

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DE TRK NO TRATAMENTO DE SARCOMA
DE EWING: UM ESTUDO CELULAR E MOLECULAR**

TIAGO ELIAS HEINEN

**Porto Alegre
Setembro de 2015**

TIAGO ELIAS HEINEN

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE INIBIDORES DE TRK NO TRATAMENTO DE SARCOMA
DE EWING: UM ESTUDO CELULAR E MOLECULAR**

**Tese submetida ao Programa
de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor.**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

Setembro de 2015

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Câncer e Neurobiologia no Centro de Pesquisa Experimental no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Instituto Nacional de Medicina Translacional (INCT), Projeto Rafael Koff Acordi, Instituto do Câncer Infantil do RS (ICI-RS), Fundação Sul-Americana para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer (Fundação SOAD), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – números 484185/2012-8 e 303276/2013-4), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Esta tese ocorreu no momento das maiores mudanças da minha vida e, como toda grande mudança, não é fácil enfrentar. Se não fosse pela ajuda, zelo, bondade, amizade, amor de todas as pessoas as quais citarei, certamente este sonho nunca se tornaria realidade.

Em primeiro lugar, agradeço às instituições de fomento à pesquisa como o INCT, a CAPES, CNPq, Fundação SOAD, ao HCPA e, principalmente, ao Projeto Rafael Koff Acordi, os quais depositam extrema convicção nas nossas ideias e projetos, uma vez que a construção de conhecimento através da investigação científica pode trazer enormes benefícios para as pessoas que são acometidas pelo câncer. O caminho é longo, mas é na bancada que tudo inicia.

Agradeço ao meu orientador, Rafael Roesler, o qual tenho grande estima, não apenas por suas ideias e por ser um grande pesquisador, mas pela pessoa que é, por deixar os alunos terem liberdade de fazerem suas escolhas, de tocarem seus experimentos, por acreditar na nossa capacidade e pelo apoio nos momentos em que precisei. Tenho muito orgulho desse cara.

À Caroline Brunetto de Farias, pessoa a qual devo chamar de orientadora também, pois me apoiou e acreditou em mim desde o dia em que cheguei ao laboratório até hoje e, certamente, vai estar presente para sempre. Grande parte deste trabalho devo a ela. É inestimável o meu carinho, amizade, e o sentimento de “obrigado por tudo” o qual tenho por essa pessoa.

Ao pessoal do laboratório: Marquito, Mari, Rafa, Bárbara, Vivi, Lílian, Amanda, Mauro, Pietro, não apenas pelo companheirismo e pelas risadas que fazem com que o trabalho seja executado com mais prazer e alegria, mas pelo apoio, ajuda e trabalho em equipe. Todos foram essenciais nesta caminhada.

Aos meus colegas de apartamento Leo e Marquito que são minha família em Porto Alegre.

Aos meus amigos tanto da velha guarda quanto a gurizada da Medicina, ao pessoal do Jiu-Jitsu, que me fazem lembrar que a vida não é apenas estudos e que não devemos nos desprender daquilo que nos faz bem e nos faz feliz.

Por fim, e mais importante, aos meus pais Loir e Clair e minha irmãs Greice e Cláudia. Eu sempre soube que fazer uma segunda faculdade e o Doutorado, ao mesmo tempo, não seria fácil. Não sabia, no entanto, que seria tão complicado... É de a minha personalidade querer realizar minhas obrigações da melhor maneira possível, ter foco, dedicação e um tom obstinação. Mas só com a ajuda e compreensão de vocês que consegui finalizar essa que é a maior conquista que já tive. Obrigado por tudo e esta tese é dedicada à minha família.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	08
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
1. Sarcoma de Ewing	12
1.1. Aspectos gerais.....	12
1.2. Epidemiologia e etiologia.....	12
1.3. Histologia e características moleculares.....	13
1.4. A biologia do sarcoma de Ewing.....	15
1.5. Aspectos clínicos e prognóstico.....	17
1.6. Tratamento.....	20
1.7. Mecanismos de resistência.....	21
1.8. Perspectivas para o tratamento.....	23
2. Neurotrofinas e seus receptores	24
2.1. Aspectos gerais.....	24
2.2. Os receptores de neurotrofinas.....	26
2.3. Sinalização celular ativada pelas neurotrofinas.....	28
2.4. Neurotrofinas e câncer.....	30
2.4.1. BDNF/TrkB.....	32
2.4.2. NGF/TrkA.....	34
2.4.3. Neurotrofinas e sarcoma de Ewing.....	36
3. OBJETIVOS	38
4. CAPÍTULO 1	39
5. MANUSCRITO	40
6. DISCUSSÃO	61

7. CONCLUSÕES.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
10. CURRÍCULO LATTES RESUMIDO.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do cérebro)
CTT	Células tronco tumorais
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Doxo	Doxorrubicina
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ES	Ewing's sarcoma
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FTSE	Família dos tumores de sarcoma de Ewing
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDACi	Inibidor de histona deacetilases
IC ₅₀	Concentração de cada agente necessária para inibir 50% do crescimento celular
ICI/RS	Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
JNK	c-Jun N-terminal cinase
LDH	Lactato desidrogenase
miRNA	Micro-RNA
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NB	Neuroblastoma
NT	Neurotrofina
NGF	Nerve growth factor (fator de crescimento do nervo)
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5

NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
p75NTR	Receptor de neurotrofina p75
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PKC	Proteína cinase C
PLC γ	Fosfolipase-C gamma
PNET	Tumor primitivo neuroectodérmico
Pró-NT	Pró-neurotrofina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
siRNA	RNA de interferência
SE	Sarcoma de Ewing
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
Trk	Tropomyosin receptor kinase (receptor tropomiosina cinase)
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TrkC	Tropomyosin receptor kinase C
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VCR	Vincristina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VP-16	Etoposídeo

RESUMO

O sarcoma de Ewing (SE) é um dos mais agressivos tipos de câncer pediátrico. Apesar dos significativos avanços no tratamento dessa doença, ainda há uma grande necessidade no aumento das taxas de cura, redução da toxicidade quimioterápica e redução da resistência ao tratamento. Tem sido proposto que SE provém de precursores neuronais, podendo ter sua fisiologia afetada, pois, por neurotrofinas (NTs). Examinamos a influência de receptores de NTs (Trks) em SE. Foram avaliadas a expressão proteica de NTs (NGF e BDNF) e seus receptores (TrkA e TrkB, respectivamente) em amostras de tumores de pacientes com SE, e a expressão de mRNA nas linhagens celulares RD-ES e SK-ES-1. O tratamento das linhagens com o pan-inibidor de Trks (K252a) modificou a morfologia celular e diminuiu a expressão de mRNA de NGF, TrkA, BDNF e TrkB. Ainda, a inibição de Trks diminuiu drasticamente a proliferação e capacidade clonogênica celular. Efeitos sinérgicos foram observados quando as células foram tratadas em conjunto com baixas doses de quimioterápicos, tanto em células selvagens de SE, quanto nas quais induzimos quimiorresistência. Esse estudo sugere, pela primeira vez, que a inibição de Trks reduz a proliferação e sobrevivência celular em SE, além de aumentar a sensibilidade ao tratamento quimioterápico.

Palavras-chave: sarcoma de Ewing, BDNF, NGF, TrkA, TrkB, resistência, terapia de alvo molecular, adjuvância, câncer pediátrico.

ABSTRACT

Ewing's sarcoma (ES) is one of the most aggressive types of pediatric cancer. Despite significant advances in the treatment of this disease, there is still a great need in increasing cure rates, reducing chemotherapy toxicity and treatment resistance. It has been proposed that ES might derive from neuronal precursors and may be influenced, therefore, by neurotrophins (NTs). We have examined the influence of Trk neurotrophin receptors in ES. Protein expression of NTs (NGF and BDNF) and their receptors (TrkA, and TrkB, respectively) was detected in tumor samples from patients with ES, and mRNA expression was analyzed in the RD-ES, SK-ES-1 cell lines. Treating cells with a Trk Pan-inhibitor (K252a) altered cell morphology and decreased the mRNA expression of NGF, TrkA, BDNF, and TrkB. In addition, Trk inhibition dramatically decreased cell proliferation and clonogenic capacity. Synergistic effects were observed when cells were treated in combination with low doses of cytotoxic chemotherapeutics, both in normal ES cells and cells in which chemoresistance was induced. The results suggest for the first time that Trk inhibition can reduce the proliferation and survival of ES cells and sensitize them to cytotoxic chemotherapy.

Keywords: Ewing's sarcoma, BDNF, NGF, TrkA, TrkB, resistance, targeted therapy, adjuvant therapy, pediatric cancer.

INTRODUÇÃO

1. Sarcoma de Ewing

1.1. Aspectos Gerais

O sarcoma de Ewing (SE) foi originalmente descrito pelo patologista James Ewing em 1921 (EWING, 1921), o qual relatou as características histopatológicas do tumor as quais são utilizadas até hoje. Embora a compreensão dessa patologia tenha evoluído, havia outras neoplasias com características clínicas e histológicas similares ao SE, que fazem parte, agora, da família dos tumores de sarcoma de Ewing (FTSE). A primeira neoplasia similar foi descrita em 1918 por Arthur Stout, que observou um tumor do nervo ulnar composto de células redondas e indiferenciadas que formavam rosetas. Tal achado, mais tarde, ficou conhecido como Tumor Primitivo Neuroectodérmico (PNET). Da mesma forma, Askin e colaboradores, em 1979, descreveram um tumor de partes moles identificado na parede torácica de adolescentes, o qual ficou conhecido como tumor de Askin. Quando estudos moleculares mostraram perfis genéticos similares a esses três tipos de tumor, eles foram considerados parte da FTSE (CARVAJAL & MEYERS, 2005; BALAMUTH & WOMER, 2010).

O SE é um tumor que acomete principalmente crianças e adolescentes. Antes da introdução da quimioterapia, apenas 10% dos pacientes sobreviviam em cinco anos. Ultimamente, porém, atingem-se taxas de sobrevivência maiores que 70% para doença localizada (BALAMUTH & WOMER, 2010). A principal característica deste tumor é a presença de translocações que levam à formação de oncogenes responsáveis pela patogênese da doença, assunto que será detalhado posteriormente.

1.2. Epidemiologia e etiologia

Tumores ósseos primários são responsáveis por 5% de todos os tumores em adolescentes e crianças, sendo que SE é o segundo tipo mais comum, ficando atrás do osteossarcoma (RIVERA-VALENTIN *et al.*, 2015). A incidência anual é de cerca de três casos por milhão, atingindo um pico na

segunda década de vida, sendo que mais de 50% dos casos são diagnosticados entre 10 e 20 anos de idade. Menos de 23% dos casos são encontrados em menores de 10 anos, e a incidência declina quando a idade passa dos 20 anos. Existe uma leve predominância em homens (61%), e é uma doença quase que exclusiva de caucasianos (92%) (ESIASHVILI *et al.*, 2008), uma vez que são tumores extremamente raros em indivíduos de origem africana e asiática. Uma explicação para esse fato, portanto, seria uma redução do tamanho do íntron 6 do gene EWS, o qual fica em uma região próxima ao ponto de quebra da translocação, na população africana (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 1997).

No Brasil, os tumores ósseos representam 6,7% de todos os tumores da infância. Cerca de 700 crianças são diagnosticadas, a cada ano, com esses tipos de tumor, dos quais aproximadamente 400 são osteossarcomas e 200 são SE. No período entre 2001-2003, a taxa média de incidência ajustada por idade para os tumores ósseos malignos em meninos de 0 a 19 anos foi de 9,97 por milhão, e nas meninas foi de 7,79 casos por milhão (INCA, 2008).

A etiologia do SE permanece desconhecida. Apesar de a totalidade dos casos estarem relacionados a anormalidades genéticas, como as translocações, a maioria destes tumores, entretanto, parece surgir de maneira esporádica, uma vez que nenhuma ligação genética foi encontrada. Do mesmo modo, uma influência ambiental ainda não foi identificada (RANDALL *et al.*, 2010)

1.3. Histologia e características moleculares

O diagnóstico definitivo do SE é baseado em sua histologia obtida pela biópsia da lesão. Histologicamente, o tumor apresenta-se como camadas homogêneas e densas de pequenas células redondas e azuis. O núcleo, o qual está associado a uma cromatina fina e granular, apresenta grande proporção em relação ao citoplasma, o qual tipicamente contém poucas e pequenas organelas, em contraste com abundância em glicogênio (SUH *et al.*, 2002) (Figura 1). Infelizmente, o SE é histologicamente similar a outros tumores compostos por células azuis, como linfoma, leucemia, neuroblastoma, entre outros, tornando o diagnóstico mais difícil. Em vista desse problema, existem alternativas para a confirmação diagnóstica: a maioria das células de SE marca-se, por meio de

imunohistoquímica, com o anticorpo anti-CD99, que é uma glicoproteína de membrana codificada pelo gene MIC2 (ANTONESCU, 2014), sendo, destarte, essencial para o diagnóstico.

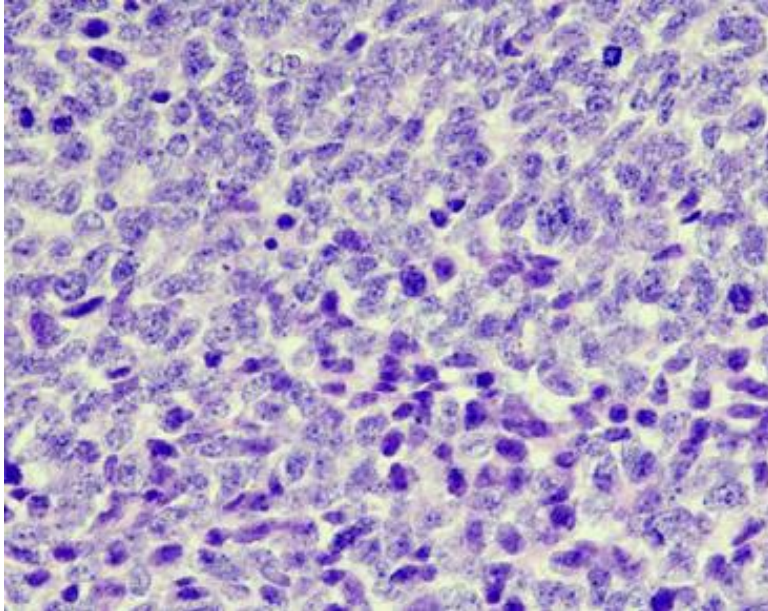


Figura 1: Ilustração histopatológica de sarcoma de Ewing. SE apresentando uma camada de células pequenas, arredondadas e azuladas. Marcação por hematoxilina e eosina. Aumento de 40x. Fonte: adaptado de HaDuong et al., *Pediatr Clin North Am* 2015. Original disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031395514001916> (acessado em 15 de janeiro de 2015).

Citogeneticamente, existem algumas características associadas à FTSE, como as translocações, as quais são determinadas por técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou RT-PCR. Todas as translocações envolvem o gene EWS (presente no cromossomo 22), o qual codifica uma proteína de ligação ao RNA cuja função é desconhecida, com fatores de transcrição da família ETS, sendo o mais comum o gene FLI1 (presente no cromossomo 11) (ANTONESCU, 2014). A translocação t(11;22)(q24;q12) produz o gene fusionado EWS-FLI1, o qual é encontrado em 85% dos tumores de Ewing (Figura 2). A segunda translocação mais comum é a t(21;22)(q22;q12), responsável pela produção do gene EWS-EGR encontrado em 5-10% dos tumores. Outras translocações são raras e envolvem EWS-ETV1, EWS-FEV e EWS-EIAF, dentre outras anormalidades citogenéticas (WANG *et al.*, 2007).

Embora a presença destas translocações seja bastante sensível e específica para a FTSE, é importante salientar que a combinação com EWS pode estar presente em outros tumores, ampliando a

importância do consenso entre clínica, microscopia, imunohistoquímica e características moleculares para o estabelecimento do diagnóstico.

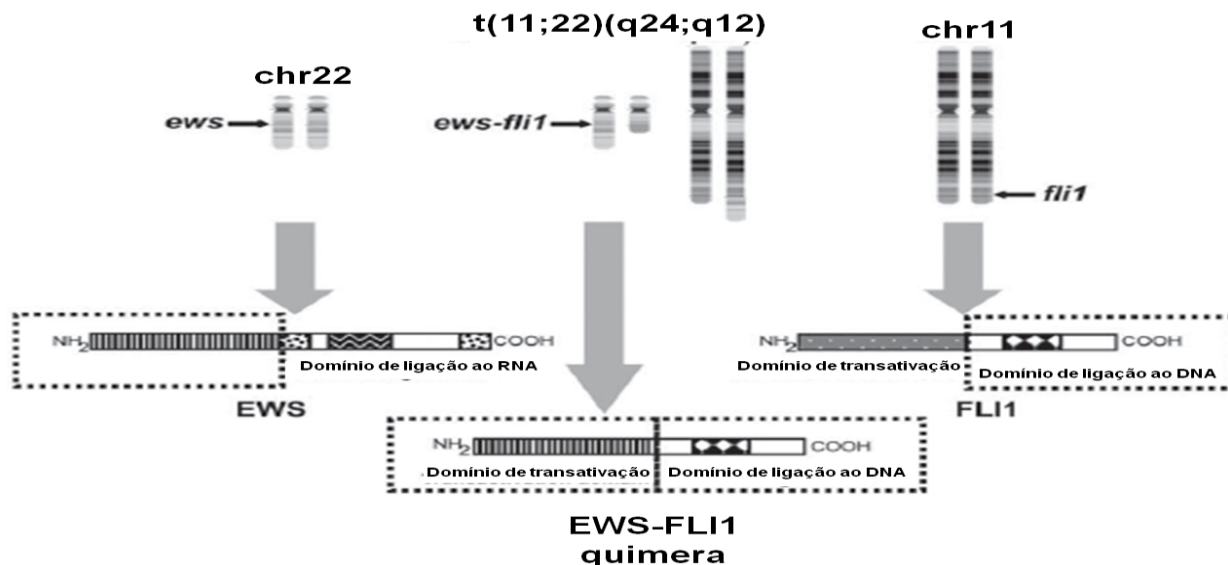


Figura 2: Aberração citogenética em SE. A figura apresenta a translocação mais comum em SE (85% dos casos), a qual ocorre entre a porção N-terminal do cromossomo 22 e a porção C-terminal do cromossomo 11, resultando na formação do oncogene fusionado *ews-fli1*, o qual codifica um fator de transcrição quimérico responsável pela transcrição gênica aberrante característica desse tumor. Fonte: adaptado de Bernstein et al., Oncologist 2006. Original disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/11/5/503.long> (acessado em 15 de janeiro de 2015).

1.4. A biologia do sarcoma de Ewing

Apesar de serem tumores raros, são extremamente agressivos e, quando ocorrem em ossos longos e pele, rapidamente geram metástases para a medula óssea, pulmões e outros tecidos (RIGGI & STAMENKOVIC, 2007). Como discutido anteriormente, a translocação que gera a fusão EWS-FLI1 é a principal característica desse tumor. A proteína EWS é uma proteína ligante de RNA, enquanto FLI1 é um fator de transcrição que afeta diversos genes relacionados a diversas funções celulares, como apoptose e diferenciação (SHARROCKS, 2001). A combinação entre EWS e ETS é específica para SE, mas a combinação entre EWS com outros genes resulta em outras patologias. Ou seja, a fusão do gene ETS, conseqüentemente, parece ser específica para esse tumor (ORDÓÑEZ *et al.*, 2009). A função da proteína EWS ainda não é bem conhecida; estudos apontam, entretanto, que a porção N-terminal do gene EWS é responsável pela indução de SE em células humanas (LIN *et al.*, 2011). Uma vez que a fusão EWS-FLI1 é a mais comum, acredita-se que seu transcrito seja a causa principal relacionada à origem do tumor

(ARVAND & DENNY, 2001). A fusão da porção 5' do gene EWS com o segmento 3' de FLI1 produz a proteína fusionada EWS-FLI1, a qual altera a expressão de inúmeros genes alvo responsáveis pela tumorigênese (TOOMEY *et al.*, 2010). EWS-FLI1 trabalha tanto como ativador quanto repressor da transcrição gênica. A proteína quimérica aumenta a expressão de proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, como IGF1, NKX2, SOX2 e EZH2. Por outro lado, EWS-FLI1 suprime genes envolvidos em apoptose e parada de ciclo celular, como p21 e p57kip (DAUPHINOT *et al.*, 2001; NAKATANI *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2006; CIRONI *et al.*, 2008; RICHTER *et al.*, 2009; RIGGI *et al.*, 2010). Análises por microarranjo de DNA revelaram que mais de 1000 genes são regulados pela proteína de fusão, 80% dos quais são reprimidos. Por essa razão, EWS-FLI1 é considerado um alvo potencial para a terapia de alvo molecular.

Existe, ainda, um número de eventos secundários relacionados à patogênese do SE, como mutações em p53, as quais estão relacionadas com o prognóstico da doença (TOOMEY *et al.*, 2010). Além disso, miRNAs foram identificados como responsáveis por efeitos modulatórios, como miRNA-145, o qual participa da tumorigênese e diferenciação em SE (RIGGI *et al.*, 2010).

Devido à complexidade desta doença, uma vez que diversos eventos são responsáveis pela patogênese, é um tumor de difícil tratamento. O estudo da biologia da tumoral, portanto, é essencial para uma melhor racionalidade no desenvolvimento de terapias-alvo.

