstruction of medulloblastoma cellular heterogeneity reveals differences between the most highly invasive and self-renewing phenotypes. **Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 384–98, 2013.

MOTTOLESE, C.; SZATHMARI, A.; BEURIAT, P. A. Incidence of pineal tumours. A review of the literature. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2–3, p. 65–69, 2015.

MURAGAKI, Y. et al. Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. **The Journal of neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 530–42, 1997.

MURPHY, Michael F. G. et al. Childhood and adult cancers: Contrasts and commonalities.

**Maturitas**, v. 76, n. 1, p. 95–98, 2013.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. **Cancer letters**, v. 169, n. 2, p. 107–14, 2001.

NERADIL, Jakub; VESELSKA, Renata. Nestin as a marker of cancer stem cells. **Cancer Sci**, v. 106, p. 803–811, 2015.

NICOLAE, Claudia M. et al. NFκB regulates p21 expression and controls DNA damage-induced leukemic differentiation. **Oncogene**, v. 37, n. 27, p. 3647–3656, 2018.

NIKOLETOPOULOU, Vassiliki et al. Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. **Nature**, v. 467, n. 7311, p. 59–63, 2010.

NISHIYAMA, Akihiro et al. Foretinib Overcomes Entrectinib Resistance Associated with the *NTRK1* G667C Mutation in *NTRK1* Fusion-Positive Tumor Cells in a Brain Metastasis Model. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 10, p. 2357–2369, 2018.

NÖR, Carolina et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 6, p. 897–901, 2011.

NORRIS, Robin E.; ADAMSON, Peter C. Challenges and opportunities in childhood cancer drug development. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 11, p. 776–782, 2012.

NORTHCOTT, Paul A. et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. **Acta Neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 615–626, 2012.

NORTHCOTT, Paul A. et al. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 6, p. 340–51, 2012.

NORTHCOTT, Paul A. et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 49–56, 2012.

NORTHCOTT, Paul A. et al. Enhancer hijacking activates GF11 family oncogenes in medulloblastoma. **Nature**, v. 511, n. 7510, p. 428–34, 2014.

NORTHCOTT, Paul A. et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. **Nature**, v. 547, n. 7663, p. 311–317, 2017.

NORTHCOTT, Paul A. et al. Medulloblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 11, 2019.

NORTHCOTT, Paul A.; PFISTER, Stefan M.; JONES, David T. W. Next-generation (epi)genetic drivers of childhood brain tumours and the outlook for targeted therapies. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 6, p. e293–e302, 2015.

OH, Sekyung et al. Medulloblastoma-associated DDX3 variant selectively alters the translational response to stress. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 28169–82, 2016.

OHTA, Takashi et al. TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. **Neuropathology**, v. 26, n. 3, p. 170–7, 2006.

OSTROM, Quinn T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central

- Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. suppl\_4, p. iv1–iv86, 2018.
- OTHMAN, Ramadhan T. et al. Overcoming multiple drug resistance mechanisms in medulloblastoma. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, 2014.
- PACKER, Roger J. et al. Phase III Study of Craniospinal Radiation Therapy Followed by Adjuvant Chemotherapy for Newly Diagnosed Average-Risk Medulloblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 25, p. 4202–4208, 2006.
- PACKER, Roger J.; VEZINA, Gilbert. Management of and Prognosis With Medulloblastoma. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 11, p. 1419, 2008.
- PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. **Current opinion in neurobiology**, v. 10, n. 3, p. 392–9, 2000.
- PDQ PEDIATRIC TREATMENT EDITORIAL BOARD, PDQ Pediatric Treatment Editorial. **Childhood Central Nervous System Embryonal Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version**. [s.l.] : National Cancer Institute (US), 2002.
- PEI, Yanxin et al. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 155–67, 2012.
- PEI, Yanxin et al. HDAC and PI3K Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC- Driven Medulloblastoma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 3, p. 311–323, 2016.
- PENAULT-LLORCA, Frédérique; RUDZINSKI, Erin R.; SEPULVEDA, Antonia R. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. **Journal of Clinical Pathology**, p. jclinpath-2018-205679, 2019.
- PEREIRA, D. B.; CHAO, M. V. Neurotrophins and Central Nervous System Development. In: **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 1–19.
- PICCOLO, Maria Teresa; CRISPI, Stefania. **Journal of Cancer Research Updates**. [s.l.] : Lifescience Global, 2012.
- PIETSCH, T. et al. Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. **Cancer research**, v. 54, n. 12, p. 3278–87, 1994.
- PINHEIRO, Kelly V. et al. Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 1, p. 138–139, 2017.
- POLAKOWSKI, Nicholas et al. HBZ stimulates brain-derived neurotrophic factor/TrkB autocrine/paracrine signaling to promote survival of human T-cell leukemia virus type 1-Infected T cells. **Journal of virology**, v. 88, n. 22, p. 13482–94, 2014.
- POLI, Valeria; CAMPOREALE, Annalisa. STAT3-Mediated Metabolic Reprogramming in Cellular Transformation and Implications for Drug Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 121, 2015.
- POLLACK, Ian F.; AGNIHOTRI, Sameer; BRONISCER, Alberto. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. **Journal of neurosurgery. Pediatrics**, v. 23, n. 3, p. 261–273, 2019.
- POLLACK, Ian F.; JAKACKI, Regina I. Childhood brain tumors: epidemiology, current

