

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE BDNF E QUIMIOTERAPIA EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO (OVCAR-3)**

Dissertação de mestrado

Gabriel Marques dos Anjos

Porto Alegre

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE BDNF E QUIMIOTERAPIA EM
CÉLULAS DE CÂNCER DE OVÁRIO (OVCAR-3)**

GABRIEL MARQUES DOS ANJOS

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito
para obtenção do título de Mestre

Dissertação de mestrado

Porto Alegre

2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

dos Anjos, Gabriel Marques
Avaliação da combinação de BDNF e quimioterapia em
células de câncer de ovário (OVCAR-3) / Gabriel
Marques dos Anjos. -- 2012.
56 f.

Orientador: Gilberto Schwartzmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Câncer de ovário. 2. BDNF. 3. Quimioterapia. I.
Schwartzmann, Gilberto, orient. II. Título.

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

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional e compreensão nos meus momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

A todos amigos do Laboratório de Pesquisas em Câncer, pelo apoio e aprendizado que tive durante esse caminhada.

À Vera,

pelo suporte em todas as etapas deste projeto.

Às amigas Bruna e Andrea,

pelo incentivo e apoio nos últimos dois anos.

Ao Prof. Rafael e Prof. Gilberto,

pela confiança e compreensão nos momentos difíceis.

À Carol,

por toda a ajuda que eu poderia imaginar receber e apoio em todos os momentos, especialmente os mais difíceis. Nunca conseguirei agradecer por tudo, motivo pelo qual serei sempre grato.

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	8
Lista de figuras	9
Lista de abreviaturas	10
1. Introdução	12
2. Revisão da literatura	13
2.1. Epidemiologia do câncer de ovário	13
2.2. Tratamento citotóxico atualmente	13
2.3. Biologia molecular no câncer de ovário	14
2.4. A importância do TrkB	15
2.5. Caracterização das drogas em estudo	20
2.5.1. Etoposídeo	20
2.5.2. Doxorubicina	21
2.5.3. Cisplatina	21
2.5.4. Paclitaxel	22
2.6. Caracterização da linhagem celular OVCAR-3	22
3. Justificativa	23
3.1. Necessidade de novos tratamentos	23
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo principal	24
4.2. Objetivos secundários	25
5. Referências	26
6. Artigo em inglês	35
7. Considerações finais	53
8. Anexo	55

RESUMO

Introdução: O câncer de ovário é o mais prevalente e letal câncer ginecológico. A quimioterapia é um componente importante do tratamento sistêmico clássico com uma combinação de um agente platinado e um taxano, usualmente. Invariavelmente, câncer de ovário avançado torna-se resistente à quimioterapia.

Objetivos: Com base em dados recentes que demonstram um possível papel das neurotrofinas na regulação de quimiosensibilidade, decidimos estudar o impacto do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) sobre a atividade antitumoral de diferentes classes de agentes antineoplásicos.

Métodos: Para avaliar um possível efeito sinérgico entre BDNF e diferentes combinações de tratamento para câncer de ovário, as células foram expostas a cisplatina, etoposídeo, doxorubicina e paclitaxel concomitantemente com BDNF durante 48 horas. Administração sequencial de BDNF e quimioterapia foi realizada para avaliar o potencial de BDNF em modificar a resposta ao tratamento quimioterápico dependendo de qual agente é aplicado em primeiro lugar.

Resultados: Houve uma redução da viabilidade de células OVCAR-3 quando expostas a cisplatina, doxorubicina e etoposídeo concomitantemente com BDNF em 61,18% (SE±1.12, p=0.002), 38,96% (SE±1.08, p=0.001) e 49,63% (SE±1.17, p<0.001), respectivamente. BDNF também reduziu significativamente o efeito do paclitaxel e doxorubicina quando usado antes da quimioterapia com uma redução de efeito de 53,46% (SE±3.48, p=0.001) e 48,25% (SE±1.25, p=0.018), respectivamente. Além disso, o BDNF utilizado sequencialmente à doxorubicina foi capaz de reverter a quimiotoxicidade deste agente em 37,77% (SE±1.25, p=0.018).

Conclusão: Utilizando a linhagem celular de câncer de ovário (OVCAR-3), BDNF exibiu um efeito sinérgico quando administrado concomitantemente com os agentes citotóxicos doxorubicina, etoposídeo e cisplatina. Observamos também um efeito protetor de BDNF quando aplicado 24 horas antes de doxorubicina e paclitaxel. Notavelmente, quando BDNF foi administrado após a exposição a agentes antineoplásicos, uma reversão da citotoxicidade foi observada apenas para a doxorubicina e não para os outros agentes.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de ovário, OVCAR-3, BDNF, doxorubicina, paclitaxel, cisplatina, etoposídeo.

ABSTRACT

Background: Ovarian cancer is the most prevalent and lethal of gynecological malignancies. Chemotherapy is an important component of the systemic treatment with a combination of a platinum complex and a taxane one of the classic treatments. Invariably, advanced ovarian cancer becomes resistant to chemotherapy.

Objective: Based on recent data demonstrating a possible role of neurotrophins regulating chemosensitivity, we decided to study the impact of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the antitumor activity of different classes of antineoplastic agents.

Methods: Primarily, to evaluate a possible synergistic effect of BDNF and different ovarian cancer treatments combination, cells were exposed to cisplatin, etoposide, doxorubicin and paclitaxel concomitantly with BDNF for 48 hours. Sequential administration of BDNF and any of the agents was carried out to evaluate if BDNF has the potential of enhancing or protecting cells from the effects of treatment depending of each agent is applied first.

Results: There were a reduction in viability of OVCAR-3 cells exposed to cisplatin, doxorubicin and etoposide when used concomitantly with BDNF in 61.18% (SE 1.12, $p=0.002$), 38.96% (SE 1.08, $p=0.001$) and 49.63% (SE 1.17, $p<0.001$) respectively. We also found that BDNF reduced significantly the effect of paclitaxel and doxorubicin when used before chemotherapy with a reduction of effect of 53.46% (SE \pm 3.48, $p=0.001$) and 48.25% (SE \pm 1.25, $p=0.018$), respectively. Furthermore, BDNF used sequentially to doxorubicin was able to reverse the chemotoxicity of this agent in 37.77% (SE 1.25, $p=0.018$).

Conclusion: In conclusion, using the human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3, BDNF exhibited a synergistic effect when administered concomitantly to the cytotoxic agents doxorubicin, etoposide and cisplatin. We have also observed a protective effect of BDNF when applied 24 hours before doxorubicin and paclitaxel. Notably, when BDNF was administered after the exposure to the antineoplastic agents, a reversal of cytotoxicity was observed only for doxorubicin and not for the other agents.

KEYWORDS: ovarian cancer, OVCAR-3, paclitaxel, doxorubicin, etoposide, cisplatin, BDNF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	16
Figura 2	17

LISTA DE ABREVIATURAS

EGFR: epidermal growth factor receptor - (receptor do fator de crescimento epidérmico)

mTOR: mammalian target of rapamycin - (alvo da rapamicina em mamíferos)

VEGF: vascular endothelial growth factor - (fator de crescimento endotelial)

BDNF: brain-derived neurotrophic factor - (fator neurotrófico derivado do cérebro)

TrkB: tropomyosin-related kinase - (cinase relacionada à tropomiosina B)

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase - (Poli(ADP-ribose) Polimerase)

Kras: rat sarcoma virus - (vírus do sarcoma de rato)

PTEN: phosphatase and tensin homolog - (homólogo da fosfatase e tensina)

HER2: human epidermal growth factor receptor 2 - (receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2)

BAX: Bcl-2-associated X protein - (proteína X associada ao Bcl-2)

FGF: Fibroblast Growth factor (fator de crescimento de fibroblasto)

PDGF: Platelet derived Growth factor (fator de crescimento derivado de plaquetas)

NTF: Neurotrophin (neurotrofina)

EGF: Epidermal Growth Factor (Fator de crescimento epidérmico)

NGF: Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Neuronal)

NT3: Neurotrophin 3 (Neurotrofina 3)

NT4/5: Neurotrophin 4 and 5 (Neurotrofina 4 e 5)

TrkA(tropomyosin-related kinase cinase relacionada à tropomiosina A

TrkC(tropomyosin-related kinase cinase relacionada à tropomiosina C

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervosa periférico

TNF: Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)

p75NTR: p75 neurotrophin receptor (receptor de neurotrofinas p75)

PI3K: Phosphoinositide 3-kinases (Fosfatidilinositor 3 cinase)

PKB: Protein Kinase B (Proteína cinase B)

MEK: extracellular signal-regulated kinases - (cinase regulada por sinal extracelular)

ERK: Extracellular Signal-Regulated kinases (Cinase reguladora de sinal extracelular)

MAPK: Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases (Proteína Cinase mitógeno-Ativada)

Rap1: Ras-related protein 1 - (Proteína 1 relacionada à Ras)

eIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E - (fator-4A de iniciação eucariótico)

Bad: Bcl-2-associated death promoter (promotor de morte associado à bcl-2)

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta - (glicogênio sintase cinase 3)

NF κ B: nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)

JNK1: c-Jun N-terminal kinase (cinase c-Jun N-terminal)

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 (proteína 2 do linfoma de células B)

1. Introdução

Ao longo dos últimos anos, uma mudança de paradigma vem ocorrendo na área da oncologia. O foco no desenvolvimento de novas drogas antitumorais é o uso de terapias alvo, visando o controle de vias ativas na gênese tumoral. Atualmente existe mais de 4000 drogas em desenvolvimento através de estudos de fase I a IV no mundo e a uma parte importante delas pertence à classe de terapias alvo. [1] Esta linha de pesquisa é proveniente da melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento tumoral. Algumas drogas desenvolvidas através deste modelo já se mostraram efetivas inclusive em estudos clínicos e estão incorporadas na prática clínica atual como o uso de bloqueadores de EGFR, bloqueadores de mTOR e antagonistas de VEGF.

Nossa proposta é progredir no entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelo caráter agressivo e de difícil tratamento envolvido na neoplasia de ovário, além de sua interação com quimioterapias de diferentes mecanismos de ação já usadas na prática clínica.

A via do BDNF/TrkB cresce em importância nos últimos anos, principalmente pela demonstração de efeitos benéficos e aditivos com quimioterapia da manipulação desta via molecular.

2. Revisão da literatura

2.1. Epidemiologia do Câncer de ovário

O câncer de ovário não define apenas uma doença, essa classificação inclui tumores epiteliais, de células germinativas ou de origem no cordão estromal.

Os tumores epiteliais são os mais comuns sendo responsáveis por 90% dos casos e ocorrem tipicamente em mulheres pós menopáusicas. Os desafios para o tratamento dessas doenças é muito grande porque a maior parte dos casos já são descobertos com doença avançada.

O câncer de ovário é uma neoplasia feminina de baixa incidência, estimada em torno de 2-3% dos cânceres femininos. Entretanto, possui alta mortalidade já que cerca de 75% dos diagnósticos são realizados na fase avançada conferindo um grande desafio na prática clínica. Estimam-se 6190 novos casos para 2012 com uma mortalidade estimada em aproximadamente 3000 casos no Brasil. [2] Ou seja, atualmente, o câncer de ovário é um tumor ginecológico de difícil diagnóstico e frequentemente com uma chance de cura muito baixa.