Explorar a origem celular do SE é uma forma racional para pesquisar novos alvos terapêuticos. No entanto, não existe um consenso definitivo sobre a possível origem deste tumor. Há várias evidências apontando para uma procedência neuroectodérmica (CAVAZZANA *et al.*, 1987; O'REGAN *et al.*, 1995; KNEZEVICH *et al.*, 1998; STAEGE *et al.*, 2004; VON LEVETZOW *et al.*, 2011) . Não obstante, há outros trabalhos apontando as células tronco mesenquimais como possível origem para esse tumor (TIRODE *et al.*, 2007; RIGGI *et al.*, 2008; AMARAL *et al.*, 2014). Para solucionar esse embate entre as duas correntes, Riggi *et al* (2009), propuseram que células de SE derivam de células tronco mesenquimais de origem neuroectodérmica capazes de manter a dupla plasticidade; fornecendo,

consequentemente, uma lógica biológica convincente para a dualidade fenotípica apresentada por esses tumores.

O conhecimento destes precursores é importante na descrição da patogênese da doença e facilita a pesquisa de terapias moleculares capazes de encontrar alvos mais específicos para o tratamento.

1.5. Aspectos clínicos e prognóstico

Assim como em outros sarcomas de ossos, a dor é o sintoma inicial mais comum. Uma vez que o tumor destrói o tecido ósseo, os pacientes referem uma dor profunda e maçante na região envolvida (PATRICIO *et al.*, 1991). Além disso, como a maioria dos pacientes afetados são crianças e adolescentes, os quais são fisicamente ativos, a dor, por consequência, muitas vezes é atribuída ao crescimento ósseo ou lesões físicas as quais são comuns nesta idade; levando, portanto, a erros e atrasos no diagnóstico (WIDHE & WIDHE, 2000). Igualmente, por ser uma condição em que os sinais e sintomas clínicos são inespecíficos, muitos pacientes são tratados para condições mais benignas, como tendinite. Por isso, o tempo até o diagnóstico varia de três a nove meses, retardando, portanto, o início do tratamento oncológico (BARKER *et al.*, 2005). Aqueles pacientes em que o tumor apresenta-se como massa palpável levam a um diagnóstico mais fácil e rápido (WIDHE & WIDHE, 2000).

Outra característica clínica da doença é que o uso de anti-inflamatórios e analgésicos pode gerar um alívio inicial, o qual é abolido à medida que o tumor progride (WIDHE & WIDHE, 2000). Sintomas sistêmicos costumam ser mais comuns em SE em relação ao osteossarcoma, como febre e perda de peso, os quais são decorrentes da liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica. Dentre os achados laboratoriais, pode haver um moderado aumento de marcadores inflamatórios, como taxa de sedimentação eritrocitária, proteína C reativa e outras citocinas (RUTKOWSKI *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2013). Outras anormalidades laboratoriais incluem presença de anemia, assim como aumento de marcadores de *turnover* ósseo, como lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina (BACCI *et al.*, 2007). Radiograficamente, a lesão osteolítica mal definida envolvendo a diáfise de um osso tubular é a característica mais comum. Ressonância magnética é o exame de imagem considerado

padrão ouro e ajuda a demonstrar a extensão do tumor no osso e tecidos moles. Todos os pacientes devem, também, serem submetidos à tomografia computadorizada de mediastino e cintilografia óssea para identificação de metástases pulmonares e ósseas, respectivamente (COTE & CHOY, 2013).

Cerca de um quarto dos SE surgem em tecidos moles, e cerca de um quarto dos pacientes apresentam-se com metástases detectáveis; assume-se, todavia, que metástases subclínicas estão presentes em praticamente todos pacientes, os quais desenvolverão, portanto, doença generalizada caso não forem submetidos à quimioterapia (IWAMOTO, 2007). Os pulmões são os sítios metastáticos mais comuns, seguido de ossos e medula óssea. Em termos de localização corporal, o SE tem predileção pela diáfise de ossos tubulares e a pelve. A localização mais comum fica nas extremidades, seguida pela pelve e tronco (Figura 3).

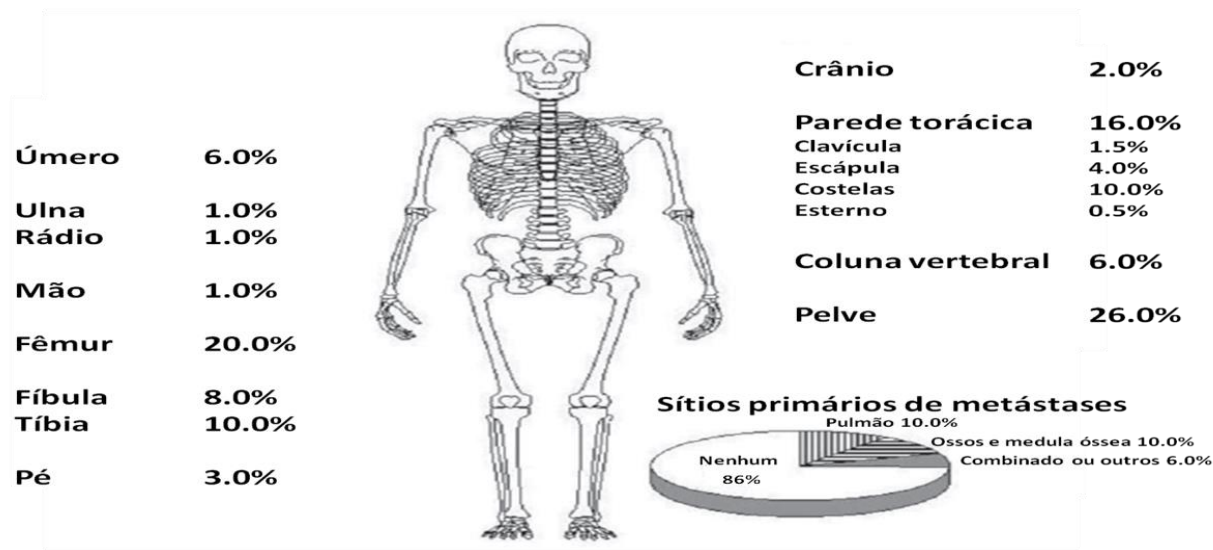


Figura 3: Principais sítios primários e metastáticos em SE. Fonte: adaptado de Bernstein et al., Oncologist 2006. Original disponível em: <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/11/5/503.long> (acessado em 15 de janeiro de 2015).

O prognóstico para pacientes que apresentam doença localizada melhorou consideravelmente desde que o tumor foi descrito, apresentando, hoje em dia, uma sobrevida de cerca de 70% em cinco anos (BACCI *et al.*, 2007). Dentre os poucos estudos realizados no Brasil, um deles aponta uma sobrevida média, em cinco anos, de 59,5% em pacientes com essa condição (BELLAN *et al.*, 2012). O prognóstico de pacientes com doença metastática, o que corresponde a 25% dos casos iniciais de SE, entretanto, cai significativamente em comparação aos que apresentam doença localizada (PAULUSSEN *et al.*, 1998;

SUBBIAH *et al.*, 2009) . A localização das metástases está relacionada ao prognóstico dos pacientes. Assim, pacientes com implantes pulmonares apresentam uma sobrevida de 40% em cinco anos, enquanto aqueles que apresentam envolvimento de ossos e medula óssea apresentam uma sobrevida de 10% (LEAVEY *et al.*, 2008).

Além da doença metastática, cerca de 30 a 40% dos pacientes sofrem com a recidiva da doença tanto localmente, quanto distalmente, ou ainda a combinação das duas formas. Esses indivíduos, infelizmente, apresentam uma sobrevida menor que 13% em cinco anos (LEE *et al.*, 2010). Apesar dos esforços vistos tanto na área da pesquisa básica quanto clínica, não existe um tratamento específico para a doença recorrente, ainda mais por que existe uma variância muito grande entre os casos; o que dificulta, portanto, o avanço dos ensaios clínicos.

Outras características importantes as quais devem ser salientadas em termos de prognóstico são idade avançada, volume tumoral, envolvimento do esqueleto axial e impossibilidade de ressecção cirúrgica (LEE *et al.*, 2010). Além disso, com os avanços das pesquisas, diversas características moleculares, as quais parecem ter participação na sobrevida dos pacientes, foram descritas, o que inclui o status de p53, expressão de telomerase, porcentagem do genoma alterado, aberrações cromossômicas adicionais como ganho do cromossomo 1q; a avaliação prática destes achados, no entanto, requer validação em estudos prospectivos (MACKINTOSH *et al.*, 2012).

Em termos de prognóstico devido às diferentes translocações, os resultados dos estudos são controversos. Alguns estudos apontam um melhor prognóstico para pacientes portadores da fusão EWS-FLI1 (DE ALAVA *et al.*, 1998), enquanto outros afirmam que não há diferença em termos de fenótipo tumoral e prognóstico (LE DELEY *et al.*, 2010).

Aumentar as taxas de cura tem sido um desafio para pacientes com doença metastática e recidivante; a terapia alvo, conseqüentemente, surge como uma opção a ser explorada no qual o prognóstico pode ser melhorado. Além disso, pacientes com doença metastática têm maior chance de apresentarem recidiva; os tratamentos devem, portanto, focalizar nas metástases e detenção da doença recidivante.

1.6. Tratamento

Desde a descoberta do tumor por James Ewing, o tratamento e o prognóstico dos pacientes melhoraram substancialmente. Terapia local suplementada com quimioterapia e radioterapia é o tratamento padrão para um vasto número de tumores sólidos, incluindo SE. Antes da utilização da quimioterapia, cerca de 80-90% dos pacientes desenvolviam doença metastática apesar do controle local agressivo, como amputação de membros, por exemplo (MOORE & HAYDON, 2014). Hoje em dia, o tratamento padrão para SE envolve quimioterapia neoadjuvante, seguido pelo tratamento local com cirurgia e radioterapia, dependendo de características do tumor como tamanho, possibilidade de ressecção e proximidade com estruturas críticas. Seguido a isso, é indicado a quimioterapia adjuvante.

Uma vez que a grande maioria dos pacientes desenvolve metástases caso seja realizado apenas o controle local, a quimioterapia sistêmica é crucial para eliminar as micrometástases subclínicas. A ciclofosfamida foi a primeira droga a mostrar algum benefício quando começou a ser utilizada nos anos 60 (SUTOW & SULLIVAN, 1962). No entanto, os maiores benefícios foram obtidos quando outros agentes sistêmicos foram coligados no tratamento. Novos estudos que incorporavam multiagentes como vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida e dactiomicina (VACD) tiveram uma taxa de sobrevida, em 5 anos, de 50-60% no tratamento da doença localizada (BACCI *et al.*, 1989; BACCI *et al.*, 1991). Estudos subsequentes, os quais incluíram etoposídeo e isofosfamida, obtiveram um aumento na taxa de sobrevida para 69%. Devido a esses estudos clínicos, a terapia de primeira linha, atualmente, consiste em terapia neoadjuvante, usualmente combinando entre 4 a 6 quimioterápicos entre vincristina (V), doxorrubicina (D), etoposídeo (E), ciclofosfamida (C), isofosfamida (I) e actinomicina-D (A). A combinação mais utilizada na Europa é VIDE/VAI, enquanto nos Estados Unidos é VDC/IE (ESMO, 2014). Esse tipo de tratamento, entretanto, não ataca especificamente os mecanismos patogênicos das células de SE; levando, conseqüentemente, a um aumento de resistência tumoral à quimioterapia convencional (AMARAL *et al.*, 2014). Além disso, esse regime atual não é eficaz para pacientes com doença metastática (GRIER *et al.*, 2003), que, até hoje, apresentam uma taxa de sobrevida extremamente baixa.

Para subverter esse baixo índice de cura em doença metastática, vários protocolos foram explorados, como intensificação de doses e transplante de medula óssea que, entretanto, apenas subverteram os pacientes à toxicidade e complicações decorrentes do tratamento, apresentando muito pouco benefício clínico (KUSHNER & MEYERS, 2001). Ou seja, a utilização da quimioterapia citotóxica, há anos, atingiu um platô no que se refere a aumento de sobrevida dos pacientes, o que leva clínicos e pesquisadores a darem maior atenção e importância a outras áreas, como a terapia de alvo molecular, a qual tem alcançado grande destaque no tratamento de todos os tipos de tumor.

Apesar de importantes avanços no que se refere à sobrevida dos pacientes devido ao advento da quimioterapia sistêmica e o controle local com cirurgia e radiação, existe muito espaço para melhoramentos, especialmente em pacientes com doença metastática e aqueles os quais desenvolvem recorrência. Pesquisas atuais devem focar-se, também, em tratamentos que aumentem a sobrevida e reduzam a toxicidade e morbidade associadas às opções terapêuticas atuais. Tal toxicidade é um grande agente limitador da terapêutica envolvida contra o tumor.

1.7. Mecanismos de resistência

Apesar dos grandes esforços objetivando identificar novas drogas terapêuticas, há uma alta porcentagem de tumores que não respondem, seja à quimioterapia citotóxica, seja ao uso de terapia alvo. Há diversos mecanismos pelos quais o SE torna-se imune à quimioterapia, como o envolvimento de células tronco tumorais (CTT), ativação de vias de proliferação celular, envolvimento do microambiente tumoral e ganho de novas mutações as quais permitem o tumor escapar da citotoxicidade farmacológica (AHMED *et al.*, 2014).

Já foram identificadas CTT em SE, as quais estão relacionadas à resistência (SUVÀ *et al.*, 2009). Mesmo os pacientes de alto risco apresentam uma boa resposta inicial ao tratamento antes de recidivarem. Uma explicação seria a presença de células tronco resistentes à quimioterapia, uma vez que são capazes de gerar uma população de células tumorais diferenciadas a partir de um único clone (BAO *et al.*, 2013). CTT são mais resistentes à quimioterapia convencional, como doxorrubicina e etoposídeo, visto que

possuem mecanismos diferenciados que permitem sua sobrevivência, como aumento da expressão da maquinaria de reparo do DNA, capacidade de permanecer em quiescência para resistir a drogas que afetam o ciclo celular, interrupção dos mecanismos que levam à apoptose, expressão de genes de resistência (SAINI & SHOEMAKER, 2010).

Além disso, diversas vias de proliferação celular identificadas em SE colaboram para a manutenção da carcinogênese, como MAPK/Erk e PI3K/mTOR/Akt (GERYK-HALL & HUGHES, 2009; CHANDHANAYINGYONG *et al.*, 2012), as quais estão constantemente ativadas em células de SE resistentes à terapia. A abundância de vias de proliferação e o *cross-talk* entre diferentes sinais induzem o crescimento contínuo do tumor, afetando não só a eficiência da quimioterapia convencional, mas também os efeitos inibitórios da terapia de alvo molecular (LIU *et al.*, 2013). Recentemente, um estudo mostrou que a via da MAPK funciona como um mecanismo compensatório em linhagens de SE expostas à inibição de IGF-1R (WAGNER & MAKI, 2013). Ou seja, a utilização de inibidores de apenas um receptor celular dá oportunidades para a célula escapar da morte através da ativação de outras vias de proliferação complementares. Tal fato salienta a importância da terapia alvo combinada, ou, até mesmo, a utilização de uma droga que afete mais de um receptor tirosina cinase.

A heterogeneidade tumoral em SE é outro fator responsável pela resistência, a qual pode ser demonstrada tanto a nível histopatológico, imunofenotípico e molecular (AHMED *et al.*, 2014). Inibidores tumorais, sozinhos ou combinados, são efetivos apenas para uma parte da população tumoral, sendo que as células não afetadas continuam proliferando (FISHER *et al.*, 2013). Essa hipótese pode ser vista quando temos como alvo IGF-1R e mTOR, o que resulta em resposta completa em camundongos xenotransplantados, diferentemente do que ocorreu na prática clínica, possivelmente pela maior heterogeneidade tumoral desse tumor em humanos (NAING *et al.*, 2012).

Há diversos mecanismos de resistência presente em SE, seja contra quimioterapia clássica, seja contra terapia alvo. O fato é que esse é um dos maiores problemas enfrentados pela prática clínica, principalmente devido à alta taxa de recidiva tumoral. As crianças são tratadas, retornando ao hospital, em alguns meses, com um tumor mais agressivo e resistente aos tratamentos. O desenvolvimento de novas

terapias capazes de subverter esses mecanismos pode oferecer uma chance para melhores resultados de cura, além de diminuir a morbidade, como amputação de membros, que, certamente, apresenta um impacto extremamente negativo na vida dessas crianças.

1.8. Perspectivas para o tratamento

Os principais alvos moleculares em estudo em SE podem ser encontrados em excelentes revisões da literatura de autoria de Kelleher & Thomas (2012) e Amaral *et al* (2014). Tais alvos incluem silenciamento do gene EWS-FLI1, antagonistas de IGF-1R, inibidores de mTOR, anticorpos contra CD-99, imunoterapia, utilização de inibidores de acetilase de histonas, uma longa lista de inibidores de tirosina cinases, entre outros (Figura 4).

O produto da fusão EWS-FLI1, certamente, é o alvo terapêutico mais óbvio, uma vez que o fator de transcrição quimérico está diretamente relacionado à patogênese da doença. Há trabalhos mostrando que a utilização de cDNA antisense e siRNA reduzem a expressão de EWS-FLI1, aumentando a sobrevivência de camundongos portadores de SE (HU-LIESKOVAN *et al.*, 2005). Entretanto, uma vez que esse tipo de terapia não ainda não pode ser administrada farmacologicamente, seu uso clínico ainda não é aplicável.

Outro alvo extremamente estudado é o receptor de IGF que, apesar de apresentar excelentes resultados *in vitro* e *in vivo* quando inibido, na prática clínica, entretanto, exibiu benefícios em apenas uma pequena população de pacientes (SUBBIAH & KURZROCK, 2012). Tal fato não inviabiliza a utilização de terapias que inibem a atividade desse receptor; deve-se, entretanto, realizar estudos os quais consigam selecionar pacientes que se beneficiariam delas.

A avaliação clínica utilizando terapia de alvo molecular contra SE ainda está em estágios iniciais, sendo necessários mais estudos randomizados fase III, englobando uma maior quantidade de pacientes para que o desenvolvimento dessas novas abordagens possa ocorrer, assim como aumentar os esforços em pesquisa básica na busca por novos alvos terapêuticos que ainda não foram explorados.

A provável origem neuroectodérmica do SE abre um leque de possibilidades de novos alvos terapêuticos. Dentre eles, destacam-se as neurotrofinas (NTs), as quais possuem papel central na manutenção de populações neuronais, além de estarem implicadas na proliferação, angiogênese, metástase de um variado número de tumores (SCHULTE *et al.*, 2005; BRUNETTO DE FARIAS *et al.*, 2010; DE FARIAS *et al.*, 2012; BAO *et al.*, 2013; LAWN *et al.*, 2015).

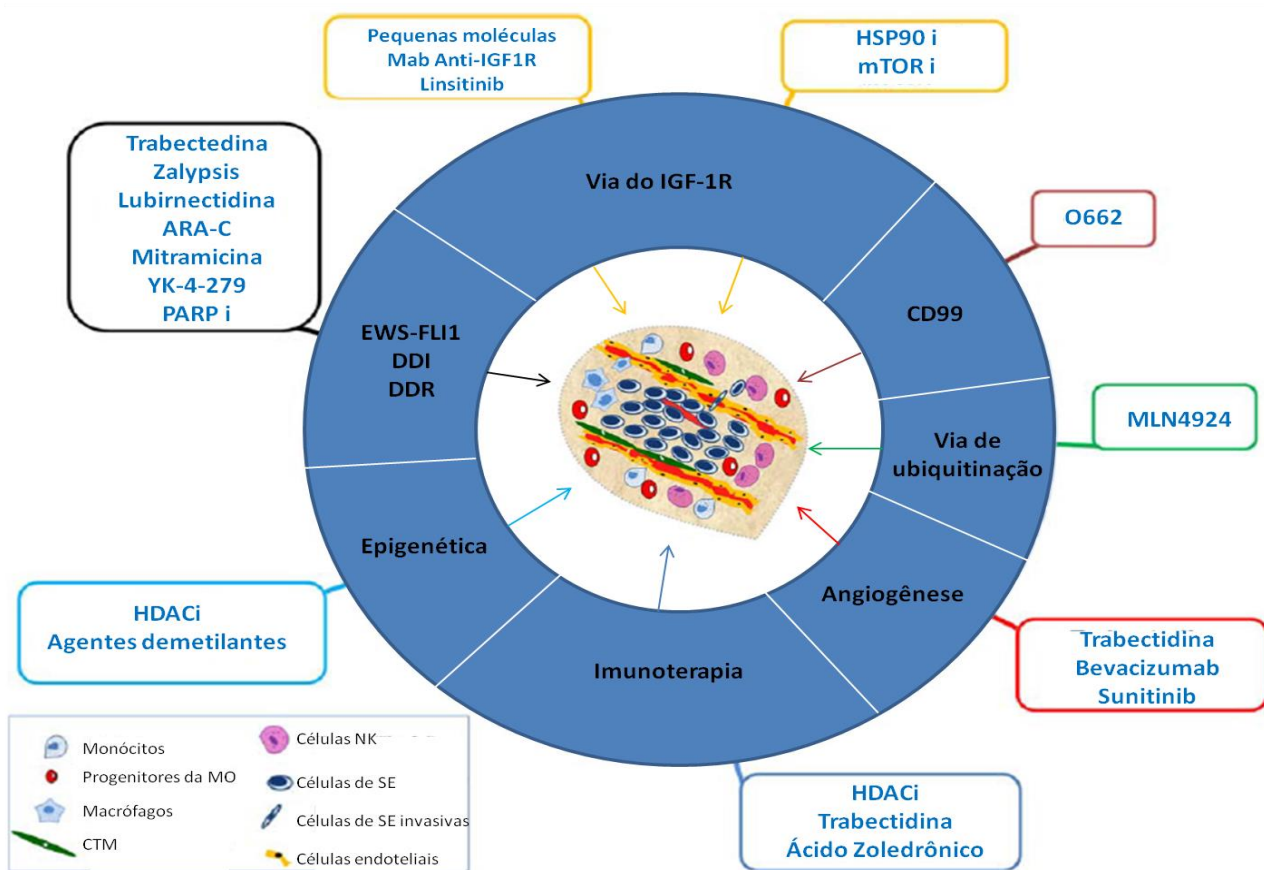


Figura 4: Esquematização das principais drogas utilizadas atualmente em pesquisa clínica e pré-clínica para SE. DDI significa indução de dano ao DNA, e HDACi significa inibidores de histona deacetilases. Fonte: adaptado de Amaral *et al.*, Adv Anat Pathol 2014. Original disponível em: <http://journals.lww.com/anatomicpathology/pages/articleviewer.aspx?year=2014&issue=01000&article=00005&type=abstract> (acessado em 17 de janeiro de 2015).