management and future directions. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 9, p. 495–506, 2011.

POMEROY, S. L. et al. Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. **Journal of neuro-oncology**, v. 35, n. 3, p. 347–52, 1997.

PÖSCHL, Julia et al. Genomic and transcriptomic analyses match medulloblastoma mouse models to their human counterparts. **Acta Neuropathologica**, v. 128, n. 1, p. 123–136, 2014.

PUI, Ching-Hon et al. Challenging issues in pediatric oncology. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 8, n. 9, p. 540–9, 2011.

PULCIANI, Simonetta et al. Oncogenes in solid human tumours. **Nature**, v. 300, n. 5892, p. 539–542, 1982.

QIU, Lihua et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. **International journal of oncology**, v. 29, n. 4, p. 1003–11, 2006.

RADIN, Daniel P.; PATEL, Parth. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? **Anticancer research**, v. 37, n. 8, p. 3983–3990, 2017.

RAMASWAMY, Vijay et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 821–831, 2016.

RAMASWAMY, Vijay; TAYLOR, Michael D. Medulloblastoma: From Myth to Molecular. **Journal of clinical oncology**, v. 35, n. 21, p. 2355–2363, 2017.

RAYBAUD, Charles et al. Posterior fossa tumors in children: developmental anatomy and diagnostic imaging. **Child's Nervous System**, v. 31, n. 10, p. 1661–1676, 2015.

REDMER, T. et al. The role of the cancer stem cell marker CD271 in DNA damage response and drug resistance of melanoma cells. **Oncogenesis**, v. 6, n. 1, p. e291–e291, 2017.

REICHARDT, Louis F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 361, n. 1473, p. 1545–64, 2006.

REMKE, Marc et al. TERT promoter mutations are highly recurrent in SHH subgroup medulloblastoma. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 6, p. 917–929, 2013.

RESTIVO, Gaetana et al. The low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1988, 2017.

RICCI, Alberto et al. TrkB is responsible for EMT transition in malignant pleural effusions derived cultures from adenocarcinoma of the lung. **Cell Cycle**, v. 12, n. 11, p. 1696–1703, 2013.

ROBINSON, Giles et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 43–48, 2012.

ROBINSON, Giles W. et al. Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog–Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 24, p. 2646–2654, 2015.

ROMON, Rodrigue et al. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 157, 2010.