O risco de desenvolvimento de câncer de ovário epitelial esporádico ao longo da vida é aproximadamente 1,7%, embora em pacientes com predisposição familiar esse risco possa alcançar até 40% (2). Nas últimas décadas, uma melhora estatisticamente significativa vem ocorrendo, com uma taxa de sobrevida de 36% em 5 anos em 1977 e 45% em 2002. Esta melhora provavelmente é decorrente de quimioterapia mais efetiva e avanços nas técnicas cirúrgicas de *debulking*. [3]

2.2. Tratamento citotóxico atualmente

O tratamento primário dessas pacientes consiste em uma combinação de carboplatina e um taxano, usualmente. Porém, metade dos pacientes apresentam recidiva após cerca de 12 meses do primeiro tratamento.[4] Em pacientes com doença recorrente, a primeira abordagem para o tratamento destes casos envolve a identificação de pacientes entre os considerados resistentes à platina (recidiva em menos de 6 meses do último tratamento com agente platinado) ou entre os considerados sensíveis à platina (recidiva após 6 meses do último tratamento).

Até recentemente, o retratamento com o mesmo esquema utilizado inicialmente era considerado o tratamento padrão para pacientes com neoplasia sensível à platina, porém recentemente se mostrou que carboplatina associado com um antracíclico de nova geração, doxorubicina lipossomal peguilada, foi superior ao retratamento com as mesmas medicações da primeira linha. [5]

Nas pacientes com doença resistente à platina na recidiva, existem diversas opções de tratamento como uso isolado de doxorubicina lipossomal peguilada, etoposídeo e combinação de quimioterapia com terapia alvo como bevacizumabe, um antagonista de VEGF.[6] Porém, o intervalo livre de doença é progressivamente menor a cada linha de tratamento.[7]

Diversas linhas de pesquisa avaliam o uso de terapias alvo no combate ao câncer de ovário resistente à quimioterapia como o uso de epotilonas (inibidor de microtúbulos), cediranib (um inibidor do receptor de VEGF) e inibidores da Poli(ADP-ribose) polimerase (PARP). [8-10]

2.3. Biologia molecular no câncer de ovário

Muitas alterações moleculares tem sido descritas em pacientes com neoplasia epitelial de ovário. Análise citogenética pode revelar anormalidades complexas que incluem deleções de 3p, 6q, 8p, 10q, por exemplo. A mutação no protooncogene p53 ocorre em mais de 50% dos casos, principalmente nos casos mais agressivos enquanto mutações em B-raf, Kras, PTEN ou beta-catenina podem ser vistas em tumores de comportamento mais indolente. [11] Já a amplificação de HER2 é vista em aproximadamente 8% dos casos, conferindo pior prognóstico [12]. Podem ocorrer também a hiperexpressão de BAX sendo associada com quimiorresponsividade e melhor prognóstico, a expressão de proteínas de adesão de superfície como CD44H e B-1 integrinas que são mediadoras da propagação transperitoneal do tumor e a expressão de VEGF, uma citocina angiogênica, que confere pior prognóstico quando possui valores elevados em aferições séricas. [13-15] Os receptores de tirosina quinase, tais como o TrkB, também são encontrados em câncer de ovário e parecem ter um papel importante na supressão da apoptose, estando também associados com pior prognóstico, como será discutido na sequência. [16-21]

2.4. Importância do TrkB

O tratamento ideal das neoplasias envolve a inibição seletiva apenas das vias responsáveis pela sobrevivência das células neoplásicas sem interferência com as vias de sinalização de células normais. [22] Para tanto é necessário a identificação de vias ativas apenas no tecido tumoral, preferencialmente.

Existe uma série de fatores de crescimento responsáveis pela ativação de potenciais vias de sobrevivência celular como fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), neurotrofinas (NTF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e interleucinas.

As neurotrofinas são bem caracterizadas no campo da neurobiologia e são responsáveis pelo desenvolvimento normal do SNC, mas também estão envolvidas em mudanças na morfologia celular de uma variedade de tecidos não tumorais. [23, 24]

A família de neurotrofinas, tais como NGF, BDNF, NT3 e NT4/5, se ligam com maior afinidade a receptores específicos. TrkA para NGF, TrkB para BDNF e NT4/5 e TrkC para NT3. O TrkB (receptor tirosina quinase de neurotrofinas) foi isolado e sequenciados de diversas espécies de mamíferos. A ativação do receptor com seu ligante exerce importante efeito na regulação da sobrevivência, estrutura e funcionamento dos neurônios do SNC e SNP. [25-28]

As neurotrofinas exercem seu papel através de várias cascatas intracelulares que são iniciadas após ligação a duas classes de receptores de superfície celular, um receptor tirosina quinase e um membro da família de receptores do TNF, Trk e p75NTR respectivamente. Deste modo, sendo capazes de modular diversos efeitos biológicos e por vezes com efeitos opostos. [29]

As neurotrofinas são sintetizadas na forma de pró-neurotrofinas que sofrem um processo de proteólise para geração de neurotrofinas maduras. Estas pró-neurotrofinas se ligam ao p75NTR com maior afinidades que as neurotrofinas. Ou seja, o p75NTR pode se ligar a todas as neurotrofinas em suas formas precursoras enquanto os receptores Trk são ligados seletivamente pelas neurotrofinas maduras. Ou seja, o processamento das pró-neurotrofinas pode possuir um papel estimulador da sobrevivência celular enquanto sua redução tende a estimular as vias de morte celular pelo acúmulo de pró-neurotrofinas e consequente maior ativação de p75NTR.[30]

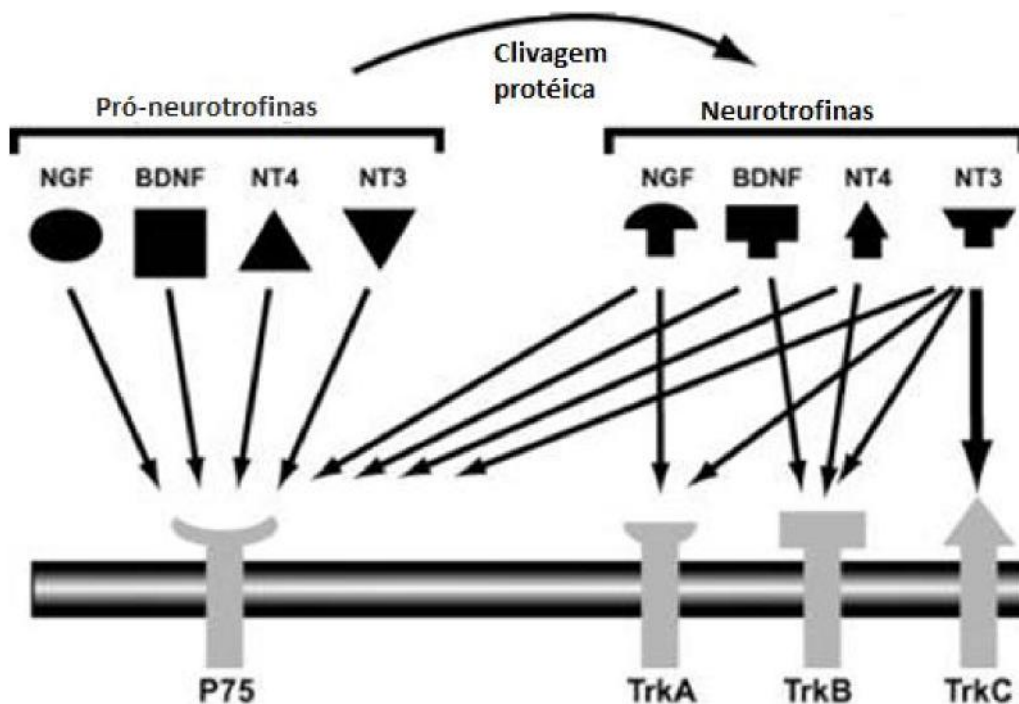


Figura 1. Neurotrofinas e seus receptores. Pró-neurotrofinas se ligam com alta afinidade ao receptor p75NTR enquanto as neurotrofinas processadas se ligam com alta afinidade aos seus receptores específicos.(Adaptado de Segal et al, 2003)[30]

O mecanismo de ação exato não é conhecido, mas é provável que PI3K/PKB e MEK-ERK são as vias ativadas tendo importante papel no crescimento tumoral e metastatização com potencial reversão deste processo com o uso de inibidores dessas vias. [20, 31-41]

A ativação da via Ras/MAPK é essencial para diferenciação neuronal e de células de neuroblastoma. Várias vias podem estar envolvidas na ativação de Ras a partir dos receptores Trk, sendo a maioria delas secundárias à fosforilação destes receptores. As várias MAPK ativadas através de Ras e Rap1 possuem diferentes alvos intracelulares que são responsáveis pela transcrição gênica e consequentemente diferentes respostas biológicas.[42]

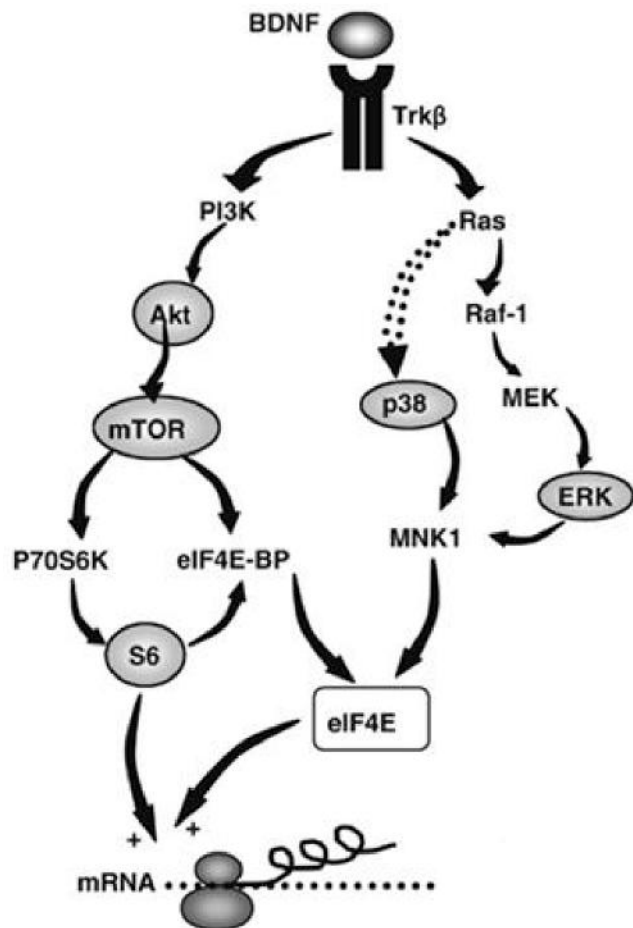


Figura 2. Vias de sinalização do PI3K/Akt/mTOR/S6 e MAPK ativadas através de BDNF/TrkB levando ao aumento da síntese proteica em células neurais. A fosforilação de PI3K pode causar a fosforilação e ativação de Akt. Por sua vez, Akt tem como um de seus alvos a proteína ribossômica S6 que participa do complexo 40S para translação. A via de MAPK também é ativada obtendo seu efeito através da ação direta de eIF4E na estimulação da síntese proteica. (Adaptado de Robinet et al, 2009) [42]

Já o recrutamento de PI3K através de receptores Trk é importante para a sinalização celular responsável pela sobrevivência celular através de segundos mensageiros que ativam Akt (também conhecido como PKB). Substratos de Akt incluem proteínas envolvidas em diferentes passos das vias de morte celular, como Bad, Caspase-9, GSK3 β e NF- κ B.