2. Neurotrofinas e seus receptores

2.1 Aspectos gerais

Os fatores neurotróficos, ou NTs, são proteínas secretadas pelas células as quais regulam quase todos os aspectos do desenvolvimento e função neuronal, mas, também, exercem papéis extremamente importantes em tecidos não neurais (REICHARDT, 2006). O fator de crescimento do nervo (NGF – *nerve*

grow factor do inglês) é o membro mais estudado e caracterizado da família das NTs (LEVI-MONTALCINI, 1987), o qual foi descoberto há mais de meio século (HAMBURGER & LEVI-MONTALCINI, 1949) e cada vez mais relacionado, atualmente, a condições fisiológicas e patológicas em seres humanos. O NGF está presente em maiores quantidades no sistema nervoso central (SNC), local em que apresenta função trófica no desenvolvimento e manutenção de neurônios colinérgicos, entre outras funções (DREYFUS, 1989).

Não menos importante, a segunda NT identificada, o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF – *brain derived neurotrophic factor* do inglês), assim como o NGF, possui uma gama de efeitos por todo o corpo. BDNF é fundamental no processo de estimulação neuronal, sendo crucial para o desenvolvimento e manutenção da memória. Além disso, a sinalização NT/Trk (sendo Trk a família de receptores desses fatores) funciona como um sistema endógeno o qual protege os neurônios de insultos bioquímicos, isquemia transiente e injúria física (HUANG & REICHARDT, 2001).

Dois membros adicionais, neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5), foram identificados mais tarde (IBÁÑEZ, 1995), possuindo, também, papel na manutenção do SNC (CAI *et al.*, 2014). E, mais recentemente, duas novas NTs foram clonadas de peixes e designadas como NT-6 (GÖTZ *et al.*, 1994) e NT-7 (LAI *et al.*, 1998). Essas últimas não apresentam ortólogos em mamíferos; interagem, todavia, com os mesmos receptores.

NTs são sintetizadas por diferentes órgãos pelo corpo e são essenciais não apenas para a manutenção e propagação de sinais no SNC. NTs têm papel fundamental durante o desenvolvimento renal (CAROLEO *et al.*, 2014), dos linfócitos B (MELAMED *et al.*, 1996), eosinófilos (RAAP *et al.*, 2008), de células precursoras endoteliais da medula óssea (KERMANI *et al.*, 2005), desenvolvimento do coração (LIN *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2015) e dos músculos (COLOMBO *et al.*, 2013), remodelamento vascular (LY *et al.*, 2014) e diferenciação ovariana (DISSEN *et al.*, 1995). Além disso, células tronco embrionárias expressam TrkB e TrkC; a sua sobrevivência e capacidade clonal depende, por isso, da expressão de seus ligantes no meio circundante (HUANG & REICHARDT, 2001).

Os transcritos de NTs são sintetizados em precursores proteicos de tamanho similar (26 kDa), e são compostos de NT madura (13 kDa) adicionada a uma sequência peptídica na porção N-terminal. Esse composto é chamado de pró-neurotrofina (pró-NT), o qual pode ser clivado por proteases intracelulares ou extracelulares, gerando, por consequência, a NT madura (TENG *et al.*, 2010) (Figura 5).

2.2. Os receptores de neurotrofinas

As NTs ligam-se a duas classes de receptores completamente distintas: Trks e p75NTR. Em mamíferos, a família de receptores tirosina cinases Trk (do inglês: *tropomyosin receptor kinase*) constitui uma das maiores classes de receptores de NTs. Cada NT terá uma maior afinidade a um tipo específico de Trk. Ou seja, NGF liga-se a TrkA (KLEIN *et al.*, 1991), TrkB é ativado por BDNF e NT-4/5 (SQUINTO *et al.*, 1991) e NT-3 ativa TrkC (LAMBALLE *et al.*, 1991) (Figura 5). Apesar dessa certa seletividade, entretanto, estudos em linhagens celulares apontam a possibilidade de promiscuidade entre esses ligantes e todos os três receptores (TrkA, TrkB e TrkC) cuja ativação é dependente da concentração de NTs e do tipo celular o qual estão expressos (CHAO, 2003). Nessa linha de pensamento, estudos adicionais mostraram que NT-3 pode ativar, embora com menor eficiência, tanto TrkA quanto TrkB (KAPLAN & MILLER, 2000).

A expressão e ativação de Trks também pode ser influenciada por um número de diferentes sistemas coexpressos pela célula. Receptores esteroides, receptores acoplados à proteína G, e outros receptores tirosina cinases podem ativar Trks e suas vias à jusante, como PLC γ e PI3K, mesmo na ausência de NTs (CHAO, 2003).

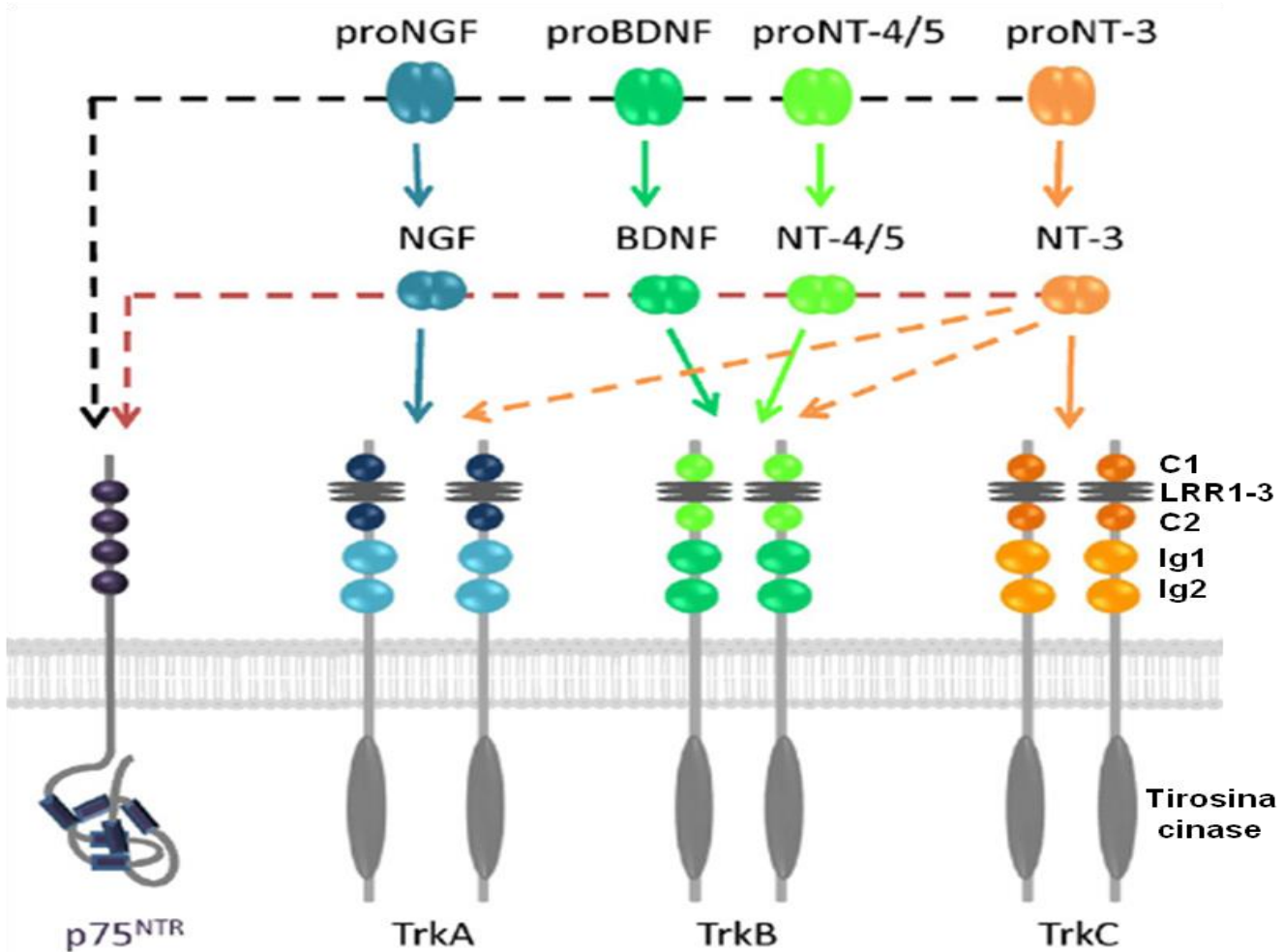


Figura 5: Interações com os receptores de NTs. A figura ilustra as principais interações de cada uma das quatro NTs de mamíferos. Cada NT liga-se a p75NTR, mas exibem maior especificidade aos receptores Trks. Da mesma forma, as pró-NTs são capazes de ativar p75NTR. Após o processo de maturação das pró-NTs, cada NT madura exibe interações mais específicas com um dos três receptores Trks. NGF liga-se especificamente a TrkA; BDNF e NT-4/5 reconhecem TrkB; NT-3 reconhece TrkC. Em alguns contextos celulares, NT-3 é capaz de ativar TrkA e TrkB com menor eficiência. Fonte: adaptado de Hondermarck H., Cytokine Growth Factor Rev 2012. Original disponível em: <http://www.cgfr.co.uk/article/S1359-6101%2812%2900043-3/abstract> (acessado em 21 de janeiro de 2015).

Trks são receptores tirosina cinase típicos cuja ativação induz homodimerização e autofosforilação recíproca dos domínios cinases intracelulares (HUANG & REICHARDT, 2001). Esses receptores são ativados, especificamente, pelas formas maduras e não pelas pró-NTs providas da transcrição gênica (LEE *et al.*, 2001) (Figura 5). Em vista disso, as proteases que controlam o processamento das NTs também controlam, consequentemente, a resposta aos receptores. Além disso, endocitose e transferência de receptores Trks entre diferentes compartimentos de membrana ajudam no controle, eficiência e duração da sinalização celular, em parte porque muitas proteínas adaptadoras e propagadoras do sinal estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (YORK *et al.*, 2000).

Estruturalmente, o domínio extracelular de cada Trk consiste em uma região rica em cisteína (C1), seguida por três repetições ricas em leucina (LRR1-3), outra região rica em cisteína (C2), e dois domínios Ig-like (Ig1 e Ig2) (Figura 5). Esses últimos são os responsáveis pelas interações com as NTs. Cada receptor apresenta uma região transmembrana a qual termina em uma tirosina cinase citoplasmática contendo um domínio cercado por diversos resíduos de tirosina, os quais servem como locais de ligação para adaptadores citoplasmáticos e enzimas. Faz-se importante o estudo detalhado de cada receptor, uma vez que seu bloqueio pode ser importante no controle de diversas patologias, como o câncer.

Além dos Trks, existe outro receptor importante na sinalização desencadeada pelas NTs, especialmente NGF: o p75NTR. Estruturalmente, p75 é um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF); regula, porém, a função de Trks em diversos níveis. p75NTR, por exemplo, liga-se a NTs na presença de Trks, ajudando a inibir a ligação de NT não preferenciais, aumentando a ativação de Trks por suas NTs preferenciais (ROUX & BARKER, 2002). Além disso, p75NTR potencializa a ativação de TrkA sobre baixas concentrações de NGF (BIBEL *et al.*, 1999). Em vista de suas funções, estudos mostraram que déficits sensoriais são vistos em camundongos desprovidos de p75NTR (STUCKY & KOLTZENBURG, 1997).

Formas imaturas e não processadas de NTs (pró-NTs), as quais são produzidas em condições cerebrais patológicas, entretanto, têm a capacidade de se ligarem a p75, transmitindo um sinal de “morte” pela via JNK cinase (REICHARDT, 2006) (Figura 6). Tal via, quando ativada, é incapaz de ser revertida pela ativação de Trks, levando os neurônios a entrarem, conseqüentemente, em processo de apoptose (HAREL *et al.*, 2010).

2.3. Sinalização celular ativada pelas neurotrofinas

A sinalização celular de Trks foi primeiramente descrita em linhagens PC12 de feocromocitoma de rato, e confirmada, posteriormente, em cultura primária de neurônios do sistema simpático. Utilizando o tratamento com NGF exógeno, células PC12 pararam de proliferar e entraram em processo de extensão

de neuritos, diferenciando-se em neurônios do sistema simpático, tornando-se indistinguíveis de sua forma original (GREENE & KAPLAN, 1995).

O domínio citoplasmático dos Trks contém diversas tirosinas as quais são substratos para fosforilação (Figura 6). Existem cinco resíduos intracelulares de tirosina os quais são fosforilados, mas apenas os resíduos Y496 e Y791 são responsáveis pela ativação de segundos mensageiros e, por conseguinte, propagação da sinalização intracelular. Quando ativados, esses resíduos recrutam uma grande variedade de proteínas adaptadoras, como SHC e PTB (SEGAL & GREENBERG, 1996). As principais vias ativadas pelos receptores Trk são Ras/MAPK, PI3K, PLC γ (HUANG & REICHARDT, 2003). Uma vez ativados, os três membros da família Trk perpetuam seu sinal por diversas rotas, o que dependerá, também das proteínas de ancoragem que ligarem nas tirosinas fosforiladas (HUANG & REICHARDT, 2003). A ativação dessas cascatas de sinalização resulta na ativação da transcrição e outros programas celulares os quais medeiam a proliferação, a plasticidade sináptica, o crescimento e reparação de neuritos, a prevenção da neurodegeneração, a manutenção sensorial dos neurônios, apoptose, entre outras características (LEE *et al.*, 2001; HUANG & REICHARDT, 2003). Ou seja, neurônios são inviáveis na ausência desses sinais.

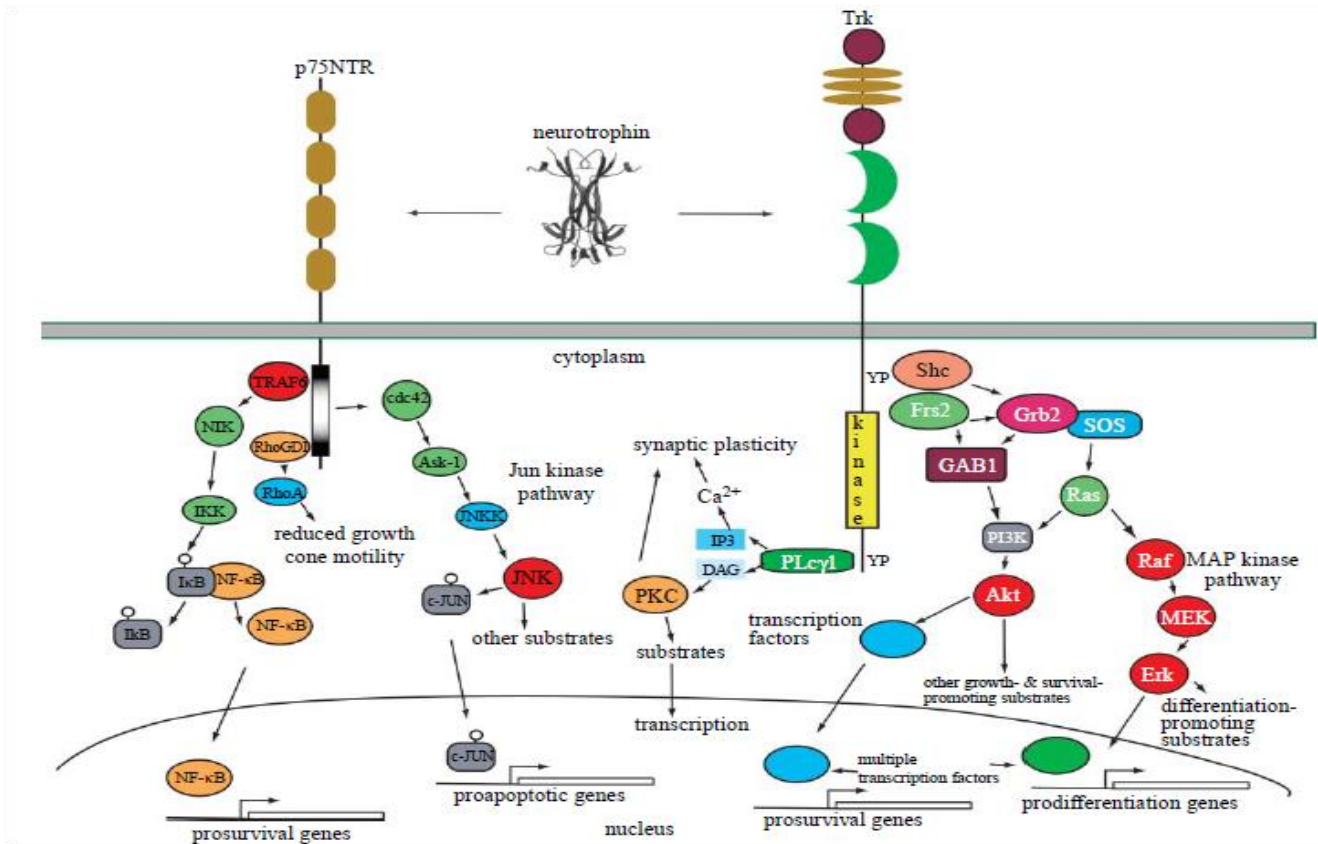


Figura 6: Vias canônicas da sinalização Trk. A figura mostra as principais proteínas adaptadoras e as vias de sinalização ativadas em resposta ao estímulo de Trks e p75NTR por seus ligantes. p75NTR regula NF-κB cuja ativação resulta na transcrição de inúmeros genes os quais promovem sobrevivência neuronal. A ativação de c-Jun a qual promove apoptose celular. Controla, também, a ativação de Rho, responsável pela motilidade e crescimento celular. Cada receptor Trk controla três vias principais: a ativação de Ras resulta na ativação de MAPK, promovendo diferenciação neuronal e crescimento de neuritos; a ativação de PI3K promove a sobrevivência e crescimento celular; a ativação de PLCγ resulta na ativação de PKC, promovendo plasticidade sináptica. Cada uma dessas vias regula a transcrição gênica e estão relacionadas, também, à gênese tumoral. Fonte: adaptado de Reichardt, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sc 2006. Original disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/361/1473/1545.long> (acessado em 22 de janeiro de 2015).

2.4. Neurotrofinas e câncer

Uma vez que o estudo da ativação de Trks pelas NTs mostrou a estimulação da neuritogênese, sobrevivência e migração em neurônios normais (DREYFUS, 1989; HUANG & REICHARDT, 2001; LEE *et al.*, 2001), pesquisadores perceberam que esses mesmos mecanismos poderiam ser utilizados por tumores, a fim de sobreviverem a insultos citotóxicos, proliferarem e gerar metástases. A partir dessa ideia, descobriu-se que Trks e NTs podem exercer um papel dualístico na oncogênese dos mais diversos tipos tumorais.

A primeira associação clínica entre Trks e câncer surgiu com o achado de rearranjos oncogênicos no gene de TrkA em carcinoma papilar e medular de tireoide (GIMM *et al.*, 1999). Mesmo nesses tipos de tumores, entretanto, a frequência de alterações genéticas nesses receptores é baixa, apesar de terem sido

identificadas, também, em outras neoplasias como como câncer de ovário, colorretal, melanoma, pulmão, leucemia mieloide aguda, neuroblastoma (REUTHER *et al.*, 2000; BARDELLI *et al.*, 2003; TACCONELLI *et al.*, 2004; MARCHETTI *et al.*, 2008; TOMASSON *et al.*, 2008; GEIGER *et al.*, 2011; HARADA *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2014).

Há vários anos, um grande número de estudos tem detalhado a expressão de Trks em diferentes tipos de tumores, correlacionando expressão com prognóstico ou estágio tumoral. Em neuroblastoma (NB) – o tumor em que mais há estudos relacionados a NTs/Trks – por exemplo, pacientes que apresentam tumores com elevados níveis de TrkA (NAKAGAWARA *et al.*, 1993) ou TrkC (YAMASHIRO *et al.*, 1996) têm um bom prognóstico; aqueles que apresentam altos níveis de TrkB, não obstante, têm um pior prognóstico (NAKAGAWARA *et al.*, 1994; ASGHARZADEH *et al.*, 2006). Do mesmo modo, a expressão de BDNF e TrkB é associada ao fenótipo metastático em pacientes com câncer colorretal (TANAKA *et al.*, 2014), e a pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico e câncer de pulmão não pequenas células (OKAMURA *et al.*, 2012; TANAKA *et al.*, 2014).