- ROUSSEL, Martine F.; STRIPAY, Jennifer L. Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. **Cerebellum (London, England)**, v. 17, n. 1, p. 28–36, 2018.
- ROUX, P. P. et al. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 25, p. 23097–104, 2001.
- RUBIN, Brian P. et al. Congenital Mesoblastic Nephroma t(12;15) Is Associated with ETV6-NTRK3 Gene Fusion. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1451–1458, 1998.
- RUSERT, Jessica M. et al. SnapShot: Medulloblastoma. **Cancer cell**, v. 26, n. 6, p. 940–940.e1, 2014.
- RUSSO, M. et al. Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 1, p. 36–44, 2016.
- RUTKOWSKI, S. et al. Prognostic Relevance of Clinical and Biological Risk Factors in Childhood Medulloblastoma: Results of Patients Treated in the Prospective Multicenter Trial HIT'91. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 9, p. 2651–2657, 2007.
- RYDÉN, M. et al. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. **British journal of cancer**, v. 74, n. 5, p. 773–9, 1996.
- SABA, Julieta et al. Astrocyte truncated tropomyosin receptor kinase B mediates brain-derived neurotrophic factor anti-apoptotic effect leading to neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, v. 146, n. 6, p. 686–702, 2018.
- SABEL, Magnus et al. Relapse patterns and outcome after relapse in standard risk medulloblastoma: a report from the HIT-SIOP-PNET4 study. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 129, n. 3, p. 515–524, 2016.
- SALETTA, Federica; SENG, Michaela S.; LAU, Loretta M. S. Advances in paediatric cancer treatment. **Translational pediatrics**, v. 3, n. 2, p. 156–82, 2014.
- SALIN, Tuija et al. Structural and Functional Characterization of the Rat Neurotrophin-4 Gene. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 264–275, 1997.
- SANCHEZ-DIAZ, Patricia C. et al. Musashi1 modulates cell proliferation genes in the medulloblastoma cell line Daoy. **BMC Cancer**, v. 8, n. 1, p. 280, 2008.
- SCHMIDT, Anna Laura et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. **Journal of molecular neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 303–10, 2010..
- SCHREIBER, Jane E. et al. Posterior fossa syndrome and long-term neuropsychological outcomes among children treated for medulloblastoma on a multi-institutional, prospective study. **Neuro-oncology**, v. 19, n. 12, p. 1673–1682, 2017.
- SCHWALBE, Edward C. et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. **The Lancet. Oncology**, v. 18, n. 7, p. 958–971, 2017.
- SCLABAS, Guido M. et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 2 Pt 1, p. 440–9, 2005.

- SEGAL, Devorah; KARAJANNIS, Matthias A. Pediatric Brain Tumors: An Update. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 46, n. 7, p. 242–250, 2016.
- SEGAL, R. A. et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12867–71, 1994.
- SHARMA, Tanvi et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. **Acta Neuropathologica**, p. 1–18, 2019.
- SHERR, Charles J. Principles of tumor suppression. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 235–46, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744434>>. Acesso em: 27 jun. 2019.
- SHIH, David J. H. et al. Cytogenetic Prognostication Within Medulloblastoma Subgroups. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 9, p. 886–896, 2014.
- SILVA, Patrícia Benites Gonçalves Da et al. Establishment of a novel human medulloblastoma cell line characterized by highly aggressive stem-like cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1545–1560, 2016.
- SINKEVICIUS, Kerstin W. et al. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 28, p. 10299–304, 2014.
- SKÁLOVÁ, Alena et al. Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Glands, Containing the ETV6-NTRK3 Fusion Gene: A Hitherto Undescribed Salivary Gland Tumor Entity. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 5, p. 1, 2010.
- SKAPER, Stephen D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. **Methods in molecular biology**, v. 846, p. 1–12, 2012.
- SKOWRON, Patryk; RAMASWAMY, Vijay; TAYLOR, Michael D. Genetic and Molecular Alterations Across Medulloblastoma Subgroups. **Journal of molecular medicine**, v. 93, n. 10, p. 1075, 2015.
- SMIT, M. A. et al. A Twist-Snail Axis Critical for TrkB-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Transformation, Anoikis Resistance, and Metastasis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 13, p. 3722–3737, 2009.
- SMITH, Malcolm A.; REAMAN, Gregory H. Remaining challenges in childhood cancer and newer targeted therapeutics. **Pediatric clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 301, 2015.
- SMOLL, Nicolas R.; DRUMMOND, Katharine J. The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 1541–1544, 2012.
- SOFRONIEW, Michael V; HOWE, Charles L.; MOBLEY, William C. Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 1217–1281, 2001.
- SOPPET, D. et al. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 895–903, 1991.
- SOUZA, Bárbara Kunzler et al. Targeting Histone Deacetylase Activity to Arrest Cell Growth

and Promote Neural Differentiation in Ewing Sarcoma. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 9, p. 7242–7258, 2018.