Em contrapartida, a ativação de p75NTR tem sido relacionada à morte celular através da ativação da via associada à JNK1 e a via do p53, porém o receptor p75NTR também tem sido associado com a capacidade de promover o crescimento neuronal através da ativação do fator de transcrição NF-κB após interação com NGF. Deste modo, o balanço entre a promoção do crescimento e morte celular parece estar associado, pelo menos em parte, ao equilíbrio entre as diferentes moléculas ativas após fosforilação dos receptores.

Por exemplo, estudos avaliando linhagens de neuroblastomas sugerem dois efeitos diversos dependendo da via inibida. A inibição de PI3K/PKB parece diminuir a sobrevivência de células progenitoras corticais e melhorar a habilidade de quimioterapia citotóxica em causar morte celular. Já a inibição de MEK-ERK bloqueia a geração de novos neurônios. [43, 44] Esses dados sugerem que a sobrevivência neuronal é mediada por PI3K e em grau menor por MEK, enquanto o crescimento celular depende tanto de MEK como de PI3K. [45]

As neurotrofinas, portanto, possuem uma grande variedade de ações possíveis e esta complexidade de respostas são dependentes do tipo de receptor ativado, da neurotrofina ligante e das moléculas de sinalização estimuladas assim como da localização e momento da estimulação. [30]

O BDNF possui papel importante na proliferação, sobrevivência e diferenciação de neurônios no SNC e no SNP, além disso, acredita-se que seja responsável pelo crescimento celular neoplásico e pela capacidade de metastatização destas células. [27, 39, 46-52]

Do mesmo modo, há evidência de relação entre os níveis de BDNF no tecido tumoral e pior prognóstico. Além da demonstração que os tecidos tumorais expressam níveis mais altos de BDNF em comparação com tecidos normais adjacentes em tumores de cólon. [49, 53, 54]

Há evidência crescente que TrkB e BDNF estão frequentemente superexpressos nas neoplasias humanas, incluindo câncer de pâncreas, próstata, tumor de Wilms e neuroblastomas, especialmente os de pior prognóstico.[55-60].

Em neuroblastomas, níveis elevados de TrkA e TrkC estão associados com melhor prognóstico, enquanto TrkB e BDNF estão preferencialmente expressos em tumores mais agressivos, além de poderem representar um sistema autócrino capaz de promover crescimento tumoral, invasão e metástases. Além disso, a sinalização aumentada mediada por BDNF/TrkB pode promover resistência à quimioterapia por mediação de PI3K e Akt. [20, 61]

Como exemplo, um estudo avaliando células de neuroblastoma demonstrou o potencial de BDNF em evitar a morte celular induzida por etoposídeo *in vitro* e também demonstrou que células com alta expressão de TrkB são menos sensíveis à etoposídeo em modelos animais em relação à células com baixa expressão desse receptor. [62]

Já em relação ao meduloblastoma, tumor neural mais comum na infância, foi demonstrada associação entre TrkB e sobrevivência celular, apesar de que em algumas linhagens a estimulação de BDNF/TrkB possa também inibir o crescimento celular do meduloblastoma. [63]

Em adenocarcinoma de pulmão foi demonstrada expressão de TrkB e que o tratamento de células A549 com BDNF estimulou a via Akt enquanto o inibidor de Trk K252a induziu a apoptose destas células. [64]

Como exemplo da importância desta via para diferentes tipos de neoplasia, BDNF e TrkB estão superexpressos em espécimes de tumores de bexiga (10) com evidência de aumento da proliferação e sobrevivência celular com estímulo de BDNF. Em contrapartida, há evidência de citotoxicidade e menor capacidade de migração e invasão com uso de anticorpo anti-TrkB específico. [65]

Em relação ao câncer de mama, a expressão de TrkB está associada com pior prognóstico e risco de morte por câncer [66]. Além disso, o BDNF está associado com resistência à apoptose enquanto o uso de anticorpo anti-BDNF reduziu o crescimento tumoral em camundongos. [67] A expressão de TrkB e BDNF também está elevada em linhagens de neoplasias de cabeça e pescoço e de câncer escamoso de cérvix uterina [68].

Outros tumores apresentam aumento da expressão de TrkB e pode estar associado a um pior prognóstico como o tumor de Wilms, câncer de ovário e adenocarcinoma de pâncreas [20].

Recentemente foi demonstrado que TrkB e BDNF foram expressos em amostras de adenocarcinoma colorretal esporádico e que os níveis de BDNF estão aumentados em amostras de tumor em relação ao tecido adjacente normal. Neste estudo, o tratamento de células humanas de HT-29 com BDNF recombinante preveniu efeitos antiproliferativos de RC-3095, um peptídeo sintético com atividade antitumoral por bloqueio do receptor dos peptídeos liberadores de gastrina. Em paralelo, o uso de k252a resultou numa redução da proliferação. Além disso, os níveis de secreção de BDNF aumentaram em resposta ao tratamento com RC-3095 e este aumento apresentou associação com resistência aos efeitos antiproliferativos esperados. Estes achados sugerem que o aumento nos níveis de

BDNF/TrkB podem ter um papel importante no desenvolvimento de resistência ao tratamento de câncer colorretal com agentes que possuem como alvo outros receptores de fatores de crescimento. [53]

O TrkB também tem sido demonstrado capaz de induzir apoptose através de um mecanismo dependente de PI3K/Akt em células epiteliais não malignas [20]. Recentemente, demonstrou-se a possibilidade de células endoteliais com hiperexpressão de BDNF contribuírem para angiogênese tumoral. [69]

Em conjunto, essas evidências sugerem que moléculas que atuem como antagonistas de TrkB ou anticorpos monoclonais contra BDNF ou TrkB possam ser uma nova e importante alternativa de tratamento para vários tipos de câncer. Apesar disto, um melhor entendimento do papel de BDNF/TrkB nas neoplasias se faz necessário.

BDNF também demonstrou possuir efeitos protetores em diversos modelos neurais [70, 71]. Possui papel na proteção de morte celular induzida por axotomia [72], apoptose induzida por óxido nítrico [73] e lesão induzida por insultos metabólicos e excitotóxicos. [74]

Portanto, existem inúmeros estudos associando BDNF com a promoção da sobrevivência celular [47-50] e com quimioproteção em células de neuroblastoma [51, 52]. Também, há evidência que BDNF, através da ativação de PI3K pode bloquear a apoptose em células de neuroblastoma tratamentos com diferentes agentes quimioterápicos comumente usados como etoposídeo, doxorrubicina e cisplatina. [31]

Embora esteja claro que TrkB/BDNF possui um papel importante na progressão tumoral e desenvolvimento de metástases, os mecanismos moleculares envolvidos não são completamente compreendidos. Estes achados esclarecendo as potenciais vias moleculares envolvidas podem permitir o desenvolvimento de potenciais novas terapias para o tratamento. [75, 76]

2.5. Caracterização das drogas em estudo

2.5.1. Etoposídeo

Etoposídeo é um inibidor de topoisomerase II usado no tratamento de diversas neoplasias. O etoposídeo induz apoptose através de cascata intracelular na qual membros da família Bcl-2 possuem papel primordial já que são alvos de Akt. [77]

O etoposideo é um derivado semisintético do vegetal podofilotoxina apresentando atividade contra um grande número de neoplasia. Foi aprovado para uso inicialmente nos Estados Unidos no ano de 1983 e é essencial para o tratamento de tumores como carcinoma de pequenas células pulmonar e o carcinoma testicular.

O etoposideo é considerado um inibidor de topoisomerase II. Esta enzima possui papel muito importante na duplicação do DNA. O complexo de enzimas topoisomerases liga-se ao DNA formando um complexo DNA-topoisomerase determinando uma clivagem controlada em uma fita do DNA. Este complexo enzimático produz uma abertura que permite a passagem de outra fita de DNA, evitando a distensão forçada das bandas de DNA. Na sequência, ocorre religação da fita clivada no ponto de quebra e, por final, a dissociação entre o DNA e o complexo enzimático. O etoposideo age estabilizando o complexo enzimático e o DNA impedindo a etapa de religação do ponto de quebra e consequente morte celular. [78, 79]

2.5.2. Doxorrubicina

A doxorrubicina é um antibiótico antracíclico isolado da cultura do fungo *Streptomyces peucetius var. caesius*, utilizado atualmente em várias neoplasias como carcinomas de mama, pulmões, tireóide e carcinomas ovarianos, por exemplo.

O mecanismo de ação envolve a inibição da enzima topoisomerase II e RNA polimerases, relacionadas à síntese de DNA. A doxorrubicina também se liga aos ácidos nucléicos pela intercalação específica do núcleo planar da antraciclina com a dupla hélice do DNA, ocorrendo quebras uni ou bifilamentares. Possui em sua estrutura um anel de quinona e de hidroquinona com potencial de formação de radicais livres que atuam como agentes alquilantes importantes como água oxigenada, ferro, hidroxila e cálcio. [80, 81]

A presença de doxorrubicina e dos radicais livres formados são responsáveis por danos importantes no DNA. [82] Possui também atividade sobre a membrana celular ligando-se tanto a ela como a proteínas plasmáticas, alterando suas funções. [83]

2.5.3. Cisplatina

Desde que a cisplatina foi introduzida no combate ao câncer na década de 70, ela se tornou o pilar de tratamento de diversas neoplasias como neoplasias ginecológicas,

genitourinárias e gastrointestinais, por exemplo. A cisplatina induz morte celular através de ligações covalentes com o DNA. Estas ligações ocorrem também em outros componentes intracelulares, incluindo proteínas, lipídios, RNA e DNA mitocondrial, porém, existe consenso científico que o mecanismo primário de morte celular ocorre através da lesão direta no DNA. Embora possa se ligar em todas as bases, a ligação preferencial ocorre entre a posição N-7 de moléculas de guanina adjacentes ou entre uma guanina e uma adenina. Estas interações levam a uma distorção da molécula de DNA. Aparentemente, a cisplatina não possui ação específica sobre o ciclo de vida celular. [79]

2.5.4. Paclitaxel

O paclitaxel é um agente antimicrotúbulo que promove a agregação de microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina tendo sua estrutura descrita na década de 70. Desde então, se mostrou ativo em carcinoma de ovário, mama, colo uterino e de pulmão, por exemplo.