Apesar de os níveis NGF/TrkA estarem relacionados a um bom prognóstico em neuroblastoma, em outros tipos de tumores, porém, a história é diferente. Em colangiocarcinoma intraepático, por exemplo, altos níveis de NGF/TrkA promovem fenótipo tumoral invasivo e proliferativo (YANG *et al.*, 2014), relacionando-se, também, a metástases em carcinoma cístico adenoide (NONG *et al.*, 2010). Por outro lado, a ativação de TrkA relaciona-se a uma maior sobrevida livre de doença em câncer de mama (YOUSSEF *et al.*, 2014). Níveis elevados de TrkC estão associados a um melhor prognóstico em meduloblastoma e câncer de mama, adquirindo, também, papel de supressor tumoral em câncer colorretal (SEGAL *et al.*, 1994; LUO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Tais achados apontam, conseqüentemente, que a influência de NTs e Trks no prognóstico de tumores depende do tipo histológico sob análise, o que evidencia, ainda mais, a necessidade da determinação desses marcadores tumorais nos diversos tipos de neoplasias, principalmente àquelas que essa relação nunca foi explorada, como o SE.

Por isso, uma excelente estratégia para o estudo do papel de NTs em SE é verificar a inibição de Trks em células desse tumor. Neste trabalho, por exemplo, utilizamos um inibidor específico de TrkB

(ANA-12), que é a primeira pequena molécula descoberta a qual apresenta efeito antagônico seletivo ao TrkB (CAZORLA *et al.*, 2011). ANA-12 liga-se a TrkB, inibindo a cascata de sinalização induzida pelo BDNF. Além disso, verificamos a atividade *in vitro* de GW 4417560, que é uma molécula sintética a qual exibe alta seletividade e potência na inibição da atividade de tirosina cinase de TrkA (WOOD *et al.*, 2004). Por fim, verificamos a atividade de K252a, que é um pan-inibidor de Trks (inibe TrkA, TrkB e TrkC) (KNÜSEL & HEFTI, 1992). Tal molécula vem sendo utilizada em diversos estudos como potencial agente terapêutico contra diversos tipos de câncer (TANAKA *et al.*, 2014), além de ensaios clínicos randomizados (MARSHALL *et al.*, 2005).

2.4.1. BDNF/TrkB

A constatação de que NTs têm valor prognóstico no meio clínico levou pesquisadores a tentarem desvendar a influência e o mecanismo desses fatores a nível celular e molecular. Assim como em neurônios, a sobrevivência de células de NB expostas a drogas citotóxicas é mediada, em parte, pela ativação de a PI3K (JABOIN *et al.*, 2002) e Akt (LI *et al.*, 2005) via Trk. Esses estudos demonstraram que os efeitos dos agentes quimioterápicos são atenuados mesmo se o tumor que apresenta altos níveis de TrkB está presente em um ambiente com níveis baixos de BDNF. Da mesma forma, se o tumor apresenta baixos níveis de TrkB e estiver em um ambiente rico em BDNF, o efeito das drogas citotóxicas é menor. Células de NB que expressam TrkB sobrevivem em condições de limitação de fatores de crescimento (ENCINAS *et al.*, 1999), apresentam aumento da invasividade e aumentam a produção de VEGF (NAKAMURA *et al.*, 2006). Células de NB que sobrevivem a exposições de agentes citotóxicos expressam, também, níveis elevados de BDNF, sugerindo que a sinalização NT/Trk contribui para o fenótipo de resistência à quimioterapia (HO *et al.*, 2002). Nessa mesma linha, recentemente, nosso grupo de pesquisas apresentou, pela primeira vez, resultados apontando que a sinalização BDNF/TrkB é capaz de proteger células de câncer colorretal da inibição da via do EGFR por cetuximabe (DE FARIAS *et al.*, 2012).

Além disso, outros estudos apontam que hipóxia induz expressão de TrkB (MARTENS *et al.*, 2007). Ou seja, o microambiente tumoral rico em NTs permite a sobrevivência da célula cancerígena, a qual pode acarretar em recidiva tumoral. Essas características, apesar de serem descritas em outros tipos tumorais, devem ser levadas em consideração quando falamos em SE, uma vez que podem ter participação na resistência, recidiva e metástase dessa doença. Logo, inibir essas vias seria um passo essencial para desvendar o papel que as NTs apresentam na fisiologia celular desses tumores.

TrkB tem um papel importante, também, na geração metástases de células tumorais. BDNF estimula desagregação celular e aumenta a habilidade de células de hepatoma em degradar a matriz extracelular, facilitando a invasividade (ZHANG *et al.*, 2009), tal habilidade, da mesma forma, se expressa clinicamente em adenocarcinoma de pulmão (SINKEVICIUS *et al.*, 2014). Outros estudos mostraram que células de câncer colorretal as quais expressavam o receptor foram resistentes à anoikis (DAWSON *et al.*, 2015). Distintos trabalhos apresentaram o envolvimento dessa via na tumorigênese de câncer de ovário (ZHENG *et al.*, 2011), pâncreas (SCLABAS *et al.*, 2005), assim como câncer de próstata (FESTUCCIA *et al.*, 2007) e gástrico (ZHANG *et al.*, 2008).

BDNF estimula a neovascularização via recrutamento de células endoteliais progenitoras que expressam TrkB (KERMANI *et al.*, 2005), mostrando que células tumorais, via estimulação autócrina, são capazes de induzir angiogênese. Em carcinoma hepatocelular, a angiogênese é diretamente aumentada por VEGF, o qual é mediado, também, pela via BDNF/TrkB (LAM *et al.*, 2011). Tal efeito é abolido quando as células são tratadas com iRNA contra BDNF.

Em contraste com seus efeitos pró-tumorigênicos descritos, TrkB é associado a uma biologia e prognóstico favorável em carcinoma medular de tireoide (MCGREGOR *et al.*, 1999). Esse achado, apesar de raro nos diversos tipos de câncer, sugere que a resposta direcionada pelo TrkB é específico para cada tipo de célula.

2.4.2. NGF/TrkA

Assim como o BDNF/TrkB, a via NGF/TrkA está envolvida na regulação da sobrevivência, diferenciação e proliferação de células neuronais e não-neuronais (MOLLOY *et al.*, 2011), além de ter sua expressão detectada em uma grande variedade de tecidos e células neoplásicas (MACGROGAN *et al.*, 2006).

Ligando-se ao p75NTR, NGF inicia o recrutamento de vários adaptadores, os quais ativam a JNK levando à apoptose, e ativando a via NF- κ B para promover a sobrevivência celular. Pela ligação à TrkA, NGF inicia vias de sobrevivência, como a sinalização PI3K/AKT e Ras/Raf, e via da Ras/MAPK para promover proliferação e metástase (figura 6) (MACGROGAN *et al.*, 2006).

De maneira extremamente diferente do que ocorre com a expressão tumoral de BDNF/TrkB, a qual está relacionada quase que exclusivamente a mal prognóstico, metástase e progressão tumoral; a expressão e ativação de NGF/TrkA, todavia, têm um papel mais indefinido, apresentando, logo, tanto efeitos pró como antitumorais. Tal característica vai depender do tipo celular, podendo apresentar, porém, ambas as características em só tipo tumoral.

Como já apontado, a expressão elevada de TrkA em NB está associada a um bom prognóstico. Consistente com essa observação, uma alta expressão do mesmo receptor em células desse tumor está relacionada em diminuição da invasividade, do crescimento tumoral (WOO *et al.*, 2004) e diminuição da expressão de fatores de crescimento para angiogênese (EGGERT *et al.*, 2002).

NGF previne o crescimento tumoral de câncer de próstata através da regulação da inervação perivascular, a qual controla o volume sanguíneo que nutre o tumor. Ou seja, a administração subcutânea de NGF em camundongos nude suprime o crescimento desse câncer por uma via indireta, sem apresentar efeitos citotóxicos (GODA *et al.*, 2010). Em contraste, outros estudos mostram que NGF promove metástase nesse mesmo tipo de tumor, uma vez que a administração de gamaglobulina contendo anticorpos naturais contra NGF é capaz de inibir a migração celular (WARRINGTON & LEWIS, 2011). Para complementar, mais trabalhos apontam o papel de NGF na sobrevivência do câncer de próstata, o qual é revertido pela administração de testosterona (ANAGNOSTOPOULOU *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstraram que a expressão de TrkA está aumentada durante a progressão câncer medular de tireóide (MCGREGOR *et al.*, 1999). Além disso, o crescimento celular está associado ao NGF/TrkA em câncer de pâncreas (ZHU *et al.*, 2001). Do mesmo modo, foi demonstrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a estimulação de TrkA resulta em crescimento de câncer de mama, e a supressão do receptor promove, também, migração e invasão celular, aumentando, logo, o número de metástases em camundongos xenotransplantados (LAGADEC *et al.*, 2009).

Além do seu papel na fisiologia celular tumoral, acredita-se que NGF e seu receptor têm um papel importante como mediador da dor crônica (SCHAIBLE, 2015). Foi demonstrado que NGF está envolvido na invasão perineural, um processo no qual células tumorais invadem nervos vizinhos, desencadeando dor em diversas malignidades, incluindo câncer de mama, próstata e pâncreas (KOLOKYTHAS *et al.*, 2010).

NGF pode promover uma reorganização patológica de fibras sensoriais as quais expressam seu receptor. Por consequência, as terapias que previnem essa reorganização de fibras sensoriais podem fornecer um melhor conhecimento dos mecanismos que causam dor no câncer (MANTYH *et al.*, 2010).

Em um modelo animal de dor óssea induzida por câncer de próstata, tanto a administração preventiva, quanto a tardia de anticorpos monoclonais contra NGF, significativamente reduziram o comportamento nociceptivo dos animais, além de diminuir o brotamento de nervos sensitivos simpáticos (JIMENEZ-ANDRADE *et al.*, 2011). Outros estudos mostraram que a administração precoce e sustentada, ao invés da administração tardia e aguda de um inibidor de TrkA (ARRY-470) a camundongos, marcadamente atenuou a dor óssea causada pelo câncer e bloqueou significativamente, também, o brotamento de fibras nervosas sensoriais em ossos portadores de tumor (GHILARDI *et al.*, 2010).

Tem sido proposto que a inibição dessa via pode-se tornar um excelente método para bloquear a dor causada por tumores ósseos (GHILARDI *et al.*, 2010). Em se tratando de SE, em que o principal sintoma é a dor devido a destruição do tecido ósseo, uma inibição de TrkA poderia tanto aliviar a dor do paciente, quanto apresentar efeitos antitumorais.

2.4.3. Neurotrofinas e sarcoma de Ewing

Existem apenas sete trabalhos muito antigos relacionando SE e NTs. Tais trabalhos focaram-se em descrever o papel das NTs na fisiologia celular, além de verificarem a expressão dos receptores em um número pequeno de amostras de pacientes, sem, entretanto, apontarem essas vias como um possível alvo molecular para o tratamento da doença.

O primeiro trabalho, de 1989, apenas demonstrou que algumas linhagens de SE respondiam ao tratamento com NGF a nível molecular, aumentando, então, níveis de mRNA de c-fos (THOMSON *et al.*, 1989). Ao contrário, estudo posterior não observou aumento dos níveis c-fos, após tratamento com NGF em outras linhagens de SE, as quais expressavam TrkA a nível imunistoquímico (SUGIMOTO *et al.*, 1997). Ou seja, os estudos são antagônicos, não esclarecendo, pois, o papel de NGF em SE.

Outros estudos mantiveram seu foco na expressão dos receptores em biopsias de pacientes. O primeiro (DONOVAN *et al.*, 1993), utilizando anticorpo comum a todos os Trks (pan-Trk), revelou a expressão, a nível imunistoquímico, dos receptores (sem fazer distinção entre TrkA, TrkB e TrkC) em cinco amostras de um total de cinco. Autores afirmaram, então, que Trks podem ter papel essencial na patogênese do SE e, possivelmente, na diferenciação celular. O segundo estudo encontrou transcritos de Trk em 9 de 10 amostras de SE (4 de 5 biopsias e 5 das 5 amostras de tumores implantados em camundongos) (NOGUEIRA *et al.*, 1997). Os autores afirmaram que uma amostra de biopsia, a qual apresentava diferenciação neural, foi imunoreativa ao anticorpo contra pan-Trk. Esses estudos, apesar de pioneiros na expressão de Trks em SE, utilizaram uma quantidade baixa de amostras sem fazer uma distinção entre os receptores, o que aumenta a necessidade, logo, de uma melhor avaliação.

Por fim, os dois estudos mais recentes focaram-se no papel do NGF na diferenciação celular em SE. Kim *et al* (2002) mostraram que o tratamento de células de tumor de Askin (linhagem JK-GMS) com NGF levou a ativação do receptor, induzindo diferenciação e inibição do crescimento celular. Tal efeito foi abolido quando as mesmas células foram tratadas conjuntamente com K252a, que é um pan-inibidor de Trks. As células, porém, não responderam à BDNF, mantendo, por isso, especificidade ao NGF. Outro

estudo, porém, mostrou que NGF não induziu diferenciação e nem obteve efeitos na proliferação celular na linhagem RD-ES de SE (STURLA *et al.*, 2000).

Ou seja, apesar de ser um tumor com possível origem neuroectodérmica, o qual apresenta diversos marcadores neuronais, ainda não foi esclarecido o papel de NTs/Trks em SE. Os estudos são conflituosos ou utilizaram um número baixo de amostras; o que aumenta, por isso, a necessidade de uma melhor avaliação do papel dessas vias em SE, a fim de desvendar, pois, não só o papel de NTs/Trks na fisiologia tumoral, mas, também, encontrar um possível novo alvo molecular a ser explorado para o tratamento dessa doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, os efeitos sobre a proliferação e sobrevivência celular de NTs e inibidores de Trk, utilizando diferentes combinações dessas substâncias entre si e de associações com antineoplásicos clássicos utilizados no tratamento atual do SE.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Padronizar condições de crescimento em cultura das células de SE (linhagens SK-ES-1 e RD-ES);

3.2.2 Verificar a expressão proteica de NGF/TrkA e BDNF/TrkB, pela técnica de imunistoquímica, em lâminas selecionadas de blocos de parafina de amostras de tumores de pacientes com SE;

3.2.3 Verificar a expressão de mRNA de NGF/TrkA e BDNF/TrkB nas linhagens celulares SK-ES-1 e RD-ES;

3.2.4 Avaliar os efeitos da inibição das principais vias ativadas por Trks (PKC, PI3K e MAPK) nas linhagens;

3.2.5 Induzir resistência à quimioterapia clássica (vincristina, doxorrubicina e etoposídeo) na linhagem SK-ES-1 pelo método *stepwise*;

3.2.6 Determinar as curvas de dose dos fármacos antineoplásicos clássicos vincristina, etoposídeo e doxorrubicina, nas células SK-ES-1, RD-ES e nas quimiorresistentes (SK-ES-1R);

3.2.7 Determinar as curvas de dose de ANA-12 (inibidor de TrkB), GW 441756 (inibidor de TrkA) e K252a (pan-inibidor de Trks) nas células SK-ES-1, RD-ES e SK-ES-1R, assim como determinar o IC50 de cada agente;

3.2.8 Avaliar os efeitos celulares e moleculares do tratamento das células com K252a.

4. CAPÍTULO 1

Trk inhibition decreases cell proliferation and survival and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma cells

Situação: manuscrito publicado

Revista: Oncotarget

Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma

Tiago Elias Heinen^{1,2}, Rafael Pereira dos Santos^{1,2}, Amanda da Rocha^{1,2}, Michel Pinheiro dos Santos³, Patrícia Luciana da Costa Lopez^{1,2}, Marco Aurélio Silva Filho^{1,2}, Bárbara Kunzler Souza^{1,2}, Luís Fernando da Rosa Rivero⁴, Ricardo Gehrke Becker⁵, Lauro José Gregianin^{1,6,8}, Algemir Lunardi Brunetto⁷, André Tesainer Brunetto⁷, Caroline Brunetto de Farias^{1,7}, Rafael Roesler^{1,2}

¹Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Faculty of Health Sciences, UniRitter Laureate International Universities, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Department of Orthopaedics and Traumatology, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁶Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,

Brazil ⁷Children's Cancer Institute (ICI), Porto Alegre, RS, Brazil

⁸Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Rafael Roesler, e-mail: rafael.roesler@pq.cnpq.br

Keywords: TrkA, TrkB, neurotrophin, neurotrophin receptor, Ewing sarcoma

Received: October 05, 2015

Accepted: April 10, 2016

Published: April 26, 2016

ABSTRACT

Ewing sarcoma (ES) is a highly aggressive pediatric cancer that may arise from neuronal precursors. Neurotrophins stimulate neuronal development and plasticity. Here, we found that neurotrophins nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), as well as their receptors (TrkA and TrkB, respectively) are expressed in ES tumors. Treatment with TrkA (GW-441756) or TrkB (Ana-12) selective inhibitors decreased ES cell proliferation, and the effect was increased when the two inhibitors were combined. ES cells treated with a pan-Trk inhibitor, K252a, showed changes in morphology, reduced levels of β -III tubulin, and decreased mRNA expression of NGF, BDNF, TrkA and TrkB. Furthermore, combining K252a with subeffective doses of cytotoxic chemotherapeutic drugs resulted in a decrease in ES cell proliferation and colony formation, even in chemoresistant cells. These results indicate that Trk inhibition may be an emerging approach for the treatment of ES.

INTRODUCTION

Tumors of the Ewing sarcoma (ES) family are aggressive childhood cancers [1]. ES remains the second most common primary bone malignancy in the pediatric population, with an annual incidence of almost 3 cases per million people in the USA [2]. These tumors are characterized by highly aggressive, small round blue cells of the bone and soft tissue, genetically marked by gene fusions involving, most commonly, the *EWS* gene and a gene of the *ETS* family (primarily *FLI-1*) [1, 3]. The

malignant properties of ES have been attributed to *EWS/FLI1* proteins acting as aberrant transcription factors [4].

Before chemotherapy became available, only about 10% of patients with ES survived [1]. Advances in multimodality therapy, including aggressive neoadjuvant and adjuvant chemotherapy combined with surgery and/or radiation therapy, have improved long-term survival dramatically, with the 5-year survival of patients with localized disease reaching 70% [3, 5]. Unfortunately, almost 20% of patients have refractory or recurrent disease and approximately one-quarter to one-third present with

metastatic disease at diagnosis [1]. Despite many attempts to intensify treatments, survival remains poor in these patients.

Chemotherapy resistance has long been an assiduous challenge for oncologists treating patients with bone sarcomas [6]. Disease recurrence or progression due to treatment resistance of the primary tumor accounted for 60.3% of ES deaths among long-term (≥ 5 -year) survivors in North America who were followed for 20 years posttreatment [7]. However, attempts to attack ES with a higher chemotherapy dose-intensity have produced great morbidity in patients [8]. Therefore, many recent studies have focused on resolving the mechanisms of ES resistance [9–12].

Elucidation of the mechanisms of ES resistance, however, has been impeded by the elusiveness of the cellular origin of ES. Substantial evidence supports a neural cell origin [13–17], while other evidence supports a mesenchymal stem cell origin [18–20]. Analyzing the expression and function of tropomyosin receptor kinase (Trk) family receptors, which are highly expressed in cells of neural origin [21], on ES cells may inform the development of targeted ES therapies.

The endogenous ligands for Trks are neurotrophins, secreted proteins that play a major role in the survival, differentiation, and maintenance of neuronal populations [22]. Neurotrophins also mediate physiological actions outside of the nervous system, including regulating cardiac development, neovascularization, and immune system homeostasis [23]. The four known human neurotrophins — nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), and neurotrophin 4/5 (NT-4/5) — exert their effects by binding Trk subtypes A, B and C, or binding neurotrophin receptor p75NTR, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily [24]. Trk receptors have been identified as prognostic factors in pediatric malignancies of diverse origins, including neuroblastoma and medulloblastoma [25]. In addition, recent studies have shown that neurotrophins and their receptors are involved in the proliferation, invasiveness, angiogenesis, and drug resistance in various tumor types [25–29].

The potential involvement of neurotrophin receptors in ES has been suggested [21, 30–35], but remains poorly understood. Here, we verified whether Trk receptor inhibition can display anticancer activities in ES cells.

RESULTS

Neurotrophin and Trk mRNA expression in cell lines and protein content in tumor samples

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments confirmed detectable levels of mRNA transcripts for both NGF and BDNF, as well as for the TrkA and TrkB receptors in SK-ES-1 and RD-ES cell lines (Figure 1A, 1B). Subsequent analyses of immunohistochemically labelled NGF, BDNF, TrkA, and TrkB proteins in a set of seven tumor samples from

seven patients with ES revealed heterogenous expression of these proteins across tumor samples (Figure 1C–1G). BDNF was detected in all seven samples, involving, on average, 41.5% of imaged tumor cells. TrkB and NGF proteins were observed on average in 37% and 47% of imaged cells, respectively, in six of the seven samples. TrkA protein was detected in only two samples, in 40% of cells on average. Detailed reporting of the incidence (number of tumors) and distribution (percentage of tumor cells) of labelling for each antigen according to labeling strength/density are reported in detail in Table 1.