SPECTOR, Logan G.; PANKRATZ, Nathan; MARCOTTE, Erin L. Genetic and Nongenetic Risk Factors for Childhood Cancer. **Pediatric Clinics of North America**, v. 62, n. 1, p. 11–25, 2015.

STELIAROVA-FOUCHER, Eva et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p. 719–731, 2017.

STEWART, Elizabeth et al. The Childhood Solid Tumor Network: A new resource for the developmental biology and oncology research communities. **Developmental Biology**, v. 411, n. 2, p. 287–293, 2016.

STOLERU, Bogdan et al. Tropomyosin-receptor-kinases signaling in the nervous system. **Mædica**, v. 8, n. 1, p. 43–8, 2013.

STRANSKY, Nicolas et al. The landscape of kinase fusions in cancer. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4846, 2014.

SUN, Xiaoming; KAUFMAN, Paul D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 175–186, 2018.

SUN, Yu et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2015.

SWARTLING, F. J. et al. Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma. **Genes & Development**, v. 24, n. 10, p. 1059–1072, 2010.

TABASSUM, Arshia; KHWAJA, Fatima; DJAKIEW, Daniel. The p75NTR tumor suppressor induces caspase-mediated apoptosis in bladder tumor cells. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 47–52, 2003.

TACCONELLI, Antonella et al. TrkA alternative splicing. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 347–360, 2004.

TAJIMA, Y. et al. Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors. **Acta neuropathologica**, v. 95, n. 4, p. 325–32, 1998.

TAN, F.; THIELE, CJ; LI, Z. Neurotrophin signaling in cancer. **Handbook of Neurotoxicity**, 2014.

TANG, Yujie et al. Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. **Nature Medicine**, v. 20, n. 7, p. 732–740, 2014.

TAYLOR, Michael D. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta neuropathologica**, v. 123, n. 4, p. 465–72, 2012.

TEJEDA, Gonzalo S.; DÍAZ-GUERRA, Margarita. Integral Characterization of Defective BDNF/TrkB Signalling in Neurological and Psychiatric Disorders Leads the Way to New Therapies. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

THIELE, Carol J.; LI, Zhijie; MCKEE, Amy E. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 19, p. 5962–7, 2009.



- THOMAZ, Amanda et al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 59, n. 3, p. 326–333, 2016.
- THOMAZ, Amanda et al. Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 698, 2019.
- THOMPSON, Eric M. et al. The clinical importance of medulloblastoma extent of resection: a systematic review. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 139, n. 3, p. 523–539, 2018.
- TIGAN, A. S. et al. CDK6—a review of the past and a glimpse into the future: from cell-cycle control to transcriptional regulation. **Oncogene**, v. 35, n. 24, p. 3083–3091, 2016.
- TIMMUSK, T. et al. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. **Neuron**, v. 10, n. 3, p. 475–89, 1993.
- TRISCOTT, Joanna et al. Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: Polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. **Cancer research**, v. 73, n. 22, p. 6734–44, 2013.
- TSAI, Yi-Fang et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) -TrkB signaling modulates cancer-endothelial cells interaction and affects the outcomes of triple negative breast cancer. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178173, 2017.
- UZIEL, T. et al. The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation. **Genes & Development**, v. 19, n. 22, p. 2656–2667, 2005.
- VAISHNAVI, Aria; LE, Anh T.; DOEBELE, Robert C. TRKking Down an Old Oncogene in a New Era of Targeted Therapy. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 1, p. 25–34, 2015.
- VALDERRAMA, Ximena et al. Zhangfei induces the expression of the nerve growth factor receptor, trkA, in medulloblastoma cells and causes their differentiation or apoptosis. **Journal of neuro-oncology**, v. 91, n. 1, p. 7–17, 2009.
- VAN DER MEER, L. T.; JANSEN, J. H.; VAN DER REIJDEN, B. A. Gfi1 and Gfi1b: key regulators of hematopoiesis. **Leukemia**, v. 24, n. 11, p. 1834–1843, 2010.
- VANHECKE, Elsa et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 7, p. 1741–52, 2011.
- VERBEKE, Stéphanie et al. Overexpression of p75NTR increases survival of breast cancer cells through p21waf1. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 12, p. 1864–1873, 2010.
- VERBEKE, Stéphanie et al. Extracellular cleavage of the p75 neurotrophin receptor is implicated in its pro-survival effect in breast cancer cells. **FEBS Letters**, v. 587, n. 16, p. 2591–2596, 2013.
- VITANZA, Nicholas A.; CAMPEN, Cynthia J.; FISHER, Paul G. Epidemiology of Pediatric Central Nervous System Tumors. In: **Brain Tumors in Children**. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- VLADOIU, Maria C. et al. Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. **Nature**, 2019.