A ligação de paclitaxel com os microtúbulos e sua estabilização acaba por bloquear o ciclo celular em sua última fase (G2) e na mitose, impedindo a proliferação e divisão celular. Como é um composto hidrofóbico, acredita-se que possa entrar nas células através de difusão passiva. [84, 85]

2.6. Caracterização da linhagem celular OVCAR-3

Essa linhagem celular foi isolada após coleta de ascite em paciente com adenocarcinoma de ovário após progressão ao tratamento combinado de adriamicina, ciclofosfamida e cisplatina. Deste modo, OVCAR-3 possui resistência *in vitro* a concentrações clinicamente ativas de adriamicina (5×10^{-8} M), melfalano (5×10^{-6} M) e cisplatina (5×10^{-7} M) com sobrevida em comparação ao controle de 43, 45 e 77%, respectivamente.

Essas características tornam esta linhagem celular como um dos modelos *in vitro* mais adequados para a avaliação dos mecanismos de resistência à quimioterapia no câncer de ovário.[86]

3. Justificativa

3.1. Necessidade de novos tratamentos

Atualmente o tratamento do câncer de ovário possui na quimioterapia baseada em platina em associação com taxanos seu pilar mais importante, porém estão surgindo as primeiras evidências de que a terapia alvo pode acrescentar ganhos de qualidade no tratamento quando associada à tratamento quimioterápico. Importantes trabalhos pré-clínicos e clínicos tem demonstrado nos últimos anos que a combinação de tratamento focado em alvos moleculares pode acrescentar eficácia ao já estabelecido tratamento quimioterápico. O desenvolvimento destas linhas de pesquisa são importantes para a melhora na qualidade e eficácia do tratamento disponível. [87-90]

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

O objetivo deste estudo foi avaliar uma possível interação de efeito entre a ativação da via do BDNF/TrkB e o uso de quimioterapia citotóxica clássica utilizada para tratamento de câncer de ovário na prática clínica.

4.2. Objetivos secundários

- 4.2.1. Avaliar os efeitos da estimulação do receptor TrkB induzida pela aplicação de BDNF sobre a proliferação celular em linhagem celular de câncer de ovário (OVCAR-3);
- 4.2.2. Avaliar se a estimulação do receptor TrkB, induzida pela aplicação de BDNF, é capaz de prevenir o dano citotóxico induzido por adriamicina, etoposideo, cisplatina e paclitaxel em linhagem celular de câncer de ovário (OVCAR-3);
- 4.2.3. Avaliar o efeito da estimulação do receptor TrkB, induzida pela aplicação de BDNF, concomitantemente ao dano citotóxico induzido por adriamicina, etoposideo, cisplatina e paclitaxel em linhagem celular de câncer de ovário (OVCAR-3);
- 4.2.4. Avaliar se a estimulação do receptor TrkB, induzida pela aplicação de BDNF, é capaz de reverter o dano celular induzido por adriamicina, etoposideo, cisplatina e paclitaxel em linhagem celular de câncer de ovário (OVCAR-3);

5. Referências:

1. CenterWatch. Drugs in Clinical Trials Database. 2012 [cited 2012 17/06]; Available from: www.centerwatch.com.
2. Brasil. Sistema de Informações sobre Mortalidade. In: Saúde Md, editor. 2011.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA: a cancer journal for clinicians. 2009;59(4):225-49. Epub 2009/05/29.
4. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. Lancet. 2003;361(9375):2099-106. Epub 2003/06/27.
5. Gladieff L, Ferrero A, De Rauglaudre G, Brown C, Vasey P, Reinthaller A, et al. Carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin versus carboplatin and paclitaxel in partially platinum-sensitive ovarian cancer patients: results from a subset analysis of the CALYPSO phase III trial. Ann Oncol. 2012;23(5):1185-9. Epub 2011/10/07.
6. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, Hambleton J, Dupont J, Mackey H, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. J Clin Oncol. 2007;25(33):5180-6. Epub 2007/11/21.
7. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology. 9th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. xlvii, 2638 p. p.
8. Ten Bokkel Huinink WW, Sufliarsky J, Smit WM, Spanik S, Wagnerova M, Hirte HW, et al. Safety and efficacy of patupilone in patients with advanced ovarian, primary fallopian, or primary peritoneal cancer: a phase I, open-label, dose-escalation study. J Clin Oncol. 2009;27(19):3097-103. Epub 2009/05/20.
9. Matulonis UA, Berlin S, Ivy P, Tyburski K, Krasner C, Zarwan C, et al. Cediranib, an oral inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor kinases, is an active drug in recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. J Clin Oncol. 2009;27(33):5601-6. Epub 2009/10/15.
10. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. The New England journal of medicine. 2009;361(2):123-34. Epub 2009/06/26.

11. Gallion HH, Pieretti M, DePriest PD, van Nagell JR, Jr. The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer*. 1995;76(10 Suppl):1992-7. Epub 1995/11/15.
12. Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*. 2008;26(32):5284-93. Epub 2008/10/16.
13. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2583-90. Epub 1998/08/15.
14. Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1995;58(2):216-25. Epub 1995/08/01.
15. Alvarez AA, Krigman HR, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):587-91. Epub 1999/04/01.
16. Zheng W, Dai Q, Tao P, Sun A, Wang Y, Bao L, et al. Overexpression of tyrosine kinase receptor B promotes metastasis of ovarian serous adenocarcinoma by lymphangiogenesis. *Tumori*. 2011;97(6):756-61. Epub 2012/02/11.
17. Au CW, Siu MK, Liao X, Wong ES, Ngan HY, Tam KF, et al. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Lett*. 2009;281(2):151-61. Epub 2009/03/25.
18. Yu X, Liu L, Cai B, He Y, Wan X. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2008;99(3):543-52. Epub 2008/01/19.
19. Siu MK, Wong OG, Cheung AN. TrkB as a therapeutic target for ovarian cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2009;13(10):1169-78. Epub 2009/08/22.
20. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anticancer therapy? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(7-8):755-9. Epub 2006/03/29.
21. Via CS, Tsokos GC, Stocks NI, Clerici M, Shearer GM. Human in vitro allogeneic responses. Demonstration of three pathways of T helper cell activation. *J Immunol*. 1990;144(7):2524-8. Epub 1990/04/01.
22. Weeraratna AT, Arnold JT, George DJ, DeMarzo A, Isaacs JT. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. *Prostate*. 2000;45(2):140-8. Epub 2000/10/12.
23. Djakiew D, Pflug BR, Delsite R, Onoda M, Lynch JH, Arand G, et al. Chemotaxis and chemokinesis of human prostate tumor cell lines in response to human prostate stromal

- cell secretory proteins containing a nerve growth factor-like protein. *Cancer Res.* 1993;53(6):1416-20. Epub 1993/03/15.
24. Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, et al. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature.* 1994;368(6468):246-9. Epub 1994/03/17.
25. Danzer SC, Pan E, Nef S, Parada LF, McNamara JO. Altered regulation of brain-derived neurotrophic factor protein in hippocampus following slice preparation. *Neuroscience.* 2004;126(4):859-69. Epub 2004/06/23.
26. Backstrom A, Soderstrom S, Kylberg A, Ebendal T. Molecular cloning of the chicken trkA and its expression in early peripheral ganglia. *J Neurosci Res.* 1996;46(1):67-81. Epub 1996/10/01.
27. Glass DJ, Nye SH, Hantzopoulos P, Macchi MJ, Squinto SP, Goldfarb M, et al. TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell.* 1991;66(2):405-13. Epub 1991/07/26.
28. Husson I, Rangon CM, Lelievre V, Bemelmans AP, Sachs P, Mallet J, et al. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex.* 2005;15(3):250-61. Epub 2004/07/23.
29. Miller FD, Kaplan DR. Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2001;58(8):1045-53. Epub 2001/09/01.
30. Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual review of neuroscience.* 2003;26:299-330. Epub 2003/02/25.
31. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res.* 2002;62(22):6462-6. Epub 2002/11/20.
32. Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci.* 2002;22(10):3977-86. Epub 2002/05/23.
33. Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2002;68(2):213-25. Epub 2002/04/12.
34. Hu P, Kalb RG. BDNF heightens the sensitivity of motor neurons to excitotoxic insults through activation of TrkB. *J Neurochem.* 2003;84(6):1421-30. Epub 2003/03/05.

35. Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33538-46. Epub 2004/06/01.
36. Marsh HN, Scholz WK, Lamballe F, Klein R, Nanduri V, Barbacid M, et al. Signal transduction events mediated by the BDNF receptor gp 145trkB in primary hippocampal pyramidal cell culture. *J Neurosci.* 1993;13(10):4281-92. Epub 1993/10/01.
37. Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int J Oncol.* 2006;29(4):1003-11. Epub 2006/09/12.
38. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):555-62. Epub 2001/09/07.
39. Chiappa SA, Chin LS, Zurawel RH, Raffel C. Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery.* 1999;45(5):1148-54; discussion 54-5. Epub 1999/11/05.
40. Han L, Zhang Z, Qin W, Sun W. Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients? *Medical hypotheses.* 2007;68(2):407-9. Epub 2006/09/30.
41. Yilmaz T, Jiffar T, de la Garza G, Lin H, Milas Z, Takahashi Y, et al. Therapeutic targeting of Trk suppresses tumor proliferation and enhances cisplatin activity in HNSCC. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(6):644-53. Epub 2010/08/13.
42. Robinet C, Pellerin L. Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;30(2):286-98.
43. Barnabe-Heider F, Miller FD. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2003;23(12):5149-60. Epub 2003/07/02.
44. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.* 2002;62(22):6756-63. Epub 2002/11/20.
45. Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron.* 2000;27(2):265-77. Epub 2000/09/14.

46. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*. 2004;430(7003):1034-9. Epub 2004/08/27.
47. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 1993;328(12):847-54. Epub 1993/03/25.
48. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1997;19(2):93-101. Epub 1997/03/01.
49. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1995;55(8):1798-806. Epub 1995/04/15.
50. Feng X, Jiang H, Baik JC, Edgar C, Eide FF. BDNF dependence in neuroblastoma. *J Neurosci Res*. 2001;64(4):355-63. Epub 2001/05/08.
51. Scala S, Wosikowski K, Giannakakou P, Valle P, Biedler JL, Spengler BA, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer Res*. 1996;56(16):3737-42. Epub 1996/08/15.
52. Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J, Zhu X. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16451-60. Epub 1999/05/29.
53. Brunetto de Farias C, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, et al. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*. 2010;79(5-6):430-9. Epub 2011/04/09.
54. Lucarelli E, Kaplan D, Thiele CJ. Activation of trk-A but not trk-B signal transduction pathway inhibits growth of neuroblastoma cells. *Eur J Cancer*. 1997;33(12):2068-70. Epub 1998/03/28.
55. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994;14(1):759-67. Epub 1994/01/01.

56. Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, et al. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett.* 2001;164(1):5160. Epub 2001/02/13.
57. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):689-96. Epub 2001/02/07.
58. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(3):203-16. Epub 2003/03/04.
59. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A, Yilmaz T, Zhou G, Xie T, et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(14):2047-59. Epub 2010/01/27.
60. Lai PC, Chiu TH, Huang YT. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol Rep.* 2010;24(5):1265-70. Epub 2010/09/30.
61. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):5962-7. Epub 2009/09/17.
62. Li Z, Oh DY, Nakamura K, Thiele CJ. Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo. *Cancer.* 2011;117(23):5412-22. Epub 2011/05/19.
63. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, Kapczynski F, Schwartzmann G, Brunetto AL, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci.* 2010;40(3):303-10. Epub 2009/07/31.
65. Perez-Pinera P, Hernandez T, Garcia-Suarez O, de Carlos F, Germana A, Del Valle M, et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Molecular and cellular biochemistry.* 2007;295(1-2):19-26. Epub 2006/07/25.
66. Huang YT, Lai PC, Wu CC, Cheng CC, Chiu TH. TrkB antibody elicits cytotoxicity and suppresses migration/invasion of transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2010;37(4):943-9. Epub 2010/09/03.
67. Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2011;11(1):23. Epub 2011/07/20.

68. Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, Meignan S, Germain E, Berteaux N, et al. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1741-52. Epub 2011/02/26.
69. Moon A, Won KY, Lee JY, Kang I, Lee SK, Lee J. Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology.* 2011;43(5):453-8. Epub 2011/06/15.
70. Lam CT, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, Fan ST, Poon RT. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(10):3123-33. Epub 2011/03/23.
71. Johnson EM, Jr. Destruction of the sympathetic nervous system in neonatal rats and hamsters by vinblastine: prevention by concomitant administration of nerve growth factor. *Brain Res.* 1978;141(1):105-18. Epub 1978/02/03.
72. Shimohama S, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Ohara O, Watanabe S, et al. Brain-derived neurotrophic factor pretreatment exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 1993;164(1-2):55-8. Epub 1993/12/24.
72. Wang W, Salvaterra PM, Loera S, Chiu AY. Brain-derived neurotrophic factor spares choline acetyltransferase mRNA following axotomy of motor neurons in vivo. *J Neurosci Res.* 1997;47(2):134-43. Epub 1997/01/15.
73. Kume T, Kouchiyama H, Kaneko S, Maeda T, Akaike A, Shimohama S, et al. BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 1997;756(1-2):200-4. Epub 1997/05/09.
74. Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* 1994;640(1-2):56-67. Epub 1994/03/21.
75. Huang YZ, McNamara JO. Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB. *J Biol Chem.* 2010;285(11):8207-17. Epub 2010/01/13.
76. Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, Rafii D, Hempstead BL. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood.* 2005;105(11):4429-36. Epub 2005/01/20.
77. Karpnich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16547-52. Epub 2002/02/28.

78. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:351-75. Epub 1989/01/01.
79. Chabner B, Longo DL. *Cancer chemotherapy and biotherapy : principles and practice*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. xv, 812 p. p.
80. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E, Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Molecular and cellular biochemistry*. 2002;234-235(1-2):119-24. Epub 2002/08/07.
81. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Seminars in oncology*. 1998;25(4 Suppl 10):10-4. Epub 1998/10/13.
82. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466-8. Epub 1984/10/26.
83. Tritton TR, Murphree SA, Sartorelli AC. Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;84(3):802-8. Epub 1978/10/16.
84. Kalechman Y, Longo DL, Catane R, Shani A, Albeck M, Sredni B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (Taxol)+AS101 in a murine model of B16 melanoma: association with ras-dependent signal-transduction pathways. *Int J Cancer*. 2000;86(2):281-8. Epub 2000/03/30.
85. Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacology & therapeutics*. 1984;25(1):83-125. Epub 1984/01/01.
86. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res*. 1983;43(11):5379-89. Epub 1983/11/01.
88. Secord AA, Blessing JA, Armstrong DK, Rodgers WH, Miner Z, Barnes MN, et al. Phase II trial of cetuximab and carboplatin in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer and evaluation of epidermal growth factor receptor expression: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2008;108(3):493-9. Epub 2008/01/15.
89. Wilken JA, Webster KT, Maihle NJ. Trastuzumab Sensitizes Ovarian Cancer Cells to EGFR-targeted Therapeutics. *Journal of ovarian research*. 2010;3:7. Epub 2010/03/30.
90. Bevacizumab slows disease progression in ovarian and colorectal cancer. *Cancer discovery*. 2012;2(7):OF4. Epub 2012/07/13.

91. Markman M. Addition of bevacizumab to weekly paclitaxel significantly improves progression-free survival in heavily pretreated recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2012;124(1):171; author reply -2. Epub 2011/07/29.

6. Artigo em inglês

Article for submission

Original Paper

Running title: Association between BDNF and chemotherapy on ovarian cancer cells.

Evaluation of BDNF and chemotherapy treatment on ovarian cancer cell line

(OVCAR-3)

Gabriel Marques dos Anjos – Caroline Brunetto de Farias – Tiago Elias Heinen – Rafael Pereira dos Santos – Lilian Caesar – Rafael Roesler – Gilberto Schwartzmann

G dos Anjos¹, CB de Farias^{2,4,5}, TE Heinen², RP dos Santos², L Caesar², R. Roesler^{2,5,6}, G. Schwartzmann^{2,3,5}

1. Academic Hospital and Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.
2. Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035003, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.
4. Childrens's Cancer Institute (ICI-RS), Rua Francisco Ferrer, 276, CEP 90420-140, Porto Alegre, RS, Brazil.
5. National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.
6. Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: Caroline Bruneto de Farias. Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. [Email: cbfarias@gmail.com](mailto:cbfarias@gmail.com)

Keywords: ovarian cancer, OVCAR-3, paclitaxel, doxorubicin, etoposide, cisplatin, BDNF.

Abstract

Ovarian cancer is the most prevalent and lethal of gynecological malignancies. Chemotherapy is an important component of the systemic treatment with a combination of a platinum complex and a taxane one of the classic treatments. Invariably, advanced ovarian cancer becomes resistant to chemotherapy. Based on recent data demonstrating a possible role of neurotrophins regulating chemosensitivity, we decided to study the impact of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the antitumor activity of different classes of antineoplastic agents. Primarily, to evaluate a possible synergistic effect of BDNF and different ovarian cancer treatments combination, cells were exposed to cisplatin, etoposide, doxorubicin and paclitaxel concomitantly with BDNF for 48 hours. Sequential administration of BDNF and any of the agents was carried out to evaluate if BDNF has the potential of enhancing or protecting cells from the effects of treatment depending of each agent is applied first. There were a reduction in viability of OVCAR-3 cells exposed to cisplatin, doxorubicin and etoposide when used concomitantly with BDNF in 61.18% (SE 1.12, $p=0.002$), 38.96% (SE 1.08, $p=0.001$) and 49.63% (SE 1.17, $p<0.001$) respectively. We also found that BDNF reduced significantly the effect of paclitaxel and doxorubicin when used before chemotherapy with a reduction of effect of 53.46% (SE \pm 3.48, $p=0.001$) and 48.25% (SE \pm 1.25, $p=0.018$), respectively. Furthermore, BDNF used sequentially to doxorubicin was able to reverse the chemotoxicity of this agent in 37.77% (SE 1.25, $p=0.018$). In conclusion, using the human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3, BDNF exhibited a synergistic effect when administered concomitantly to the cytotoxic agents doxorubicin, etoposide and cisplatin. We have also observed a protective effect of BDNF when applied 24 hours before doxorubicin and paclitaxel. Notably, when BDNF was administered after the exposure to the antineoplastic agents, a reversal of cytotoxicity was observed only for doxorubicin and not for the other agents.

Introduction

Ovarian cancer is the most prevalent and lethal of the gynecological malignancies. It is usually diagnosed at advanced stage (1). Chemotherapy is an essential component of the systemic treatment of patients with advanced disease, and the combination of a platinum complex and a taxane is one the regimens of choice (2).

Unfortunately, ovarian cancer becomes invariably resistant to chemotherapy and none of the available second-line treatments provides significant survival benefit (3). Therefore, a better understanding of the mechanisms involved in drug resistance and novel treatment strategies to circumvent these mechanisms are necessary.

There is promising clinical data regarding the use of targeted therapy associated with chemotherapy in ovarian cancer. One of these examples is the use of the anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) antibody bevacizumab in association with standard cytotoxic therapy (4). In addition, there are other growth factors signaling pathways involved in tumor cell proliferation under investigation, such as the fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), interleukins and neurotrophic factor (NTF) signaling pathways (5, 6).

Neurotrophins, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in particular, are capable of stimulating the growth of neoplastic cells and increase their metastatic potential, besides their effect on survival and normal neuronal differentiation (5, 7-15). Furthermore, the overexpression of BDNF and tyrosine-related kinase B (TrkB), was documented in various types of human tumors, such as pancreatic and ovarian cancer, being associated with a worse disease prognosis (16). BDNF stimulation was shown to induce chemoresistance in in vitro models of neuroblastoma, while an enhanced tumor chemosensitivity was observed when TrkB is blocked (17, 18).

Based on these provocative results, we decided to study the impact of interventions in the BDNF/TrkB pathway on the antitumor activity of different classes of antineoplastic agents routinely applied in the treatment of ovarian cancer.

Materials and methods

Cell lines and reagents

OVCAR-3 was obtained from the American Type culture collection (Rockville, MD). This cell line is derived from human ovarian cancer resistant to chemotherapy and were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin in 75 cm² polystyrene flasks (Corning Life Sciences, UK) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Exponentially-growing cells were harvested with 0.25% trypsin and 0.03% EDTA. Adriamicyn, etoposide, paclitaxel and cisplatin were a gift from SOAD Foudation. The stock solution of the chemotherapies was prepared in distilled water. BDNF was purchased from Sigma (Sigma, B3795).

Methods

Cell proliferation was assessed using the MTT assay after 72 h of treatment as previously described (19, 20). Cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 90µl of DMEN plus 10µl of MTT 5mg/mL and were incubated for 4 hours at 37°C. The plates were left at room temperature until completely dry. Dimethyl sulfoxide was added and the samples were read at a wavelength of 492 nm in a multiplate reader.

All OVCAR-3 cells were plated in 96-well Corning Tissue Culture dishes at a density of 12.000cells/well and incubated for 24 h with medium only. After this time, we exposed OVCAR-3 cells to BDNF 10ng/ml for 48 hours to evaluate their effect on cellular proliferation. To evaluate a possible synergistic effect of BDNF and different ovarian cancer treatments combination, cells were exposed to cisplatin (100 to 5000 nM), etoposide (100 to 1000 nM), doxorubicin (10 to 1000 nM) and paclitaxel (100 nM) concomitantly with BDNF for 48 hours. Sequential administration of BDNF and any of the agents was carried out to evaluate if BDNF has the potential of enhancing or protecting cells from the effects of treatment depending of each agent is applied first.

Statistics

All experiments were conducted in triplicate and the results are expressed as the mean number of cells \pm standard error, with differences evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests. In all comparisons, $p < 0.05$ was necessary to indicate statistical significance.

Results

Effect of chemotherapy on OVCAR-3

To assess the viability of OVCAR-3 cell line, we exposed the cells to increasing concentrations of etoposide, doxorubicin, cisplatin and paclitaxel, representing different mechanisms of action as inhibition of topoisomerase II, direct DNA damage and microtubules inhibition. All drugs decreased cell viability in a dose dependent manner and we choose suboptimal doses to evaluate the effect of BDNF in association.