Inhibition of TrkA or TrkB reduce ES cell proliferation

Cell counting after 72-h treatments of RD-ES and SK-ES-1 cells with a range of doses of BDNF and NGF (0.1, 1, 10, 100, 200 ng/ml) revealed no effects on cell proliferation (Figure 2A, 2B). The lack of effect of BDNF and NGF was also observed under quiescent conditions (data not shown). When SK-ES-1 cells were exposed to the selective BDNF inhibitor Ana-12, there was a significant reduction in cell proliferation, relative to controls, at the doses of 5 μM ($p < .05$), 10 μM ($p < .01$), and 15 μM ($p < .001$; $\text{IC}_{50} = 23.28 \mu\text{M}$) (Figure 2D). Only the 15 μM dose of Ana-12 ($p < .05$) reduced cell proliferation of RD-ES cells significantly ($\text{IC}_{50} = 20.89 \mu\text{M}$) (Figure 2C).

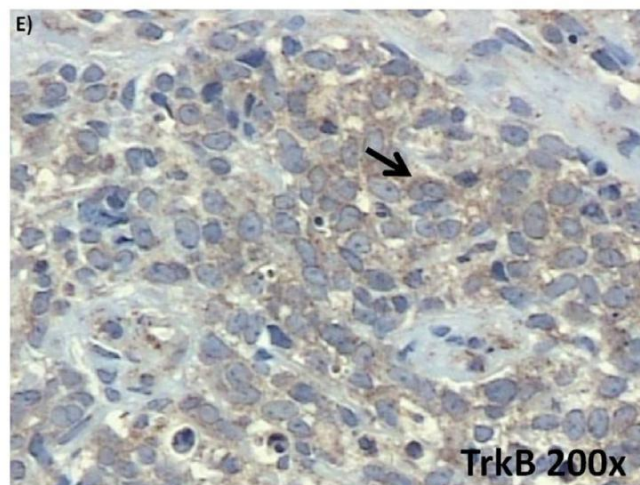
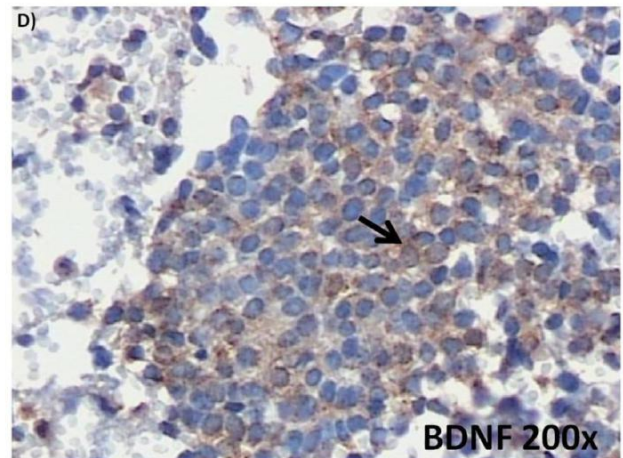
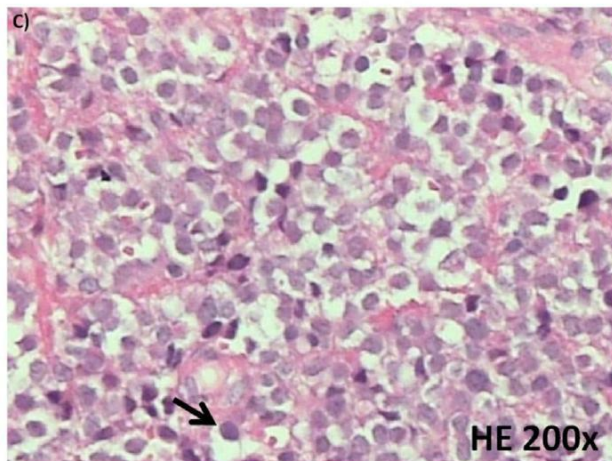
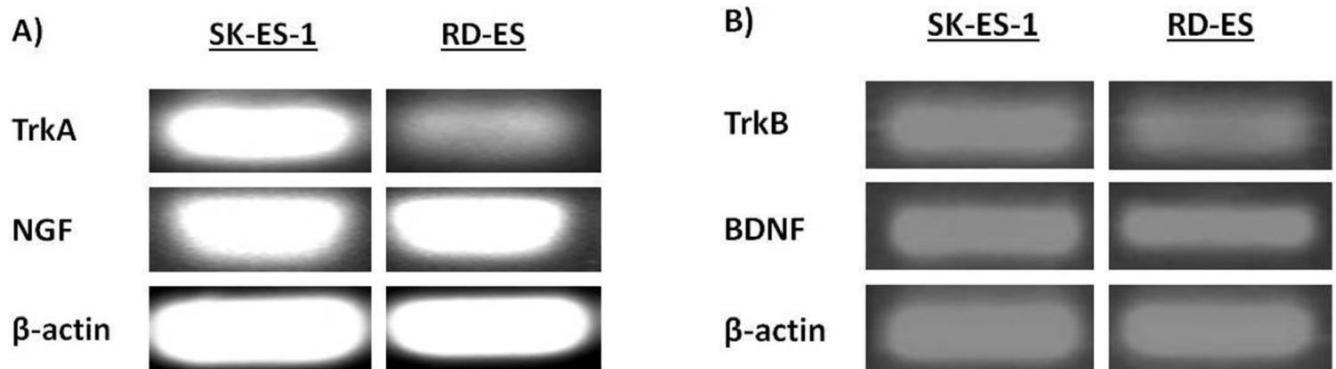
The specific TrkA receptor inhibitor GW 441756 reduced proliferation of SK-ES-1 cells at all doses tested [0.1 μM , ($p < .01$), 1 μM ($p < .001$), 5 μM ($p < .001$), 10 μM ($p < .001$), and 15 μM ($p < .001$; $\text{IC}_{50} = 1.13 \mu\text{M}$)] (Figure 2F) and reduced proliferation of RD-ES cells at all but the lowest dose [1 μM ($p < 0.05$), 5 μM ($p < 0.01$), 10 μM ($p < .001$), and 15 μM ($p < .001$)] ($\text{IC}_{50} = 1.94 \mu\text{M}$) (Figure 2E). It is noteworthy that the IC_{50} values were more than ten times greater for the TrkB receptor inhibitor than for the TrkA receptor inhibitor in both cell lines, indicating higher sensitivity to the TrkA receptor inhibitor.

Inhibition was even more pronounced in both cells with the pan-Trk receptor inhibitor K252a. After 72 h of treatment, SK-ES-1 cell proliferation was decreased, compared to controls, at K252a doses of 100 nM (K100) ($p < .001$) and 1000 nM (K1000) ($p < .001$) ($\text{IC}_{50} = 61.27 \text{ nM}$) (Figure 2H). In the RD-ES line, reductions in proliferation were also observed with 100 nM ($p < .001$) and 1000 nM ($p < .001$) K252a ($\text{IC}_{50} = 48.57 \text{ nM}$) (Figure 2G). K252a exhibited an inhibition potency that was almost 20 times higher than that of the TrkA receptor inhibitor GW 441756, which was the more potent selective inhibitor.

When SK-ES-1R cells were exposed to K252a (Figure 2I–2K), the K100 and K1000 groups had reduced cell proliferation, relative to controls, in cells resistant to Doxo ($\text{IC}_{50} = 60.75 \text{ nM}$), VP-16 ($\text{IC}_{50} = 48.66 \text{ nM}$), and VCR ($\text{IC}_{50} = 66.73 \text{ nM}$) (all $p < .001$). The results were similar to those obtained in non-resistant cells, demonstrating that sensitivity to Trk receptor inhibition was retained in the chemoresistant cells.

Table 1: BDNF, TrkB, NGF, and TrkA incidence, distribution, and density in 7 ES tumor samples

Antibody	Expression, N of 7 (%)				
	negative	weak focal	weak diffuse	moderate diffuse	strong diffuse
BDNF	0	0	4 (57.1)	3 (42.8)	0
TrkB	1 (14.2)	0	5 (71.4)	1 (14.2)	0
NGF	1 (14.2)	0	3 (42.8)	3 (42.8)	0
TrkA	5 (71.4)	0	1 (14.2)	1 (14.2)	0



(Continued)

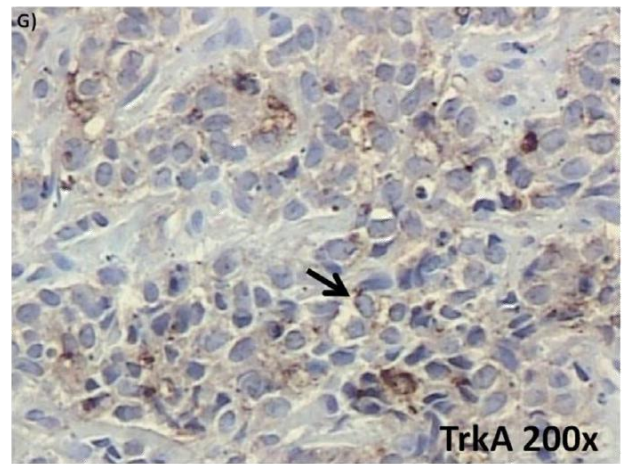
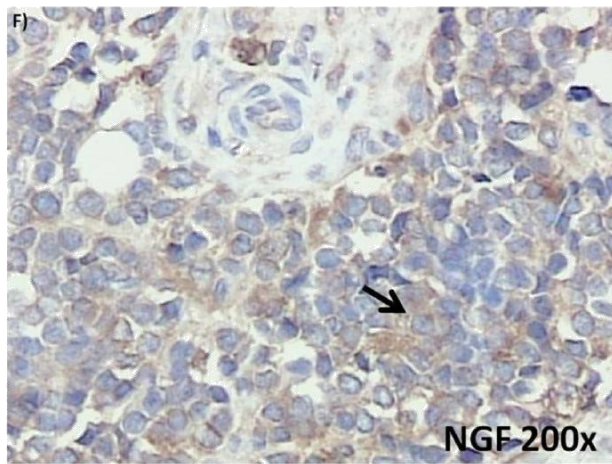
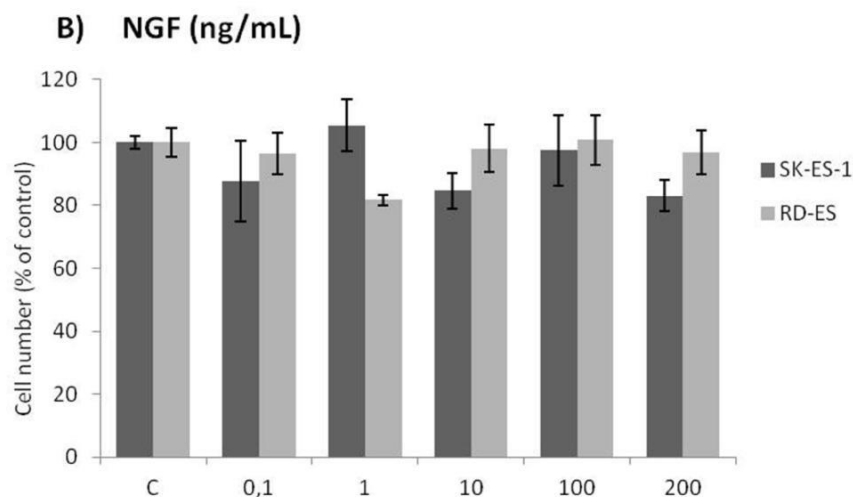
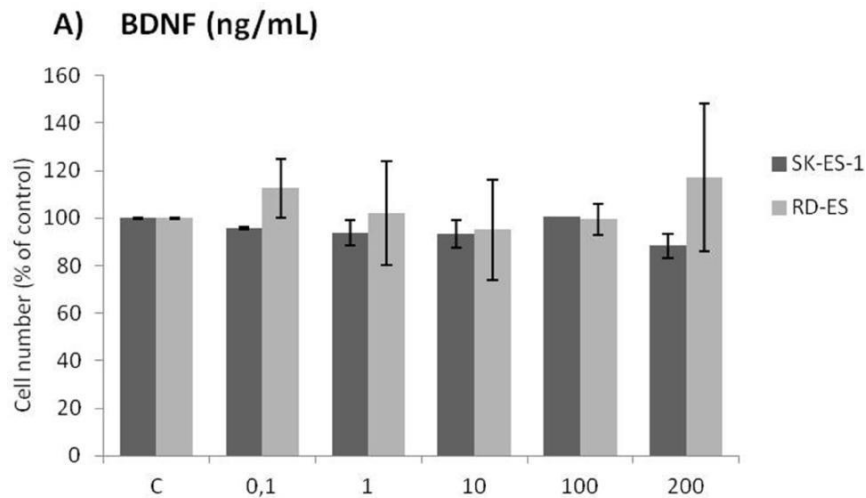
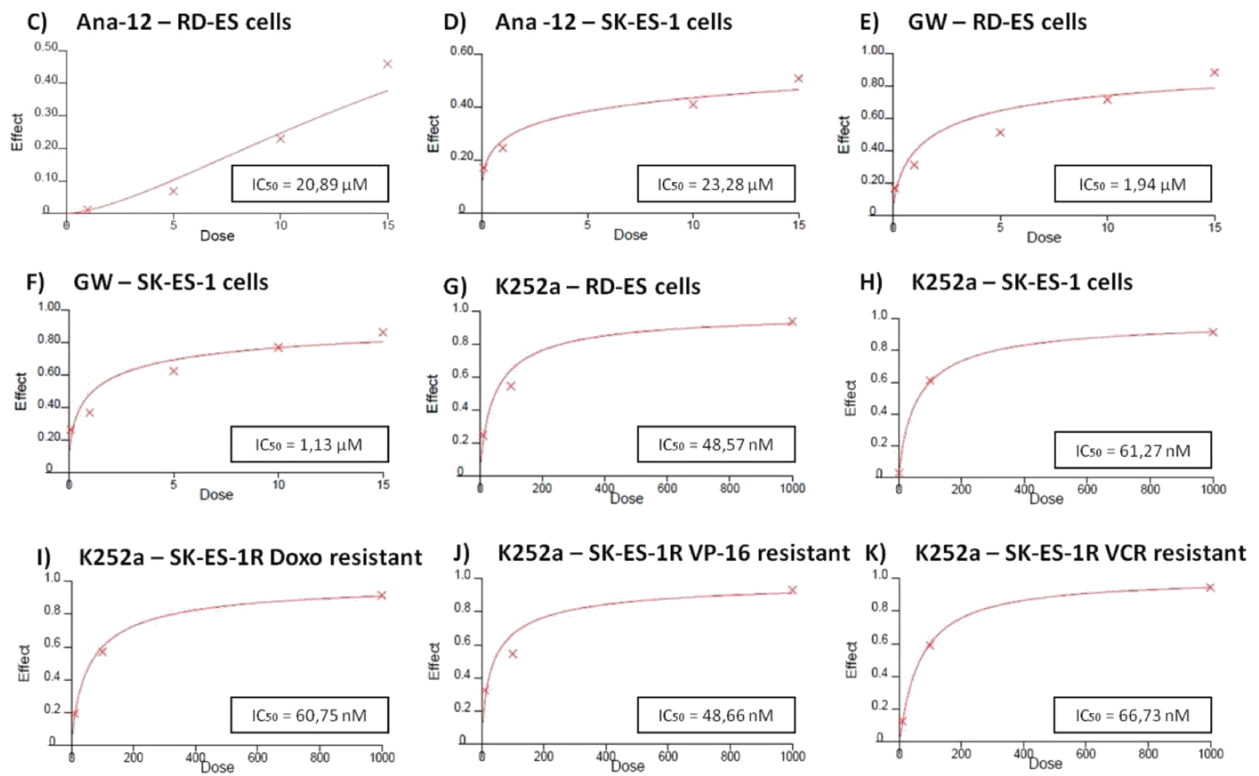


Figure 1: (Continued) Neurotrophin and Trk mRNA expression in cell lines and protein content in tumor samples. A. and B. Expression of NGF/TrkA and BDNF/TrkB mRNA transcripts in both examined ES cell lines, RD-ES and SK-ES-1. **C.** Representative example of HE-stained section of ES tumor sample demonstrating the small round blue cells that are characteristic of this tumor. **D-G.** Representative photomicrographs of ES sections immunolabeled for BDNF, TrkB, NGF, and TrkA, respectively. Arrows indicate labelled cells.



(Continued)



L) Ana-12 (μM) + GW (μM)

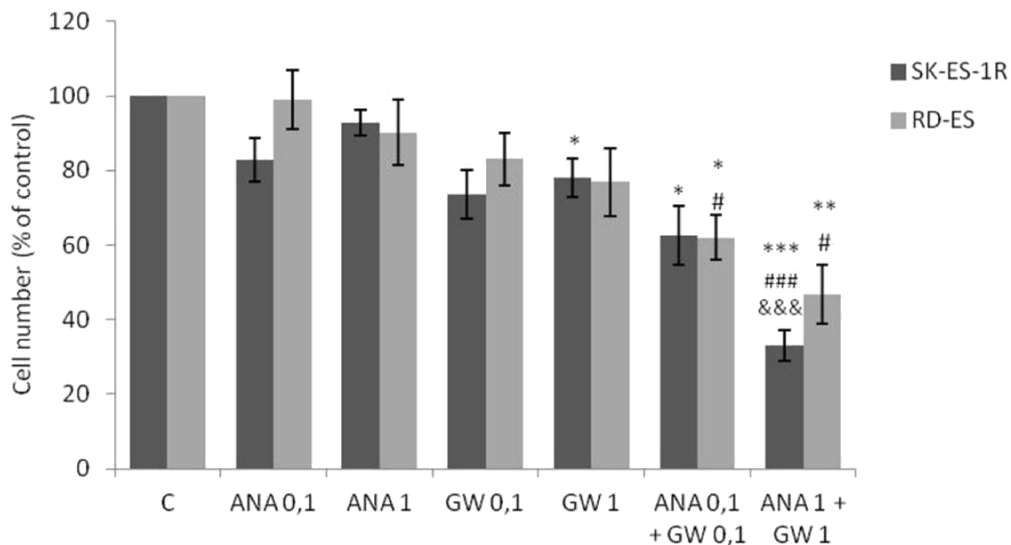


Figure 2: (Continued) Inhibition of TrkA or TrkB reduces ES cell proliferation. A, B. Cell proliferation after 72-h treatment with BDNF or NGF (0.1, 1, 10, 100, and 200 ng/mL) in RD-ES and SK-ES-1 cells (n = 3). C-J. Dose-response study of the TrkB-specific inhibitor Ana-12 (μM) (C, D) the TrkA-specific inhibitor GW 441756 (μM) (E, F) and the pan-Trk inhibitor K252a (nM) G-K, on tumor cell proliferation in human ES RD-ES, SK-ES-1, and SK-ES-1R cell lines. The IC_{50} for each drug was determined by trypan blue counting assay after 72 h treatments. Cell proliferation was assessed in triplicate, in at least three independent experiments. Effect (fraction affected vs. control) is plotted on the y-axis versus dose on the x-axis. The linear correlation coefficient r of the median-effect plot was >0.90 for all tested agents, ensuring measurement accuracy and conformity to mass-action. Positive controls (100% cell viability) are denoted as '0' effect on the y-axis. L. Cell counts following combination treatments of Ana-12 with GW 441756 (0.1 and 1 μM , 72 h; n = 3). * vs. control; # vs. respective Ana-12 dose; & vs. respective GW 441756 dose. Single, double, and triple symbols represent $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$, respectively.

Combined treatment of Ana-12 and GW 441756 produced more robust inhibition of cell proliferation at 0.1 μM and 1 μM than either inhibitor alone at the same doses in both cell lines (Figure 2L). These results are consistent with the observation of greater effectiveness of the pan-Trk receptor inhibitor K252a compared to selective TrkA and TrkB receptor inhibitors.

SK-ES-1 cells are affected by specific inhibitors of main pathways activated by Trks

The Trk-activated phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phospholipase C-gamma (PLC γ)/protein kinase C (PKC) intracellular signaling pathways are involved in vital cell growth and survival processes [36]. As shown in Figure 3, treatment of ES cells with inhibitors of PI3K (LY294002; $p < .05$), MAPK (UO 126; $p < .05$), or PLC γ /PKC (Gö 6983; $p < .01$) for 72 h resulted in significant reductions in proliferation.

Cell cycle, morphological, and mRNA expression changes in cells treated with K252a

Flow cytometry cell-cycle analysis after K252a treatment of SK-ES-1 cells for 24 h showed that at 100 nM, but not 1 nM, K252a increased the proportion of G1 cells and decreased the proportion of cells in S phase. Doxo was used as a positive control (Figure 4A). Morphological changes, with possible neurite extensions, were observed in cells exposed to 1000-nM K252a for 48 h (Figure 4B). Moreover, Trk inhibition led to a decrease in the protein expression of β -III tubulin, a neural differentiation marker associated with aggressiveness

in tumors. K252a at 100 and 1000 nM induced a mean decrease of 18% and 67% respectively in β -III tubulin relative to controls (Figure 4C–4E).

Significant decreases in the mRNA expression of NGF ($p < .05$), TrkA ($p < .01$), BDNF ($p < .001$), and ($p < .01$) were observed in SK-ES-1 cells treated with 100 nM K252a for 24 h (Figure 4F).