VO, BaoHan T. et al. Inactivation of Ezh2 Upregulates Gfi1 and Drives Aggressive Myc-Driven Group 3 Medulloblastoma. **Cell Reports**, v. 18, n. 12, p. 2907–2917, 2017.

WANG, Jun et al. Medulloblastoma: From Molecular Subgroups to Molecular Targeted Therapies. **Annual Review of Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 207–232, 2018.

WANG, Xiaoji et al. Inhibition of neurotrophin receptor p75 intramembran proteolysis by gamma-secretase inhibitor reduces medulloblastoma spinal metastasis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 403, n. 3–4, p. 264–9, 2010.

WANG, Zongkui et al. GDF11 induces differentiation and apoptosis and inhibits migration of C17.2 neural stem cells via modulating MAPK signaling pathway. **PeerJ**, v. 6, p. e5524, 2018..

WASHIYAMA, K. et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 3, p. 929–40, 1996.

WEST, A. E.; PRUUNSILD, P.; TIMMUSK, T. Neurotrophins: Transcription and Translation. In: **Handbook of experimental pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 220p. 67–100.

WILNE, Sophie et al. Presentation of childhood CNS tumours: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 8, p. 685–695, 2007.

WILNE, Sophie et al. Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours. **European journal of pediatrics**, v. 171, n. 1, p. 87–93, 2012.

WŁODARSKI, Paweł et al. Activation of Akt and Erk pathways in medulloblastoma. **Folia neuropathologica**, v. 44, n. 3, p. 214–20, 2006.

WONG, Rebecca S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

WU, Fujia et al. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 3, p. 252–280, 2017.

WU, Jing; ARMSTRONG, Terri S.; GILBERT, Mark R. Biology and management of ependymomas. **Neuro-oncology**, v. 18, n. 7, p. 902–13, 2016.

WU, Xiaochong et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. **Nature**, v. 482, n. 7386, p. 529–33, 2012.

XIAO, Hui et al. A novel small molecular STAT3 inhibitor, LY5, inhibits cell viability, cell migration, and angiogenesis in medulloblastoma cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 6, p. 3418–29, 2015.

XIAO, R. et al. Environmental and Genetic Activation of Hypothalamic BDNF Modulates T-cell Immunity to Exert an Anticancer Phenotype. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 6, p. 488–497, 2016.

XING, J. et al. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 4, p. 1946–55, 1998.

XU, Jingying et al. Pediatric brain tumor cell lines. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116,

n. 2, p. 218–24, 2015.

YAMADA, M. et al. [Establishment and biological characterization of human medulloblastoma cell lines]. **Brain and nerve**, v. 41, n. 7, p. 695–702, 1989.

YAMAMOTO, M. et al. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. **Neurochemical research**, v. 21, n. 8, p. 929–38, 1996.

YIN, B. et al. The TrkB+ cancer stem cells contribute to post-chemotherapy recurrence of triple-negative breast cancers in an orthotopic mouse model. **Oncogene**, v. 34, n. 6, p. 761–70, 2015.