Fig. 1 should be inserted here.

Figure 1. Dose effect of chemotherapy on viability of OVCAR-3. A. Paclitaxel was tested with 0.1 nM and 100 nM demonstrating decreased viability with the greater dose. B. Doxorubicin was evaluated with different doses and we proceed the tests with 10 nM, 100 nM and 1000 nM. C. Etoposide tests with 100 nM and 1000 nM as the doses used in subsequent tests. D. Cisplatin dose response curve with 100 nM and 5000 nM elected as the doses to use in combination with BDNF.

Effect of BDNF on survival of OVCAR-3 cell line

We observed an increase of 10.27% (SE X4.98, $p = 0.025$) on cell proliferation with use of BDNF in relation with control group as can be seen in figure 2.

Fig. 2 should be inserted here.

Figure 2. Effect of BDNF on viability of OVCAR-3 cell line. BDNF 10 ng/ml was able to increase cellular proliferation on MTT assay.

Synergistic effect of BDNF combination treatment

There were a significantly reduction in cell viability of OVCAR-3 cells exposed to cisplatin 5000 nM, doxorubicin 100 nM and etoposide 1000 nM when used concomitantly with BDNF in comparison with each one of this agents alone (a reduction in viability of 61.18% (SE 1.12, $p=0.002$), 38.96% (SE 1.08, $p=0.001$) and 49.63% (SE 1.17, $p<0.001$) respectively.

Fig. 3 should be inserted here.

Figure 3. BDNF combination treatment with chemotherapy in OVCAR-3 cells. A. Etoposide concomitantly administered with BDNF or control. B. Cisplatin concomitantly administered with BDNF or control. C. Paclitaxel concomitantly administered with BDNF or control. D. Doxorubicin concomitantly administered with BDNF or control. Statistical significance with control is shown with an asterisk (*) above the graphic. Statistical significance with BDNF compared to its control is shown with a number sign (#) above the graphic.

Other agents in combination did not showed synergistic effect.

Effects of BDNF prior to treatment

Sequential administration of BDNF and any of the agents was carried out to evaluate if BDNF has the potential of enhancing or protecting cells from the effects of treatment depending of each agent is applied first. OVCAR-3 cells were plated in 96-well Corning Tissue Culture dishes at a density of 12.000cells/well and incubated for 24 h with medium only.

We exposed OVCAR-3 cell to 24 h of BDNF previous to any of treatment agents. We found that BDNF reduced significantly the effect of paclitaxel 100 nM but did not revert it to control levels. We observed a difference from 28,41% (SE \pm 1.18) cell count with paclitaxel to

43.60% (SE±1.66) to BDNF previous to paclitaxel, a reduction of effect of 53.46% (SE±3.48, p=0.001).

When BDNF was applied previously to doxorubicin 10 nM we observed a complete return to normal levels of cell count with a reduction of effect of 48.25% (SE±1.25, p=0.018). Thus, BDNF was able to fully reverse the effects of doxorubicin when used before cellular exposure to this drug.

Fig. 4 should be inserted here.

Figure 4. BDNF applied previous to chemotherapy. A. Etoposide effect when administered after BDNF exposure. B. Doxorubicin effect when administered after BDNF exposure. C. Paclitaxel effect when administered after BDNF exposure. D. Cisplatin effect when administered after BDNF exposure. Statistical significance with control is shown with an asterisk (*) above the graphic. Statistical significance with BDNF compared to its control is shown with a number sign (#) above the graphic.

This effect was not present when evaluated at higher doses of the tested drugs.

Effects of BDNF succeeding treatment

Ours results demonstrated that BDNF used sequentially to doxorubicin 10 nM was able to reverse the chemotoxicity of this agent but not from others drugs independently of dose. The observed reduction of effect of doxorubicin with BDNF was 37.77% (SE 1.25, p=0.018).

Fig. 5 should be inserted here.

Figure 5. Effect of BDNF after chemotherapy. A. Etoposide previous to BDNF administration. B. BDNF reduced the effect of doxorubicin when administered after chemotherapy. C. Paclitaxel previous to BDNF administration. D. Cisplatin previous to BDNF administration. Statistical significance with control is shown with an asterisk (*)

above the graphic. Statistical significance with BDNF compared to its control is shown with a number sign (#) above the graphic.

This effect was not present when BDNF testing was associated with other tested drugs.

Discussion

Different classes of cytotoxic drugs are used for the treatment of ovarian cancer and some of these drugs are already largely used in clinical practice (21). Cisplatin (or carboplatin) plus paclitaxel is the most commonly used drug combination in ovarian cancer. Cisplatin is a platinum agent that binds to DNA, causing DNA adducts and apoptosis (22). Paclitaxel promotes microtubule aggregation, through its stabilization impeding cell division (23, 24). For second-line therapy, several agents have been used in ovarian cancer, usually in sequence (25). Doxorubicin is an anthracycline that produce cytotoxic effects, through the inhibition of topoisomerase II, free radical formation and direct action on DNA double helix (26-29). Etoposide is a podophilotoxin derivative that induces apoptosis through inhibition of topoisomerase II (22, 30).

Our results showed a synergistic effect of BDNF when administered concomitantly with doxorubicin, etoposide and cisplatin. The basis for this synergism is still unclear. One possible explanation is that the early activation of PI3K and MAPK pathway through TrkB activation may turn cells more susceptible to damage mediated by topoisomerase II inhibition, as well as to direct platinum damage. The intracellular pathways that mediate the interaction between the cytotoxic effects of these agents and BDNF stimulation deserve further tests. The above results are of special interest, considering that the OVCAR-3 cell line is resistant to doxorubicin and cisplatin (31).

We have also observed a protective effect of BDNF when applied 24 hours before doxorubicin and paclitaxel. One possible explanation could be that the early activation of the TrkB pathway could promote survival mechanisms responsible for resistance to the intracellular effects of microtubule stabilization and inhibition of topoisomerase II. However, this effect was observed only with doxorubicin and not with etoposide, which might suggest that this effect was not related to topoisomerase II inhibition, as doxorubicin

exerts its cytotoxicity also through other mechanisms (26-29). Notably, when BDNF was administered after the exposure to the antineoplastic agents, a reversal of cytotoxicity was observed only for doxorubicin and not for the other agents. If the compensating mechanisms activated after cytotoxicity are enhanced with BDNF administration or if BDNF activates alternative pathways promoting protective and/or reparative effects are yet to be studied.

In conclusion, using the human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3, BDNF exhibited a synergistic effect when administered concomitantly to the cytotoxic agents doxorubicin, etoposide and cisplatin. The basis for this synergism is, however, still unclear. As these cytotoxic agents are commonly used in patients with ovarian cancer, as well as in other types of malignancies, the confirmation of these findings in other tumor models and the elucidation of the potential molecular mechanisms involved in this phenomenon are warranted.

Acknowledgments: This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant No. 303703/2009-1 to R.R.), the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), the University Hospital Research Fund (FIPE/HCPA), the South American Office for Anticancer Drug Development, and the Children's Cancer Institute (ICI-RS).

References

1. DeVita VT, Lawrence TS and Rosenberg SA: DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.
2. Ozols RF: Future directions in the treatment of ovarian cancer. *Semin Oncol* 29: 32-42, 2002.
3. Ten Bokkel Huinink WW, Sufliarsky J, Smit WM, et al: Safety and efficacy of patupilone in patients with advanced ovarian, primary fallopian, or primary peritoneal cancer: a phase I, open-label, dose-escalation study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27: 3097-3103, 2009.
4. Matulonis UA, Berlin S, Ivy P, et al: Cediranib, an oral inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor kinases, is an active drug in recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27: 5601-5606, 2009.
5. Glass DJ, Nye SH, Hantzopoulos P, et al: TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell* 66: 405-413, 1991.
6. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, et al: BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *Journal of molecular neuroscience : MN* 40: 303-310, 2010.
7. Chiappa SA, Chin LS, Zurawel RH and Raffel C: Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery* 45: 1148-1154; discussion 1154-1145, 1999.
8. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E and Peeper DS: Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430: 1034-1039, 2004.
9. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB and Brodeur GM: Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328: 847-854, 1993.
10. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD and White PS: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 93-101, 1997.

11. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR and Thiele CJ: Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer research* 55: 1798-1806, 1995.
12. Feng X, Jiang H, Baik JC, Edgar C and Eide FF: BDNF dependence in neuroblastoma. *Journal of neuroscience research* 64: 355-363, 2001.
13. Scala S, Wosikowski K, Giannakakou P, et al: Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer research* 56: 3737-3742, 1996.
14. Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J and Zhu X: Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 274: 16451-16460, 1999.
15. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL and Schwartzmann G: BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 11: 1473-1475, 2011.
16. Desmet CJ and Peeper DS: The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63: 755-759, 2006.
17. Li Z, Oh DY, Nakamura K and Thiele CJ: Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo. *Cancer* 117: 5412-5422, 2011.
18. Ho R, Eggert A, Hishiki T, et al: Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer research* 62: 6462-6466, 2002.
19. Flores DG, de Farias CB, Leites J, et al: Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 5: 99-105, 2008.
20. de Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, et al: Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol* 93: 191-201, 2009.
21. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al: Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25: 5180-5186, 2007.
22. Chabner B and Longo DL: *Cancer chemotherapy and biotherapy : principles and practice*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.

23. Kalechman Y, Longo DL, Catane R, Shani A, Albeck M and Sredni B: Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (Taxol)+AS101 in a murine model of B16 melanoma: association with ras-dependent signal-transduction pathways. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 86: 281-288, 2000.
24. Manfredi JJ and Horwitz SB: Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 25: 83-125, 1984.
25. Palayekar MJ and Herzog TJ: The emerging role of epidermal growth factor receptor inhibitors in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 18: 879-890, 2008.
26. Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, Wang S, Konorev E and Kotamraju S: Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 234235: 119-124, 2002.
27. Myers C: The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 25: 10-14, 1998.
28. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD and Liu LF: Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226: 466-468, 1984.
29. Tritton TR, Murphree SA and Sartorelli AC: Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. *Biochemical and biophysical research communications* 84: 802-808, 1978.
30. Liu LF: DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58: 351-375, 1989.
31. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, et al: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer research* 43: 5379-5389, 1983.

Figure 1.