Antitumor effects of cytotoxic chemotherapeutic agents in human ES cell lines

RD-ES, SK-ES-1, and SK-ES-1R cells were exposed to increasing concentrations of standard clinical chemotherapeutic agents, namely vincristine (VCR) (1–5 nM), etoposide (VP-16) (0.1–0.4 μM), and doxorubicin (Doxo) (10–50 nM), for 72 h and trypan blue counting assays were performed (dose-response curves and IC₅₀ values are shown in Figure 2). SK-ES-1R cells — in which chemoresistance was induced by the stepwise method (see Materials and Methods) — had significantly higher IC₅₀ values (Figure 5C, 5F, and 5I) than non-resistant lines for all three of these chemotherapeutic agents.

Trk inhibition results in a synergistic enhancement of the antiproliferative effects of chemotherapeutic agents in ES cells

Addition of K252a to a 72-h treatment with a cytotoxic chemotherapeutic agent (VCR, Doxo, or VP-16) resulted in lower cell counts compared to treatments with each chemotherapeutic agent alone (Figure 6). For example, at a 1 nM dose, neither K252a nor VCR affected proliferation significantly. However, when a combined VCR + K252a treatment was used, cell numbers were

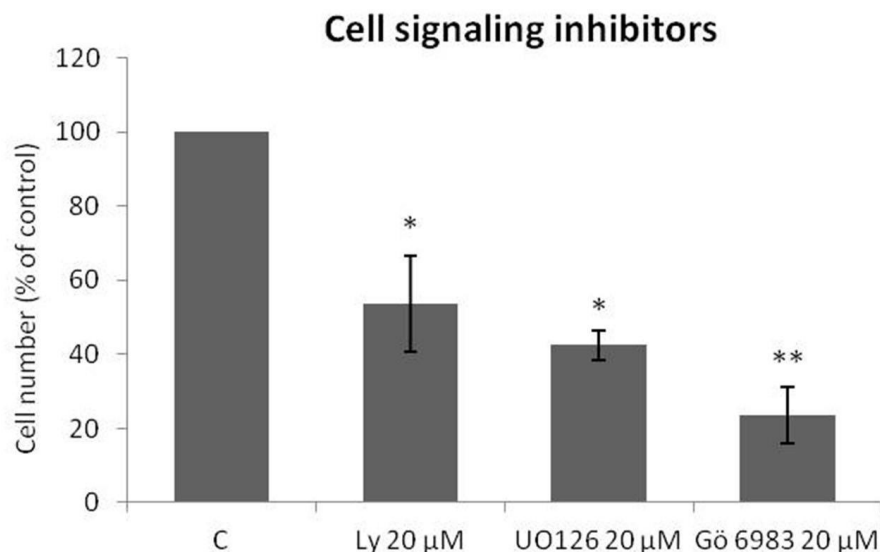
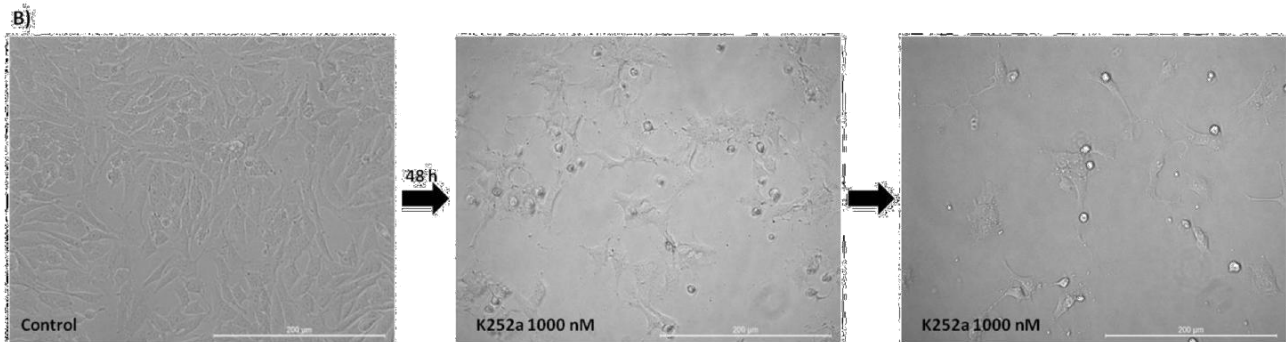
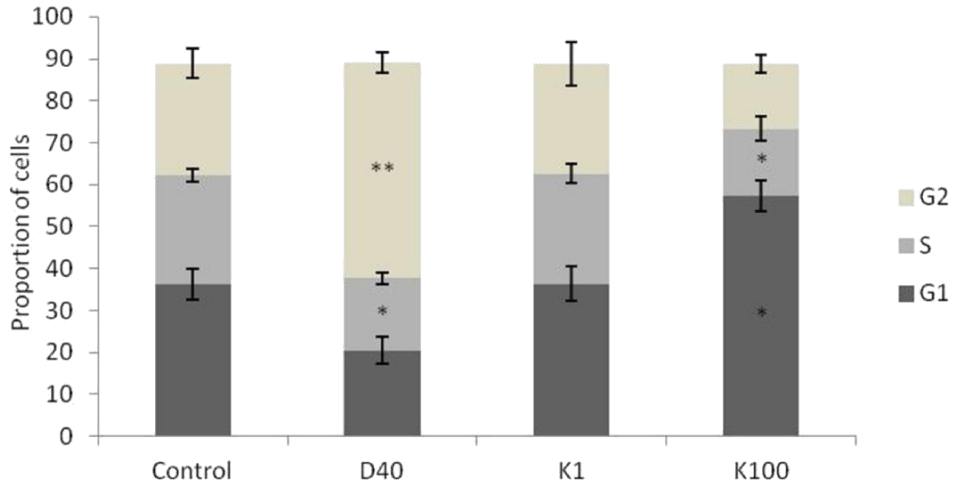
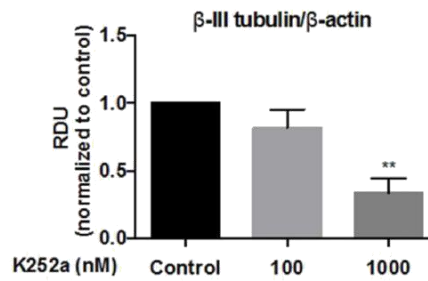


Figure 3: Specific Trk pathway inhibitors reduce SK-ES-1 cell growth. Cell proliferation, accessed by cell counting ($n = 3$), was reduced after 72-h treatment with 20 μM LY294002 (PI3K inhibitor; $p < .05$), UO 126 (MAPK inhibitor $p < .05$), or Gö 6983 (PLC γ /PKC inhibitor; $p < .01$) compared to controls.

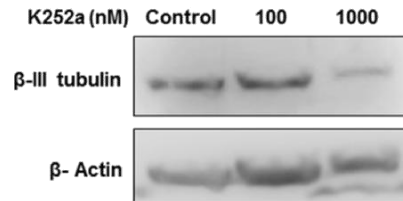
A) Cell cycle – SK-ES-1 cells



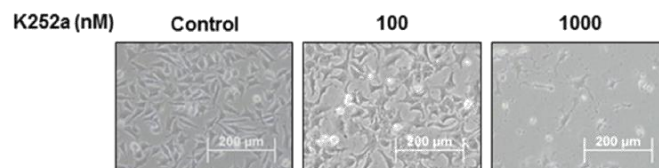
C)



D)



E)



(Continued)

F) mRNA expression of SK-ES-1 cells treated with K252a 100 nM

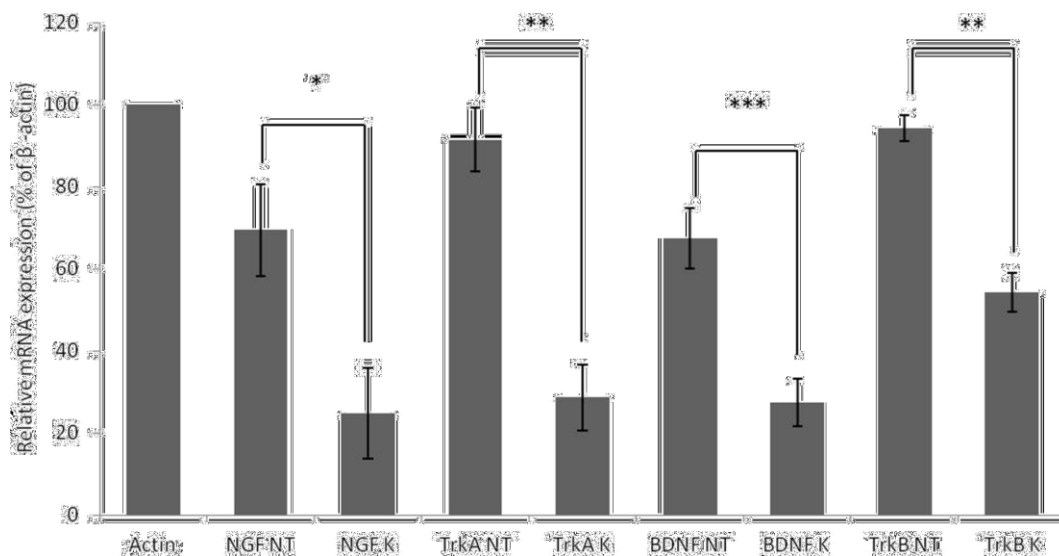


Figure 4: (Continued) Analyses of cell cycle, morphological changes, neuronal differentiation, and mRNA expression of cells treated with K252a. **A.** SK-ES-1 cells were treated with K252a at doses of 1 (K1) and 100 nM (K100) for 24 h. D40 represents 40 nM doxorubicin, positive control. G2-phase and S-phase proportions of cells were increased and decreased, respectively with 100 nM, but not 1 nM, K252a (n = 3). **B.** Image displaying morphological differences in SK-ES-1 cells treated with 1000 nM of K252a for 48 h. **C.** Trk inhibition decreases expression of the neural differentiation marker β -III tubulin. Protein levels of β -III tubulin were evaluated by immunoblotting (IB). Relative densitometric analyses were normalized by β -actin and corrected based on vehicle controls. K252a at 100 and 1000 nM induced a mean decrease of 18% and 67% respectively in β -III tubulin relative to controls ($p < .001$; n=3). **D.** Representative Western blot replicate of β -III tubulin levels after 48h of treatment with K252a. β -actin was used for loading control. **E.** Morphology of cells treated with 100 or 1000 nM K252a for 48 h. **F.** The mRNA expression levels of NGF ($p < .05$), TrkA ($p < .01$), BDNF ($p < .001$), and TrkB ($p < .01$) were reduced in SK-ES-1 cells treated with 100 nM K252a for 24 h (K) relative to levels in non-treated (NT) control cells (n = 3).

reduced significantly, with the resultant cell counts being 55% and 25% for SK-ES-1 and RD-ES respectively, of the numbers of cells observed after individual treatments (Table 2).

Trk inhibition enhances the antiproliferative effect of chemotherapeutic agents synergistically in ES chemoresistant cells

The antiproliferative effect of K252a in chemoresistant cells was similar to that seen in non-resistant cells (Figure 2). Notably, administration of K252a in combination with each of the tested chemotherapeutic agents (VCR, VP-16, and Doxo) also produced a synergistic antiproliferative effect in chemoresistant cells, indicating that Trk receptor inhibition can re-sensitize cells to chemotherapy (Figure 7, Table 3).

Treatment with chemotherapeutics plus K252a co-treatment reduces ES cell colony formation

Analyses of wells plated with cells that had been treated with drugs and allowed to grow for 10–14 days showed that treatments of K252a combined with either

Doxo (Figure 8A, 8B) or VCR (Figure 8C, 8D) reduced the number of colonies formed and the total area occupied by colonies in both SK-ES-1 and RD-ES cell lines.

Combined treatment of K252a with VP-16 had a reducing effect on the area occupied by colonies, but not colony number (Figure 8F).

DISCUSSION

In this report, we showed that the pan-Trk inhibitor K252a can change ES cell morphology, leading to decreased expression of NGF, TrkA, BDNF, and TrkB. K252a reduced the proliferation and survival of ES cells, and produced a synergistic effect when used in combination with chemotherapeutic agents at low doses, even in chemoresistant cells.

Conventional cytotoxic chemotherapy is ineffective in a quarter of patients with localized ES, and in three-quarters of patients with metastatic disease [1]. First-line therapy for localized disease consists of neoadjuvant chemotherapy, which entails a combination of four to six drugs (e.g. VCR, Doxo, VP-16, cyclophosphamide, ifosfamide, and dactinomycin) followed by local interventions with surgery and/or radiotherapy when

appropriate. Multimodal treatment can improve overall survival (up to 60–70%) in localized disease [37], however this improvement seems to have plateaued. These therapies are being administered at a maximum tolerated intensity. Therefore, raising cure rates may require a more biologically targeted approach, such as one that enhances the effectiveness of current modalities without worsening side effects [38]. Furthermore, relapsed/refractory ES remains uniformly fatal and novel approaches are urgently needed to deal with such cases [39].

Neurotrophins and their receptors play several roles in cancer. Neuroblastoma patients whose tumors have elevated TrkA [40] or TrkC [40, 41] expression have a better prognosis, than those who do not, whereas those with higher TrkB and BDNF levels have a particularly poor prognosis [42]. TrkB expression is also associated with a bad prognosis in patients diagnosed with Wilms tumor [43], but a favorable prognosis in medullary thyroid carcinoma [44].

Some studies have shown that tumor cells treated with BDNF are less sensitive to cytotoxic drugs [26, 45]. Moreover, neurotrophin signaling pathways may function as endogenous systems that protect neurons after biochemical insults, transient ischemia, or physical injury [45, 46]; in other studies, however, BDNF showed anti-cancer potential [47]. Neither BDNF nor NGF alone affected cell proliferation at any of the doses tested here. It is possible that ligand-independent neurotrophin receptor signaling occurs in ES. Alternatively, secretion of endogenous BDNF and NGF by the cells may be enough to activate neurotrophin signaling at optimal levels.

When low doses of selective TrkA and TrkB inhibitors were combined, we observed an increase in antiproliferative effects relative to either inhibitor alone. Also, a similar effect could be reached with nanomolar doses of the pan-Trk receptor inhibitor K252a and was observed in both chemoresistant and non-resistant ES cells. These findings indicate that the combined inhibition

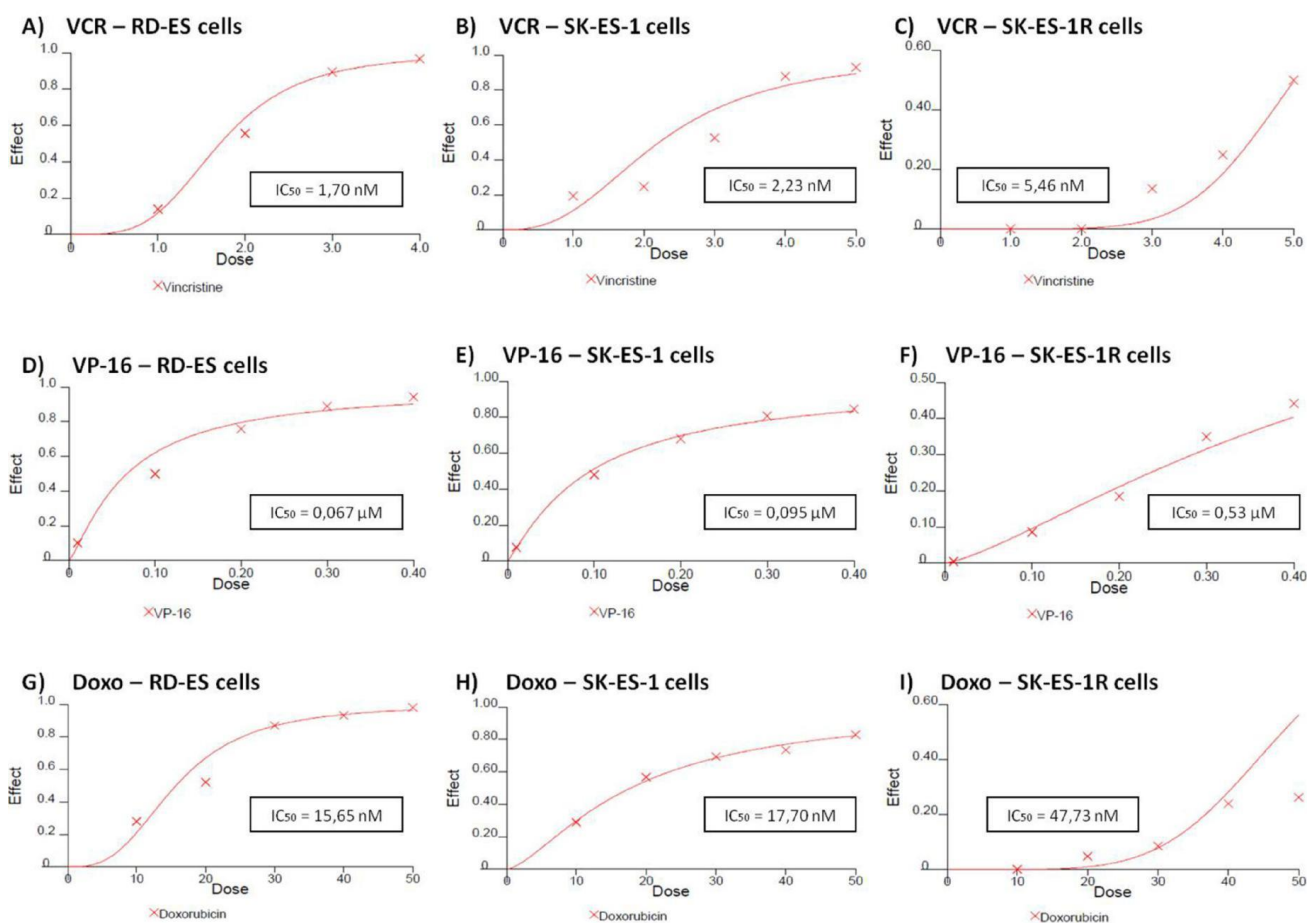


Figure 5: Reduced antitumor effects of VCR (nM) A, B, C. VP-16 (μM) D, E, F. and Doxo (nM) G, H, I. in chemoresistant ES cell line (SK-ES-1R) relative to two non-resistant cell lines. Dose-effect IC_{50} concentration curves with drug effect (fraction affected vs. control) represented on the y-axis and dose shown on the x-axis. Cell proliferation was assessed with the trypan blue counting assay after 72-h drug treatments in triplicate, in at least three independent series of experiments. Positive controls corresponding to 100% cell viability are denoted as '0' effect on the y-axis. The linear correlation coefficient r of the median-effect plot was >0.90 for all tested agents, indicating that the measurements were accurate and had conformity to mass-action. Doxo = doxorubicin; VCR = vincristine; VP-16 = etoposide.

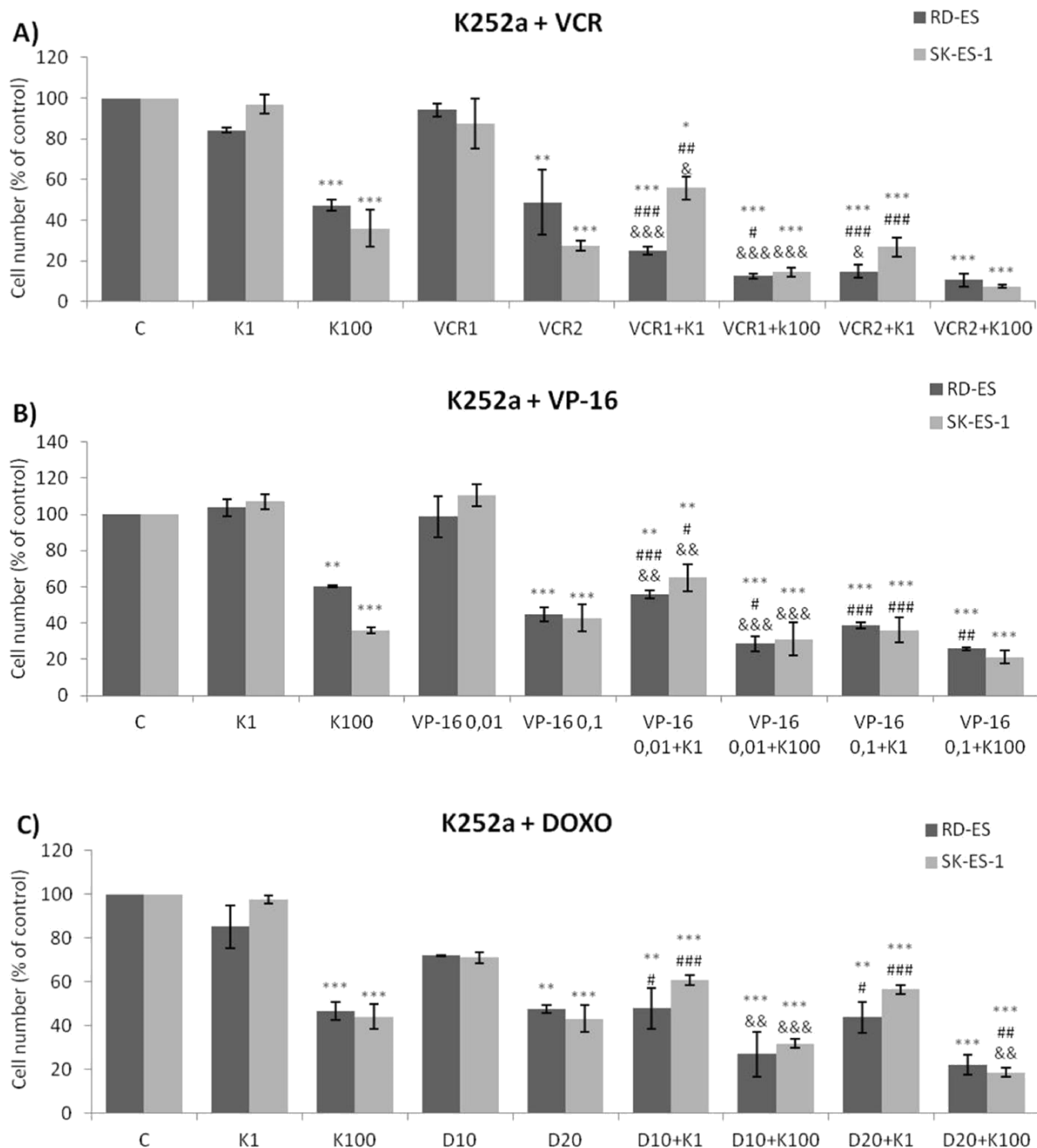


Figure 6: Trk inhibition enhanced the antiproliferative effects of Doxo, VP-16, and VCR synergistically in ES cells. A, B, C. Proliferation of cells treated with the chemotherapeutic agents VP-16 [0.01 (VP-16 0,01) and 0.1 (VP-16 0,1) μ M], VCR [1 (VCR1) and 2 (VCR2) nM], and Doxo [10 (D10) and 20 (D20) nM] alone or in combination with the Trk inhibitor K252a [1 (K1) and 100 (K100) nM]. All combination treatments produced significant decreases compared to controls; some showed further differences versus single treatment. * vs. control; # vs. respective K252a dose; & vs. respective chemotherapeutic dose. Single, double, and triple symbols represent $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$, respectively. See Table 2 for additional related data. SK-ES-1 treated with VCR (n = 4), VP-16 (n = 3), Doxo (n = 5). RD-ES treated with VCR (n = 3), VP-16 (n = 3), Doxo (n = 4), where n is number of independent experiments contributing to mean data shown. Doxo = doxorubicin; VCR = vincristine; VP-16 = etoposide.