ZAHAVI, Eitan Erez et al. The receptor tyrosine kinase TrkB signals without dimerization at the plasma membrane. **Science Signaling**, v. 11, n. 529, p. eaao4006, 2018.

ZHANG, Chunze et al. The prognostic value of over-expressed TrkB in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 59, p. 99394–99401, 2017.

ZHANG, Ji-Hong et al. [Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells]. **Chinese journal of contemporary pediatrics**, v. 10, n. 1, p. 47–50, 2008.

**CURRICULUM VITAE**  
**AMANDA CRISTINA GODOT THOMAZ**  
**[amandacgthomaz@gmail.com](mailto:amandacgthomaz@gmail.com)**

---

**EDUCATION**

**Ph.D., Cellular and Molecular Biology** **2015 – Aug 2019**

*Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brazil*

Thesis: The neurotrophin signalling in medulloblastoma: Effects of the selective TrkB inhibition.

Supervisor: Prof. Rafael Roesler.

Co-supervisor: Prof. Michael D. Taylor

(University of Toronto and The Hospital for Sick Children).

**M.Sc., Medicine: Medical Sciences** **2014 - 2015**

*Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brazil*

Dissertation: Anticancer activity of TrkB inhibition in medulloblastoma cells.

Supervisor: Prof. Rafael Roesler.

**B.Sc. (Hons), Pharmacy** **2009 -2014**

*Federal University of Pará (UFPA) Belém, PA, Brazil*

Bachelor dissertation: Molecular detection of *M. leprae* in lymph samples of index cases and household contacts.

Supervisor: Prof. Claudio Guedes Salgado.

## **WORK/RESEARCH EXPERIENCE**

### **Senior Demonstrator**

**2019**

*University of Central Lancashire (UCLan) Preston, Lancashire, UK*

#### ***Teaching support team***

- Demonstrating and training the students for the development of their projects and assignments.

### **Visiting Researcher**

**2018 - 2019**

*University of Central Lancashire (UCLan) Preston, Lancashire, UK*

Collaborative project between UCLan and UFRGS within the Brain Tumour North West (BTNW) framework:

- Development of collaborative efforts between the research groups.
- Experimental procedures of orthotopic glioblastoma mouse model.

Analysis of transgenic mice:

- Behavioural phenotyping.

### **Graduate Research Assistant**

**2014 - 2019**

*Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brazil*

Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Centre

Cellular, molecular and *in vivo* studies of TrkB receptor in brain tumours:

- Analysis of the potential effects of TrkB inhibition in medulloblastoma cells using flow-cytometry, western blot, real time PCR (qPCR), cellular microscopy images and *in vivo* xenografts in nude mice to determine the cellular and tumour growth outcomes after pharmacologic intervention with a selective TrkB antagonist.
- Investigation of the functional interaction between BDNF/TrkB and EGFR in glioblastoma cells, *in vivo* xenografts in nude mice and primary tumour cell isolation.
- Elaboration of experimental design, data analysis, organisation, manuscript writing and assistance in the preparation of grant applications.

- Training of new lab members.

**Undergraduate Research Assistant**

**2011 - 2013**

*Federal University of Pará (UFPA) Belém, PA, Brazil*

Laboratory of Dermatology and Immunology, Department of Biology

- Characterization of the molecular detection of *M. leprae* in lymph samples of index cases and household contacts.
- Analyses of cytokine expression profile in murine cell culture of macrophages and co-culture with lymphocytes challenged with experimental anti-inflammatory molecule.
- Performing day to day activities of the laboratory including organisation, preparation of reagents and collect blood and lymph samples from leprosy patients.
- Performing interviews and collecting primary data by performing interviews and gathering clinical and socio-economic indicators to deliver reports based on the health and wellbeing of leprosy patients

**Undergraduate Research Assistant**

**2009– 2011**

*Federal University of Pará (UFPA) Belém, PA, Brazil* Laboratory of Microbiology and Immunology, Department of Pharmacy.

- Evaluation of the antifungal potential of an extract of propolis obtained with edible vegetable oil (ODEP) tested *in vitro* against *Candida albicans* strains.
- Performing basic laboratory activities including organisation, preparation of reagents and growth medium.