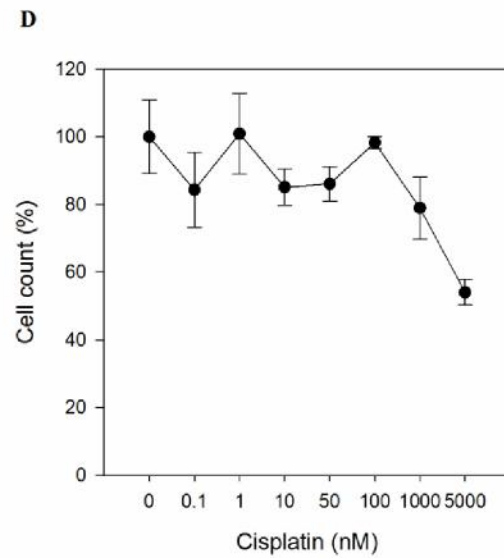
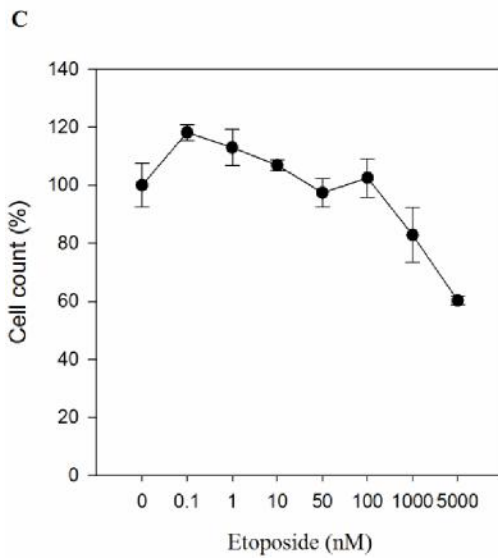
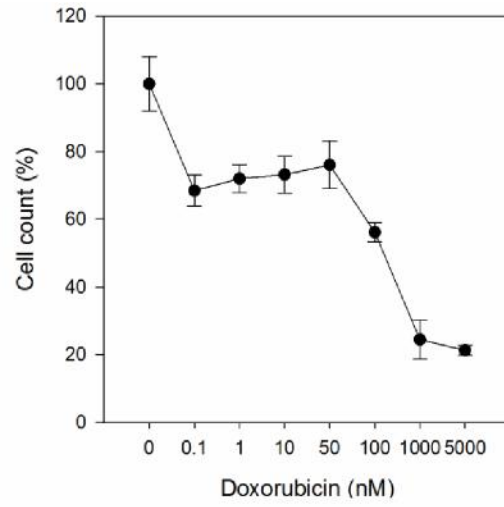
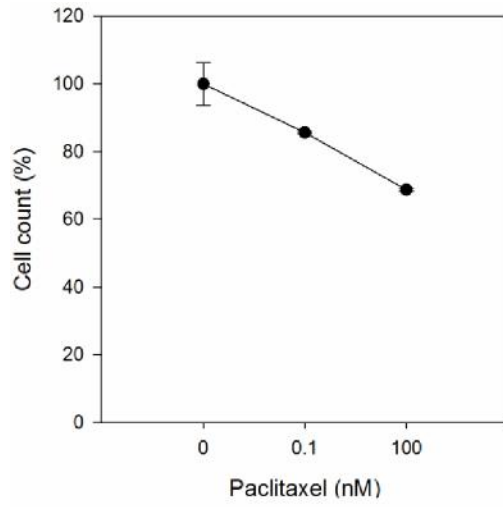


Figure 2.

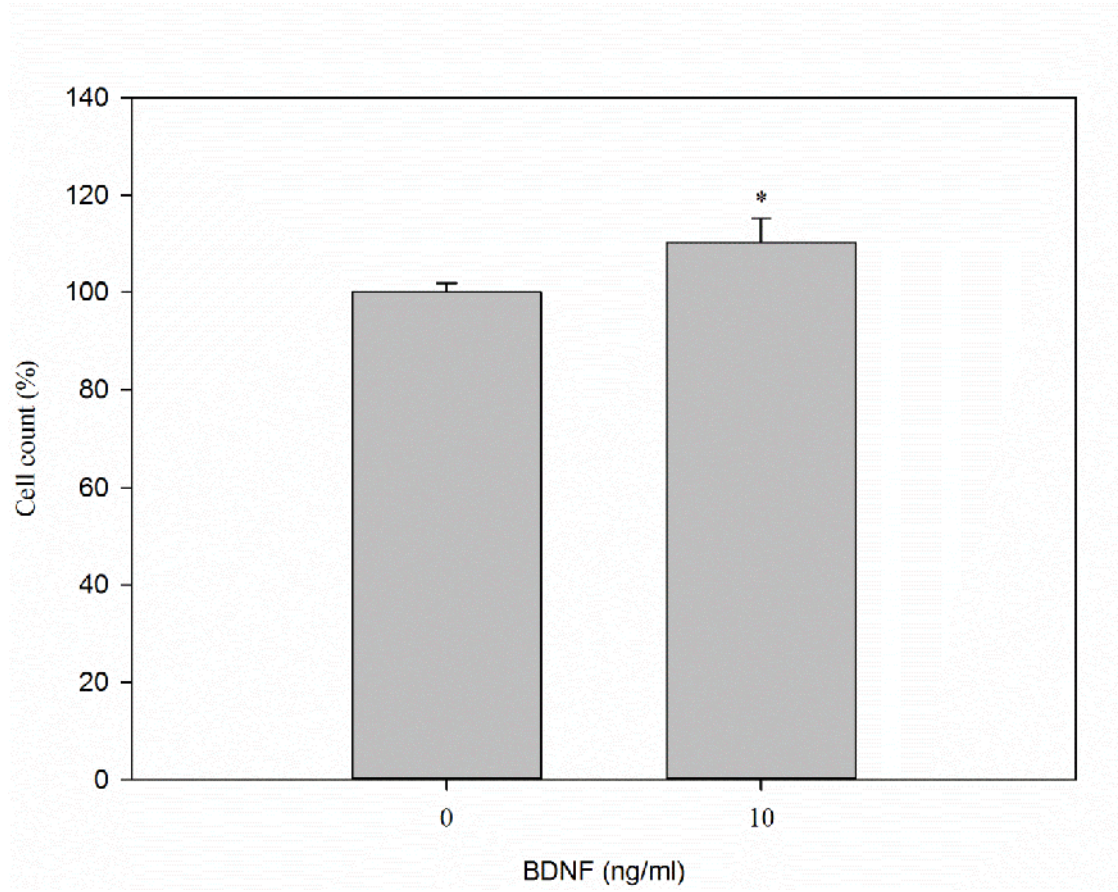


Figure 3.

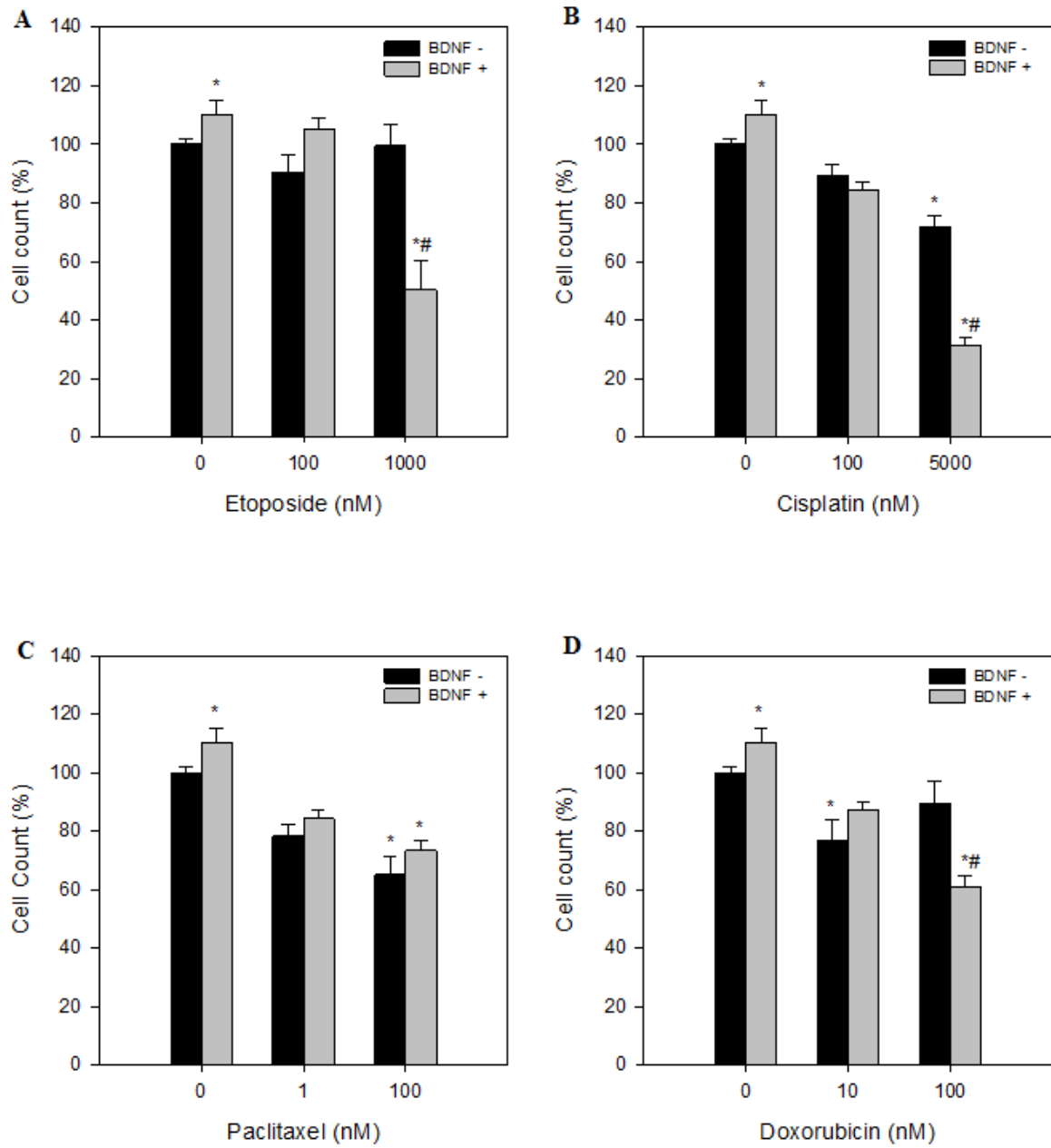


Figure 4.