Table 2: Combination index (CI) values calculated from cellular proliferation assays of SK-ES-1 and RD-ES cells treated with K252a, VCR, VP-16, and Doxo alone or in combination

Cell line	Drugs (concentrations)	CI	Interpretation	
RD-ES	VCR (1 nM) + K252a (1 nM)	0.440	Synergism	
	VCR (2 nM) + K252a (1 nM)	0.608	Synergism	
	VCR (1 nM) + K252a (100 nM)	0.734	Moderate synergism	
	VCR (2 nM) + K252a (100 nM)	0.891	Slight synergism	
	VP-16 (0.01 μM) + K252a (1 nM)	0.188	Strong synergism	
	VP-16 (0.1 μM) + K252a (1 nM)	0.531	Moderate synergism	
	VP-16 (0.01 μM) + K252a (100 nM)	1.037	Nearly additive	
	VP-16 (0.1 μM) + k252a (100 nM)	1.068	Nearly additive	
	Doxo (10 nM) + K252a (1 nM)	0.629	Synergism	
	Doxo (20 nM) + K252a (1 nM)	1.179	Slight antagonism	
	Doxo (10 nM) + K252a (100 nM)	0.892	Slight synergism	
	Doxo(20 nM) + K252a (100 nM)	1.210	Moderate antagonism	
	SK-ES-1	VCR (1 nM) + K252a (1 nM)	0.513	Synergism
		VCR (2 nM) + K252a (1 nM)	0.423	Synergism
VCR (1 nM) + K252a (100 nM)		0.596	Synergism	
VCR (2 nM) + K252a (100 nM)		0.407	Synergism	
VP-16 (0.01 μM) + K252a (1 nM)		0.216	Strong synergism	
VP-16 (0.1 μM) + K252a (1 nM)		0.706	Moderate synergism	
VP-16 (0.01 μM) + K252a (100 nM)		0.644	Synergism	
VP-16 (0.1 μM) + k252a (100 nM)		0.688	Synergism	
Doxo (10 nM) + K252a (1 nM)		0.777	Moderate synergism	
Doxo (20 nM) + K252a (1 nM)		1.364	Moderate antagonism	
Doxo (10 nM) + K252a (100 nM)		1.017	Nearly additive	
Doxo (20 nM) + K252a (100 nM)		0.717	Moderate synergism	

of TrkA and TrkB shows higher efficacy compared to inhibiting either receptor alone.

Previous studies in other solid tumor types have indicated that blocking either TrkA or TrkB may produce antitumor effects [29, 36]. For example, Lee and colleagues [48] showed that colorectal tumors positive for TrkA expression presented *NTRK1* rearrangements. In addition, proliferation of *NTRK1*-rearranged patient-derived cells was profoundly inhibited by entrectinib, a pan-TRK inhibitor, and such inhibition was associated with inactivation of TrkA, and down-regulation of downstream signaling pathways.

Low doses of chemotherapeutics with differing mechanisms of action had which had no effect when given alone, but reduced cell proliferation when used together

with K252a. A similar effect was seen in a recent study evaluating the efficacy of combining Doxo with an AXL receptor inhibitor (another tyrosine kinase) [49], wherein it was suggested that the synergistic effect depends on the dose and drugs used. Importantly, the fact that similar results were obtained with chemoresistant cells in our study suggests that K252a may be able to subvert general mechanisms of tumor resistance in ES.

Thompson and Levin [50] showed that the morphology of RGC-5 cells (transformed cells expressing surface markers characteristic of neuronal precursor cells similar to ES cells) is changed following treatment with 1000 nM K252a. Similar to the present study, they observed neurite extension following treatment. The fact that this observation occurred in both normal and

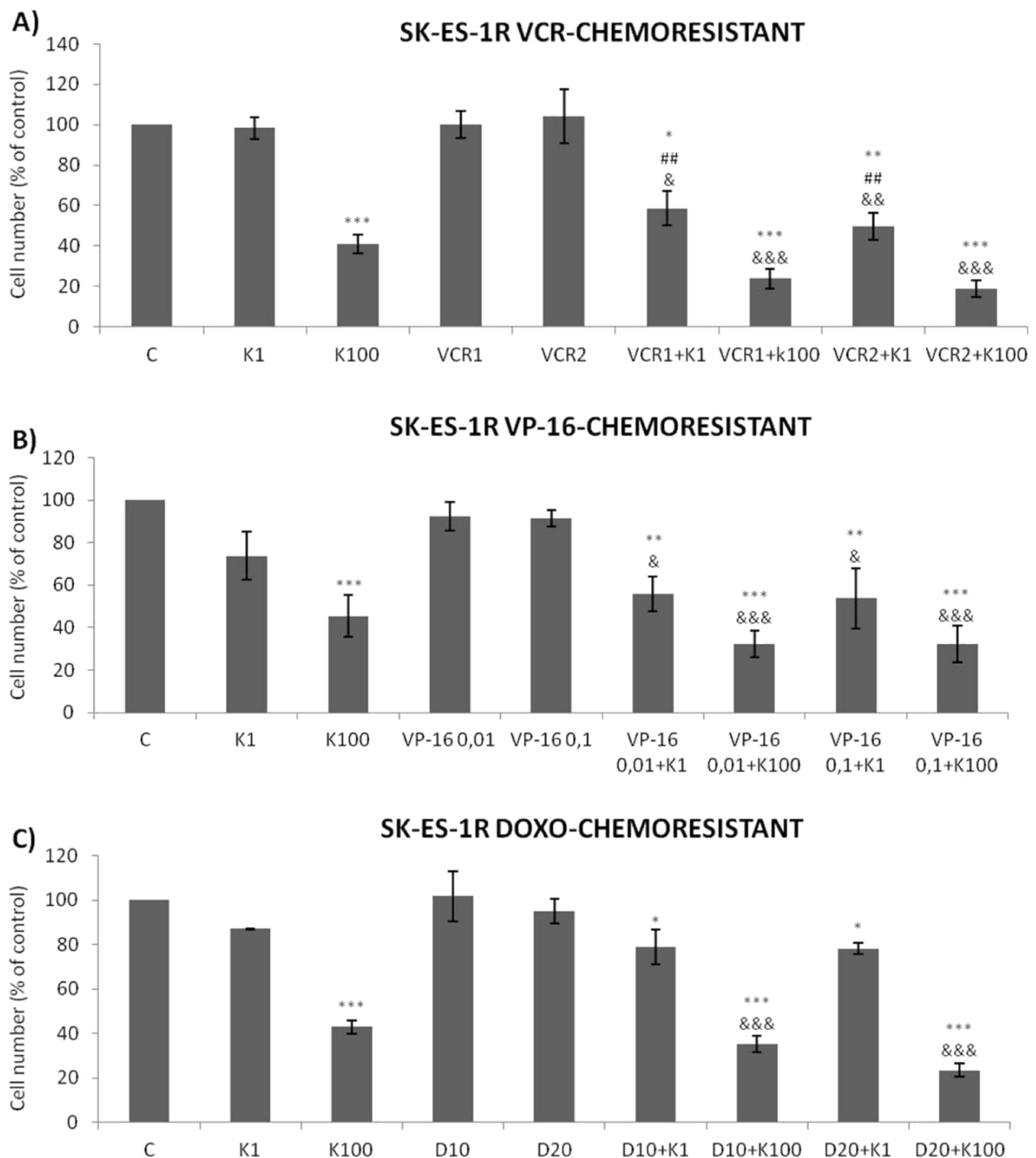
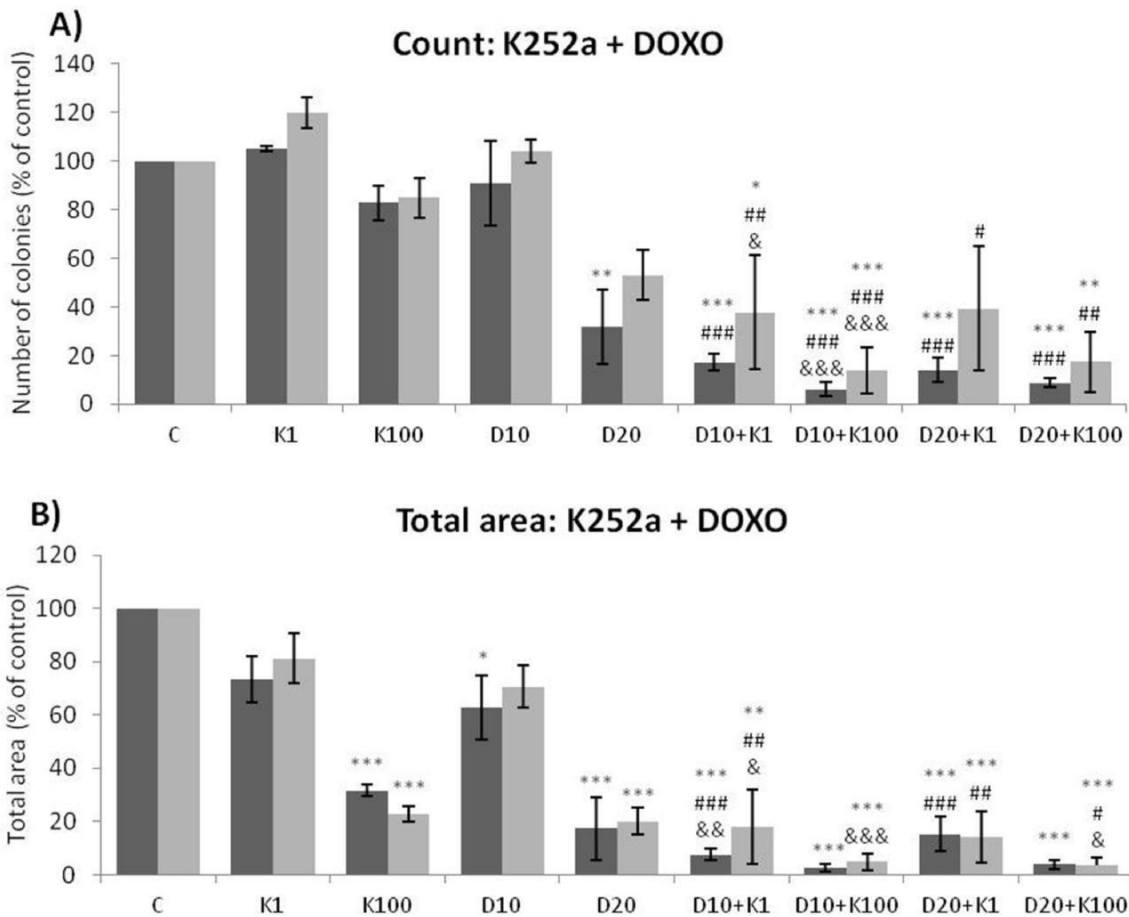


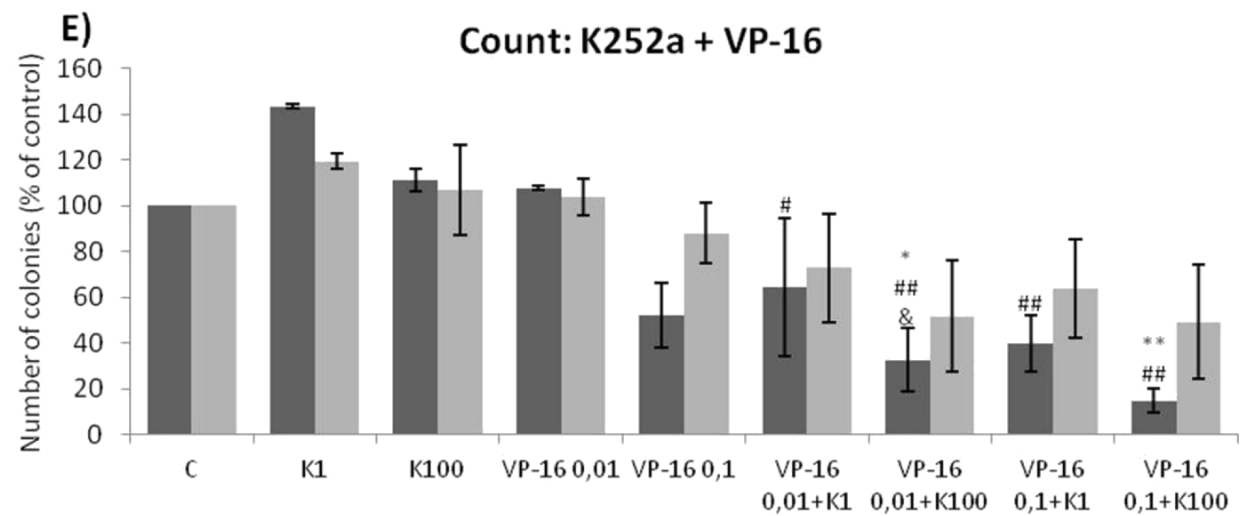
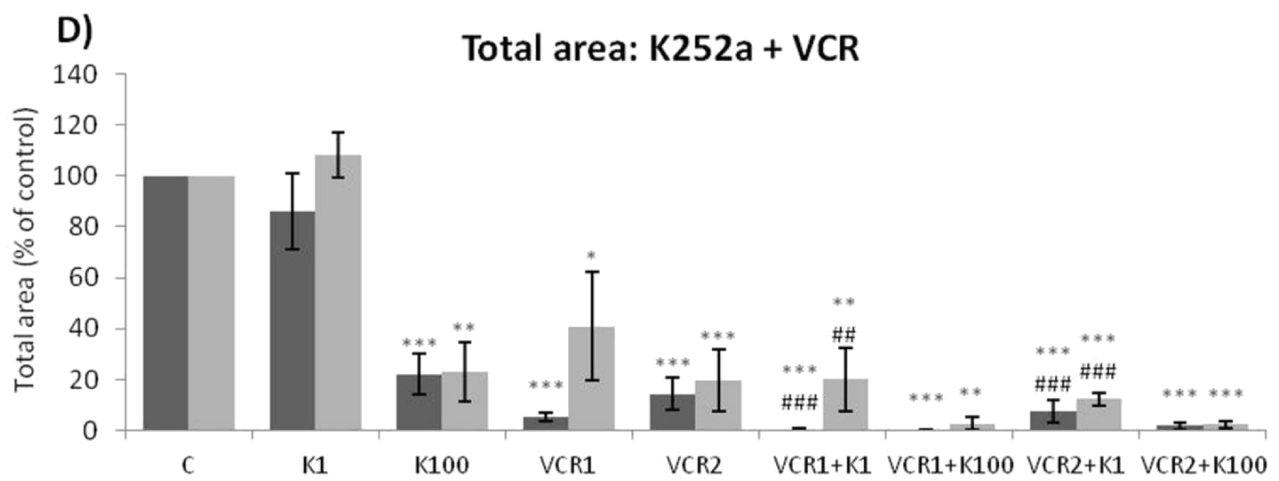
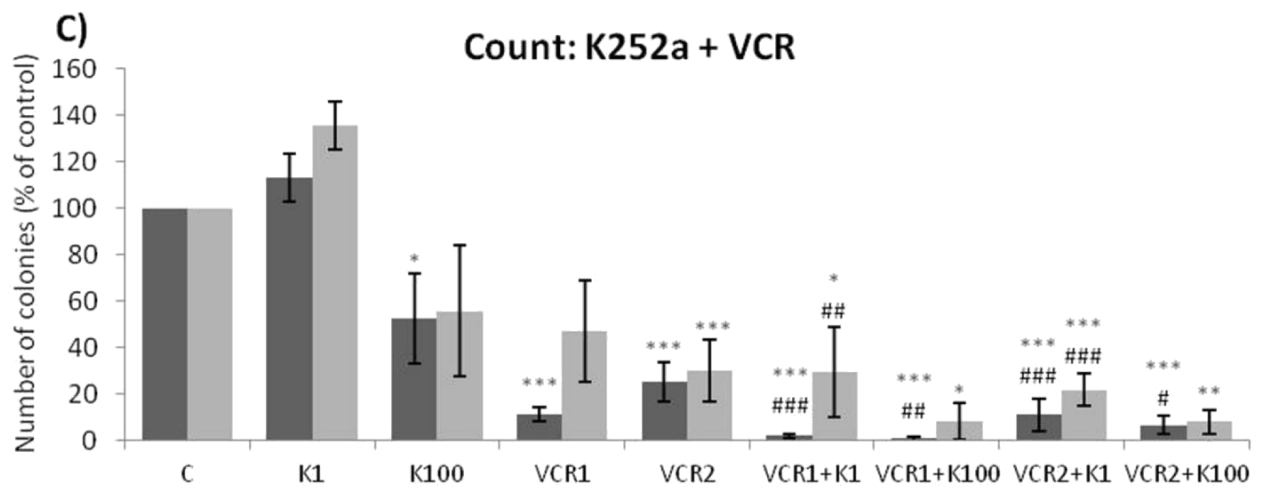
Figure 7: Trk inhibition enhances the antiproliferative effects of VCR, VP-16 and doxorubicin synergistically in chemoresistant ES cells. A-C. Cells were treated and analyzed as in Figure 6. All adjuvant treatments produced significant reduction in cell proliferation compared to non-treated controls; some differed significant from single treatments. * vs. control; # vs. respective K252a dose; & vs. respective chemotherapeutic dose. Single, double, and triple symbols represent $p < .05$, $p < .01$, $p < .001$, respectively. See Table 3 for additional related data. SK-ES-1R treated with VCR (n = 4), VP-16 (n = 3), Doxo (n = 3), where n is number of independent experiments contributing to mean data shown. Doxo = doxorubicin; VCR = vincristine; VP-16 = etoposide.