## **SKILLS and TECHNIQUES**

- Mammalian cell culture: Isolation of primary immune cells from murine tissues (lymphocytes and macrophages), whole blood and tumour cells.
- Molecular biology techniques: ELISA, western blot, immunohistochemistry, RNA isolation, RT-PCR and qPCR.
- Flow cytometry analysis.
- Drug screening.
- *In vivo* tumour xenograft mouse models (orthotopic and heterotopic).
- *In vivo* tumour-targeted fluorescence imaging.
- Behavioural analysis: Including motor development and locomotion, stereotypies, anxiety and analysis of sociability.
- Analysis of transcriptome data sets using GEO2R and R2 platforms.
- Scientific writing, including articles and grant proposals.
- Training of new students in laboratory techniques.

## **FURTHER TRAINING**

- E1/L & PIL AB (Rodent) & C (Rodent) Personal Licensee training, 2018. Charles River IS UK.
- Course in Cancer Signalling, 2015. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Course in Experimental Research Methods, 2014. Experimental Research Centre, Clinical Hospital (CPEHCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.
- Course in Biochemistry and Molecular Biology, 2013. Sao Paulo University, Ribeirao Preto, SP, Brazil.
- Realtime PCR training, 2013. Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

## **HONORS**

**Honorable mention; 1st place in work presentation:** Molecular detection of *M. leprae* in lymph samples of index cases and household contacts. College of medicine, University of São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brazil), 2013.

**Honorable mention; 1st place in work presentation:** Antifungal activity of an oil extract of propolis. XXVI Annual Meeting of the Federation of Societies for Experimental Biology – FeSBE (Águas de Lindóia, SP, Brazil), 2011.

## **PEER-REVIEWED PUBLICATIONS**

- **Thomaz A**, Pinheiro KV, Souza BK, Gregianin L, Brunetto AL, Brunetto AT, de Farias CB, Jaeger M, Ramaswamy V, Nör C, Taylor MD, Roesler R. Antitumor Activities and Cellular Changes Induced by TrkB Inhibition in Medulloblastoma. *Front. Pharmacol.*, v. 10, p. 698, 2019. doi:10.3389/FPHAR.2019.00698.
- Buendia M, Pinheiro KV, **Thomaz A**, Freire NG, Brunetto AT, Schwartzmann G, Jaeger M, de Farias CB, Roesler R. Combined Inhibition of HDAC and EGFR Reduces Viability and Proliferation and Enhances STAT3 mRNA



Expression in Glioblastoma Cells. *J Mol Neurosci*. 2019 Mar 18. doi: 10.1007/s12031-019-01280-5.

- Pinheiro KV, Alves C, Buendia M, Gil MS, **Thomaz A**, Schwartzmann G, de Farias CB, Roesler R, Bowman RL, Wang Q, Carro A, Verhaak RG, Squatrito M. Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. *Neuro Oncol*. 2017 Jan;19(1):138-139.
- **Thomaz A**, Jaeger M, Buendia M, Bambini-Junior V, Gregianin LJ, Brunetto AL, Brunetto AT, de Farias CB, Roesler R. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci*. 2016 Jul;59(3):326-33.
- Finger D, Machado CS, Torres YR, Quináia SP; **Thomaz A**; Gobbo AR, Monteiro MC, Ferreira AG, Sawaya ACHF, Eberlin MN. Antifungal Bioassay-Guided Fractionation of an Oil Extract of Propolis. *Journal of Food Quality*, v. 3 Sep, 2013.

### **CONFERENCE ABSTRACTS/PRESENTATIONS**

**Total:** 14

**Most Recent:** Brazilian Congress of Pediatric Oncology. October, 2018 Foz do Iguaçu, Brazil. Title: TrkB inhibition in preclinical models of medulloblastoma. Authors: **Thomaz A**; Pinheiro KV; Souza BK; Freire NH; Jaeger M; Brunetto AL; de Farias CB; Roesler, R.

### **RESEARCH INTERESTS**

Cancer biology

Immunology

Targeted therapy

Bioinformatics