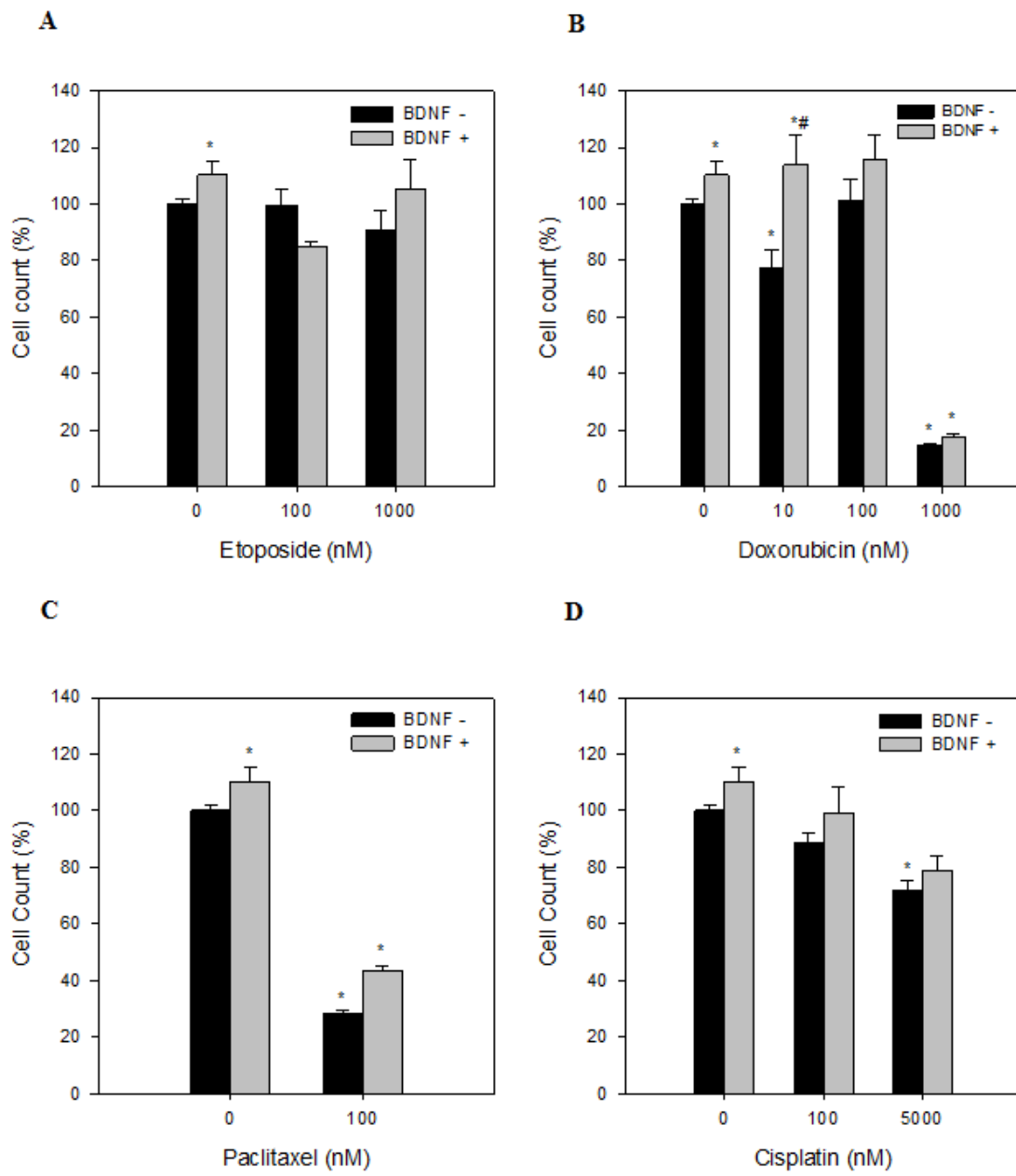
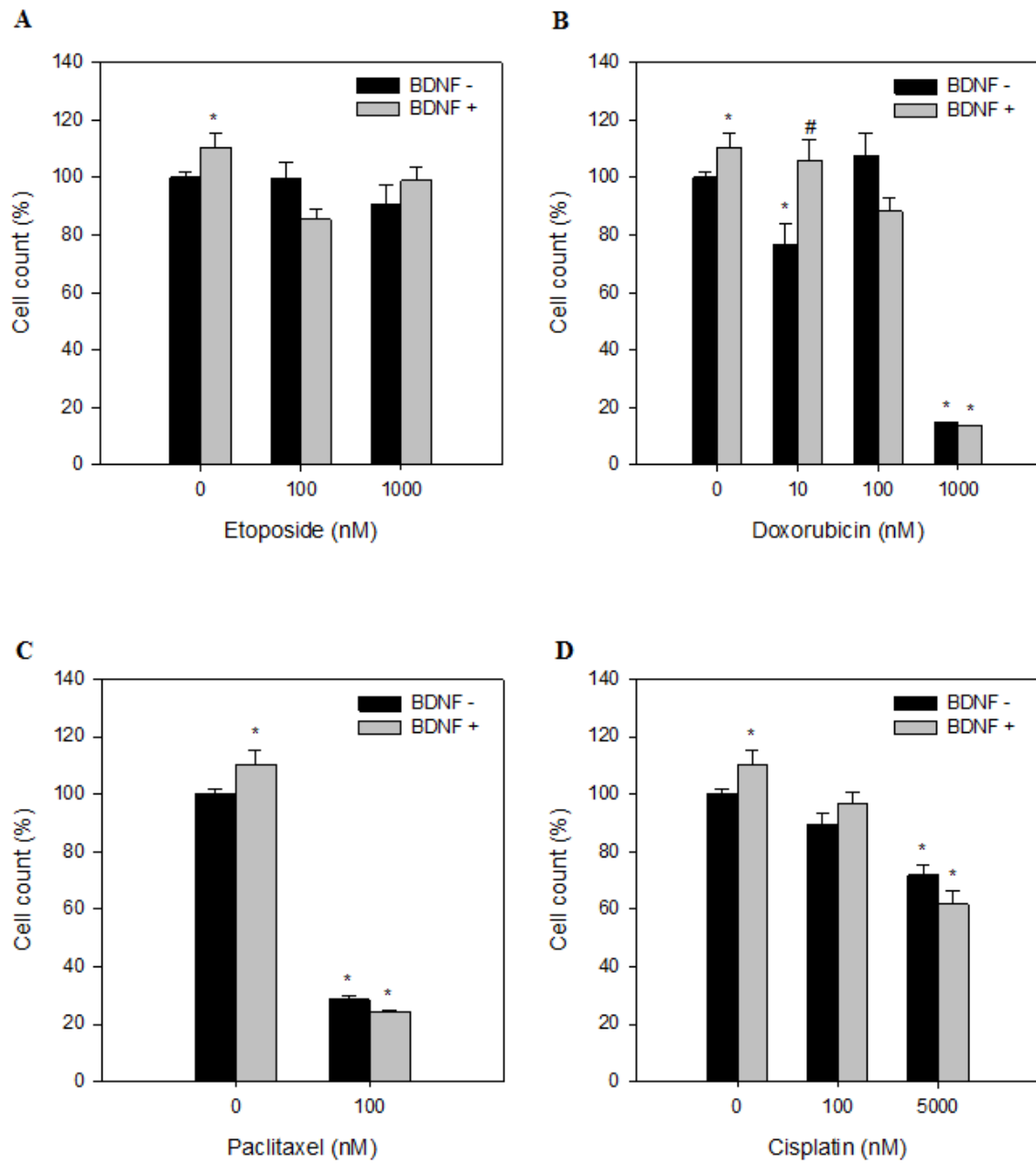


Figure 5.



7. Considerações finais

Diferentes classes de drogas citotóxicas são usadas para o tratamento de câncer de ovário e algumas dessas drogas já são amplamente usadas na prática clínica. [6] Cisplatina (ou carboplatina) com paclitaxel é a combinação de drogas mais comumente usado em câncer de ovário. A cisplatina é um agente platinado que se liga ao DNA, causando lesões no DNA e apoptose. [79] O paclitaxel promove agregação de microtúbulos, impedindo a divisão celular. [84, 85] Para terapia de segunda linha, vários agentes têm sido utilizados no câncer de ovário, geralmente em sequência. [91] A doxorubicina é uma antraciclina, que produz efeitos citotóxicos através da inibição da topoisomerase II, formação de radicais livres e ação direta sobre DNA. [80-83] Etoposídeo é uma podofilotoxina que induz a apoptose através da inibição da topoisomerase II. [78, 79]

Os nossos resultados mostraram um efeito sinérgico de BDNF quando administrado concomitantemente com etoposídeo, doxorubicina e cisplatina. A base para esse sinergismo ainda é incerta. Uma explicação possível é que a ativação precoce da via PI3K e MAPK, através da activação TrkB, pode tornar as células mais susceptíveis a danos mediados por inibição da topoisomerase II, bem como aos danos da platina. As vias intracelulares que regulam a interação entre os efeitos citotóxicos destes agentes de estimulação e o BDNF merecem mais testes. Os resultados acima são de especial interesse, considerando que a linha de células OVCAR-3 é resistente à doxorubicina e cisplatina. [86]

Observamos também um efeito protetor de BDNF quando aplicado 24 horas antes da doxorubicina e paclitaxel. Uma possível explicação pode ser que a ativação precoce da via do TrkB poderia promover mecanismos de sobrevivência responsáveis pela resistência aos efeitos intracelulares de estabilização de microtúbulos e de inibição da topoisomerase II. No entanto, este efeito foi observado apenas com a doxorubicina, e não com etoposídeo, o que pode sugerir que este efeito não foi relacionado com a inibição da topoisomerase II, já que a doxorubicina exerce a sua citotoxicidade também através de outros mecanismos. [80-83] Notavelmente, quando BDNF foi administrado após a exposição a agentes antineoplásicos, uma reversão de citotoxicidade foi observada apenas para a doxorubicina e não para os outros agentes. Se os mecanismos de compensação ativados após a toxicidade pelos agentes

quimioterápicos são reforçados com BDNF ou se a ativação de vias alternativas promove proteção e/ou efeitos reparadores ainda é um efeito a ser melhor estudado.

Concluindo, utilizando a linhagem humana de células de câncer de ovário OVCAR-3, o BDNF exibiu um efeito sinérgico quando administrado concomitantemente com os agentes citotóxicos doxorrubicina, etoposídeo e cisplatina. A base para este sinergismo, no entanto, ainda não é clara. Como estes agentes citotóxicos são comumente utilizados em pacientes com câncer de ovário, bem como em outros tipos de neoplasias, a confirmação destas descobertas em outros modelos de tumor e a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos neste efeito é importante.

Com a melhor compreensão de como BDNF/TrkB via interage com diferentes mecanismos de danos causadas por diferentes agentes utilizados na prática clínica, esperamos focar os estudos pré-clínicos e clínicos, não só para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na resistência celular à quimioterapia, mas também identificar combinação de drogas que potencializar o efeito desejado de suscetibilidade celular aumentada ao nosso arsenal terapêutico.

8. Anexo

Protocolo para avaliação de viabilidade celular pelo método MTT

1. Introdução

Consiste na avaliação de dado através do estudo do metabolismo celular de glicídeos através da avaliação a viabilidade mitocondrial. Na mitocôndria, MTT é reduzido a formazan que será proporcional à atividade mitocondrial e conseqüentemente à viabilidade celular.

2. Procedimentos

1- Preparar uma suspensão celular na concentração de 12.000 células/poço, adicionando 200µl por poço em placas de 96 poços.

3-Incubar a placa na estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas.

4-Retirar o meio de cultura.

5-Tratar as células com 100 µl conforme o tratamento desejado.

6-Manter a placa na estufa de CO₂ por 72 horas, retirando apenas para colocação de tratamento sequencial, quando necessário.

7-Retirar o meio de cultura.

8-Lavar os poços com 100 µl de solução salina balanceada de Hank (HBSS) e 90µl de DMEN.

9-Adicionar a todos os poços 100 µl da solução de MTT (0,5mg/mL).

10- Incubar a placa na estufa de CO₂ pelo período de 4 horas.

11- Retirar a solução de MTT da placa.

12- Adicionar a todos os poços 100µl de DMSO puro. 15-

Fazer a leitura a 492 nm.

3. Cálculos

Calcular a média de absorbância de todos os testes. O valor médio do grupo controle deve ser considerado como 100%. Para os demais testes, deve-se fazer uma regra de três para avaliação de células viáveis em relação ao controle.