Table 3: Combination index values (CI) values calculated from cellular proliferation assays of SK-ES-1R chemoresistant cells treated with K252a, VCR, VP-16, and Doxo alone or in combination

Drugs (concentrations)	CI	Interpretation
VCR (1 nM) + K252a (1 nM)	0.218	Strong synergism
VCR (2 nM) + K252a (1 nM)	0.573	Synergism
VCR (1 nM) + K252a (100 nM)	0.381	Synergism
VCR (2 nM) + K252a (100 nM)	0.588	Synergism
VP-16 (0.01 μM) + K252a (1 nM)	0.094	Very strong synergism
VP-16 (0.1 μM) + K252a (1 nM)	0.697	Synergism
VP-16 (0.01 μM) + K252a (100 nM)	0.229	Strong synergism
VP-16 (0.1 μM) + k252a (100 nM)	0.798	Moderate synergism
Doxo (10 nM) + K252a (1 nM)	0.344	Synergism
Doxo (20 nM) + K252a (1 nM)	0.605	Synergism
Doxo (10 nM) + K252a (100 nM)	0.995	Nearly additive
Doxo (20 nM) + K252a (100 nM)	0.749	Moderate synergism



(Continued)



(Continued)

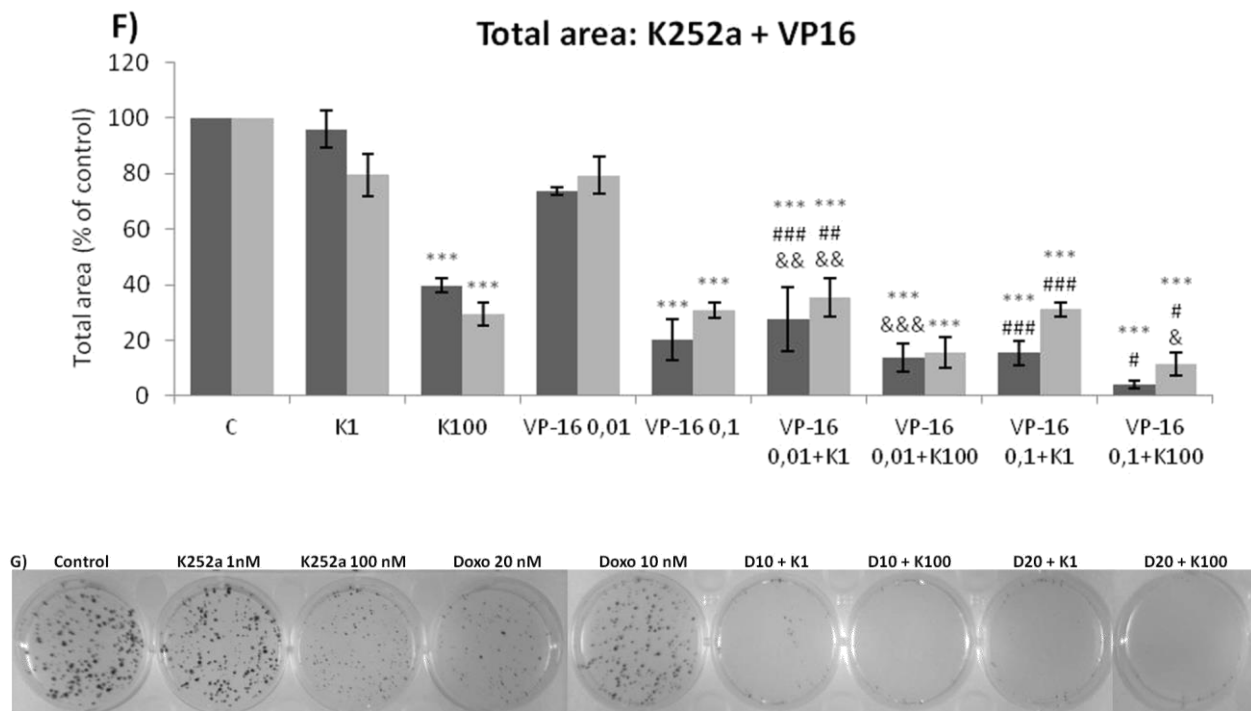


Figure 8: (Continued) K252a co-treatment with Doxo, VP-16, or VCR reduces ES cell colony formation. A, B. K252a and Doxo. C, D. K252a and VCR. E, F. K252a and VP-16. Cells were treated as in Figure 6. Colony count data are shown in (A, C) and (E); colony area data are shown in (B, D) and (F). Mean percentages of three independent experiments are shown. *, **, and *** represent $p < .05$, $p < .01$ and $p < .001$, respectively, vs. control; #, ##, and ### represent $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$, respectively, vs. respective K252a dose; &, &&, and &&& represent $p < .05$, $p < .01$, and $p < .001$, respectively, vs. respective chemotherapeutic dose. G. Representative images from cell survival experiments with SK-ES-1 cells treated with Doxo [10 (D10) and 20 (D20) nM] and K252a [1 (K1) and 100 (K100) nM]. Doxo = doxorubicin; VCR = vincristine; VP-16 = etoposide.

chemoresistant cells could be critical to understanding the synergy between K252a and chemotherapeutic agents in that differentiated cells can become more sensitive.

There may be some specificity to ES cells with respect to cell differentiation given that no morphological changes were observed in fibroblast or feocromacitomas cell lines treated with K252a [50]. However, neuronal differentiation in our study was not confirmed by measuring the content of β -III tubulin, a marker of neuronal differentiation [51]. In fact, a decrease in β -III tubulin levels was observed in cells treated with K252a. Interestingly, increased

β -III tubulin has been associated with aggressiveness, resistance to chemotherapy, and poor clinical outcomes in solid tumors [51–54]. β -III tubulin confers dynamic properties to microtubules, likely contributing to resistance to microtubule-targeting chemotherapy [51].

Thus, the decrease in β -III tubulin observed in our study might be related to restoring sensitivity to VCR and K252-induced phenotypic alterations associated with reduced aggressiveness. Further studies are warranted to investigate this interesting possibility.

Activation of Trks leads to stimulation of downstream mediators (i.e. MAPK, PLC γ and PI-3 kinase pathways) important for growth, differentiation, metastasis, and cell survival [36]. BDNF-induced

stimulation of TrkB results in increased expression of a wide range of genes, and these alterations are blocked by K252a. In addition, signaling mediated by MAPK is a universal requirement for gene transcription alterations related to Trk activation [55]. Our results indicate that Trk activity regulates the gene expression of Trk receptors as well as their ligands, given that K252a reduced the mRNA levels of NGF, TrkA, BDNF, and TrkB. This transcription inhibition of Trk pathway components represents a likely candidate mechanism involved in the antiproliferative effects of Trk inhibitors.

Only one previous study investigated the immunohistochemical expression of Trk receptors in ES tumors [30]. The authors used a pan-Trk receptor antibody in tumor samples from 5 patients, and found that all samples were positive for at least one Trk receptor. The present study was the first to discriminate between TrkA and TrkB receptor expression, in addition to showing the expression of Trk receptor ligands.

The mechanisms by which ES cells become resistant to chemotherapy are likely multiple and may involve cancer stem cells, proliferative intracellular pathways, and new mutations that allow the tumor cells to escape the effects of chemotherapy [56]. K252a was able to subvert these resistance mechanisms, and produced an

excellent long-term response when used in conjunction with chemotherapeutic agents (Figure 8). K252a, an alkaloid-like compound isolated from *Nocardopsis*, was characterized originally as an inhibitor of PKC and cyclic nucleotide-dependent kinases [57]. It is a potent and selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the Trk family of oncogenes and neurotrophin receptors [58]. The pegylated form or K252a (CT 327) has already been tested as a potential treatment for psoriasis in a clinical trial (NCT00995969), and synthetic derivatives of K252a (e.g. CEP-701) have been examined in phase I and phase II studies for leukemia and neuroblastoma [59, 60]. The prior clinical application of these drugs increases the chances that they can be used to treat ES.

Prospective assessment of TrkA and TrkB receptor expression might be used to identify tumors that are likely to respond to Trk receptor inhibitors, either alone or in combination with conventional agents. Indeed, very recent studies have shown that co-administration of Trk receptor inhibitors with traditional chemotherapeutic agents, specific small-interfering RNAs, or radiation enhanced the tumor response greatly in both *in vitro* and *in vivo* models [61–65], supporting the notion that such an approach is a promising avenue for the future of anticancer therapy.

In conclusion, the present results showed that Trk inhibition inhibits ES cell proliferation, particularly when delivered in combination with low-dose chemotherapeutic agents, even in chemoresistant cells. These findings provide the first evidence indicating that Trk pathway inhibition can improve treatment efficacy in ES.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and treatments

Human cell lines (SK-ES-1 and RD-ES) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) within six months before the beginning of the experiments and were authenticated using morphology, karyotyping, and PCR based approaches according to standard ATCC procedures. Cells were grown in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Carlsbad, CA), containing 0.1% Fungizone (250 mg/kg; Invitrogen, São Paulo, Brazil), 100 U/l gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Jardim Anápolis, Brazil), 50 mg/ml ampicillin (Nova Pharma, Jardim Anápolis, Brazil), and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, São Paulo, Brazil), at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO₂. Exponentially growing cells were detached with trypsin 0% EDTA, transferred to culture dishes, and treated accordingly to experimental group designations.

Resistance induction

To induce chemoresistance, SK-ES-1 cells were cultured with stepwise escalation of concentrations of

VCR (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 nM), Doxo (1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50 nM), and VP-16 (0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 and 0.4 μM) over 5 months [66]. Cells were exposed to each dose for 15 days. After the highest dose was reached, dose-effect curves were established while the cells were still exposed to the highest dose. The resultant resistant cells were referred to as SK-ES-1R.

Cellular proliferation assay

Cells were seeded at a density of 2×10^4 cells/well (SK-ES-1) or 2.5×10^4 cells/well (RD-ES and SK-ES-1R) in 24-well plates (TPP, Switzerland). After 24 h, they were treated with K252a (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), VCR, VP-16, Doxo, Ana-12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), GW 441756 (Tocris Bioscience, Bristol, UK), BDNF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and NGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alone or combined. The medium was removed 72 h after experimental treatments, and the cells were washed with Hanks' balanced salt solution (Invitrogen, São Paulo, Brazil), detached with 0.25% trypsin solution, and counted the trypan blue exclusion method in a hemocytometer [67]. Previous studies from our group [26, 68] have indicated that 72 h is the most appropriate exposure time to assess proliferation in cancer cells treated with K252a. The mean of at least three experiments for each dose, was used to calculate IC₅₀ and combination index values.

Colony formation assay

SK-ES-1 and RD-ES cells were seeded in 6-well plates (500 cells/well) and treated with different doses of K252a, VP-16, Doxo, and VCR, alone or in combination, for 24 h. Subsequently, the drug solution was removed and the cells were placed in a treatment-free medium. After being incubated for 10–14 days, the cells were fixed in 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet. Images of each plate were obtained with a desktop scanner (L-pix Chemi Molecular Imaging, Loccus Biotecnologia). Each plate was placed in the same position on the light table by aligning it with the center of the preview exposed light window. For analysis of the clonogenic assay images, optimized digital colony counts were performed with ImageJ software (version 1.37 for Windows) as described by dos Santos et al. [69]. Drug effects were expressed as surviving fraction of the colonies (SF; according to the formula below) and area occupied by colonies. The area occupied by colonies was analyzed in addition to colony number because colony size can vary substantially. All measures were calculated by ImageJ software to ensure uniformity of results.

$$SF = \frac{\text{No. colonies of treated cells}}{\text{No. untreated control colonies}} \times 100$$

Table 4: Forward (F) and reverse (R) primers used in RT-PCR amplification

Gene	Primer sequences	Product size (bp)
BDNF	F: 5' GGCTATGTGGAGTTGGCATT 3' R: 5' CTTCAGAGGCCTTCGTTTTG 3'	126
TrkB	F: 5' TGGTGCATTCCATTCACTGT 3' R: 5' CGTGGTACTCCGTGTGATTG 3'	130
NGF	F: 5' GACTCCGTTACCCCGTGTGC 3' R: 5' CACACCGAGAATTCGCCCTG 3'	166
TrkA	F: 5' AACCAGAGCCATGGACTCTACACT 3' R: 5' CCCAGCTCTGACAAGCCTCCGA 3'	135
β -actin	F: 5' GAGACCTTCAACACCCAG 3' R: 5' GCTACAGCTTACCAGCAG 3'	190

RT-PCR

SK-ES-1 (chemoresistant and non-resistant cells) and RD-ES cells were cultured in normal RT-PCR medium. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions and reverse transcribed with superscript III First-Strand Synthesis supermix (Invitrogen, São Paulo, Brazil). Human β -actin, BDNF, TrkB, NGF, and TrkA primers were designed according to the corresponding GenBank sequences (Table 4).

Semiquantitative RT-PCR conditions were optimized to determine the number of cycles that would allow product detection within the linear phase of mRNA transcript amplification. Experiments were performed with 1.5 mM MgCl₂, 0.1 μ M for each primer, 0.2 mM DNTPs, 1U Taq Platinum, and 2 μ l cDNA template. Expression of β -actin was measured as an internal control. The PCR conditions for β -actin, BDNF, TrkB, NGF, and TrkA experiments were: 2.5 mM MgCl₂, 0.1 μ M for each primer, 0.2 mM DNTPs, 1U Taq Platinum, and 1 μ l cDNA template. All assays were carried out in a total volume of 15 μ l with 35 amplification cycles that consisted of 1 min at 95 °C, denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and primer extension at 72 °C for 45 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The products were electrophoresed in 1.0% agarose gels containing ethidium bromide (Biotium, Hayward, USA) and visualized with ultraviolet light. Fragment lengths were confirmed by reference to a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and relative gene expression was determined by densitometry in ImageJ 1.37 for Windows. Each experiment was performed in triplicate with RNA isolated from independent cell cultures, and representative findings are shown. A negative control was included in each PCR set. Semiquantitative data are shown as percentage changes relative to β -actin (the lowest value among triplicates in the control group was taken as 100%).

Flow cytometry cell cycle analysis

SK-ES-1 cells were seeded at the density of 2×10^5 in 6-well plates. The next day, cells were treated with K252a (1 nM or 100 nM) or Doxo (40 nM) as positive control for 24 h. The medium was removed, and the cells were washed with Hanks' balanced salt solution and detached with 0.25% trypsin solution. Cells were centrifuged and re-suspended in 50 μ g/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate solution (appropriate volume to maintain 1×10^6 cells per ml ratio in solution). Cells were incubated on ice for 15 min prior to analysis in an Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystem, Life Technologies).

Immunohistochemistry

Paraffin blocks of tumors from 7 patients with ES were obtained from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Pathology Department. Four-micron-thick sections were mounted on organosilane-coated slides and dried overnight at 37 °C. The sections were deparaffinized in a stove, rehydrated in graded alcohols, and washed with distilled water. Antigenic recuperation was performed in a microwave, endogenous peroxidases were inactivated by immersion in hydrogen peroxide, and cross-reactivity was blocked with normal serum. Primary antibody [polyclonal rabbit anti-NGF (sc-33603; Santa Cruz Biotechnology), anti-BDNF (sc-20981, Santa Cruz Biotechnology), -TrkB (sc 377218, Santa Cruz Biotechnology), and polyclonal goat anti-TrkA (sc-20539, Santa Cruz Biotechnology)] diluted 1:50 in phosphate-buffered saline was applied for 12 h at 4 °C, followed by biotin streptavidin-biotin peroxidase complex (LSAB, Dako). Immunolabelling was visualized by reaction with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Kit, Dako). Cell nuclei were counterstained lightly with hematoxylin-eosin (HE).

A pathologist (LFRR), who was blind to the group designations scored the immunolabelling

semiquantitatively according to intensity and distribution, as described by Scott et al. [70]: for stain intensity, 0 = none; 1 = weak; 2 = moderate, and 4 = strong; and for staining distribution, 1 = focal, <10% of cells and 3 = diffuse, >10% of cells. Tumor sections were considered negative if the sum (intensity + distribution) score was ≤ 1 , weak positive if the sum score was 2–4 (weak diffuse, moderate or strong focal), and strong positive if the sum score was ≥ 5 (moderate or strong diffuse).

Western blot analysis of β -III tubulin levels

SK-ES-1 ES cells were homogenized in radio-immunoprecipitation assay buffer containing complete Protease Inhibitors (Roche) and quantified using a colorimetric protein assay (Bradford, Bio-rad, CA, USA). 20 μ g of total protein lysate were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride membranes, and blotted with antibodies against β -III tubulin (D71G9 – Cell Signaling Technology, MA, USA) and anti- β -actin (A2228, Sigma Aldrich, MO, USA) used as loading control. Incubation with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz, TX, USA) for 1h at RT was performed. Chemiluminescence was detected using ECL Western Blotting substrate (EMD Millipore, DE) and analyzed by ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, UK). Densitometric analyses were performed using Image J software (NIH, MD, USA). Relative Densitometric Units (RDU) in controls were expressed as 1 arbitrary unit. Three individual replicates were performed.

Median dose-effect analysis

The combination index, a measure of synergism and antagonism, was calculated by Chou and Talalay's method with CalcuSyn software version 2.11 for Windows (Biosoft, Ferguson, MO). This method takes into account both potency and dose-effect curve shape. Synergy, additivity, and antagonism were defined as $CI < 0.9$, $CI = 0.9-1.1$, and $CI > 1.1$, respectively. A CI value ≤ 0.3 and ≤ 0.1 was interpreted as strong and very strong synergism, respectively [71].

Statistics

All data are shown as means \pm standard errors of the mean (SEM) of 3–5 independent experiments. Differences between mean values were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer test in SPSS, version 16.0. P-values $< .05$ were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

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

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* 2010; 11:184–192.
2. Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008; 30:425–430.
3. Ross KA, Smyth NA, Murawski CD, Kennedy JG. The biology of Ewing sarcoma. *ISRN Oncol.* 2013; 2013:759725.
4. Granowetter L, Womer R, Devidas M, Krailo M, Wang C, Bernstein M, Marina N, Leavey P, Gebhardt M, Healey J, Shamberger RC, Goorin A, Miser J, et al. Dose-intensified compared with standard chemotherapy for non metastatic Ewing sarcoma family of tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2009; 27:2536–41.
5. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med.* 2003; 348:694–701.
6. Limin Z, Madonna MM, Dennis PMH. Understanding the biology of bone sarcoma from early initiating events through late events in metastasis and disease progression. *Front Oncol.* 2013; 3:230.
7. Ginsberg JP, Goodman P, Leisenring W, Ness KK, Meyers PA, Wolden SL, Smith SM, Stovall M, Hammond S, Robison LL, Oeffinger KC. Long-term survivors of childhood Ewing sarcoma: report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102:1272–83.
8. Ginsberg JP, Goodman P, Leisenring W, Ness KK, Meyers PA, Wolden SL, Smith SM, Stovall M, Hammond S, Robison LL, Oeffinger KC. Long-term survivors of childhood Ewing sarcoma: report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102:1272–83.

9. Jiang X, Gwye Y, Russell D, Cao C, Douglas D, Hung L, Kovar H, Triche TJ, Lawlor ER. CD133 expression in chemo-resistant Ewing sarcoma cells. *BMC Cancer*. 2010; 10:116.
10. May WA, Grigoryan RS, Keshelava N, Cabral DJ, Christensen LL, Jenabi J, Ji L, Triche TJ, Lawlor ER, Reynolds CP. Characterization and drug resistance patterns of Ewing's sarcoma family tumor cell lines. *PLoS One*. 2013; 8.
11. Garofalo C, Mancarella C, Grilli A, Manara MC, Astolfi A, Marino MT, Conte A, Sigismund S, Carè A, Belfiore A, Picci P, Scotlandi K. Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-1R agents in Ewing's sarcoma. *Mol Endocrinol*. 2012; 26:1603–16.
12. Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, Ventura S, Del Monaco V, Ferrari S, Alberghini M, Grilli A, Knuutila S, Schaefer KL, Mattia G, Negrini M, Picci P, Serra M, Scotlandi K. miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemosensitivity and malignancy. *J Pathol*. 2012; 226:796–805.
13. Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, Triche TJ. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol*. 1987; 127:507–518.
14. Knezevich SR, Henderson G, Mathers JA, Carpenter B, Lopez-Terrada D, Brown KL, Sorensen PH. Absence of detectable EWS/FLI1 expression after therapy-induced neural differentiation in Ewing sarcoma. *Hum Pathol*. 1998; 29:289–294.
15. O'Regan S, Diebler MF, Meunier FM, Vyas S. A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. *J Neurochem*. 1995; 64:69–76.
16. Staeger MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res*. 2004; 64:8213–8221.
17. von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, Hsu JH, Lawlor ER. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One*. 2011; 6.
18. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:2125–2137.
19. Riggi N, Suvà ML, Suvà D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*. 2008; 68:2176–2185.
20. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*. 2007; 11:421–429.
21. Kim MS, Kim CJ, Jung HS, Seo MR, Juhnn YS, Shin HY, Ahn HS, Thiele CJ, Chi JG. Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J Pathol*. 2004; 202:103–112.
22. Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63:1523–1537.
23. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006; 361:1545–64.
24. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012; 846:1–12.
25. Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, Klenk M, Wessels H, Hauffa BP, Eils J, Eils R, Brodeur GM, Schweigerer L, Havers W, Eggert A. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene*. 2005; 24:165–77.
26. de Farias CB, Heinen TE, dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425:328–32.
27. Bao W, Qiu H, Yang T, Luo X, Zhang H, Wan X. Upregulation of TrkB promotes epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in endometrial carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8.
28. Cornelio DB, De Farias CB, Prusch DS, Heinen TE, Dos Santos RP, Abujamra AL, Schwartzmann G, Roesler R. Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1:148–152.
29. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL, Schwartzmann G. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011; 11:1473–5.
30. Thomson TM, Pellicer A, Greene LA. Functional receptors for nerve growth factor on Ewing's sarcoma and Wilm's tumor cells. *J Cell Physiol*. 1989; 141:60–4.
31. Nogueira E, Navarro S, Pellín A, Llombart-Bosch A. Activation of TRK genes in Ewing's sarcoma. Trk A receptor expression linked to neural differentiation. *Diagn Mol Pathol*. 1997; 6:10–6.
32. Donovan MJ, Hempstead BL, Horvath C, Chao MV, Schofield D. Immunohistochemical localization of Trk receptor protein in pediatric small round blue cell tumors. *Am J Pathol*. 1993; 143:1560–7.
33. Sugimoto T, Umezawa A, Hata J. Neurogenic potential of Ewing's sarcoma cells. *Virchows Arch*. 1997; 430:41–6.
34. Kim GJ, Kim CJ, Cho SY, et al. Activation of trkA induces differentiation and inhibits the growth of JK-GMS Askin tumor cells. *Lab Invest*. 2002; 82:221–9.

35. Sturla LM, Westwood G, Selby PJ, et al. Cancer Res. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. 2000; 60:6160–70.
36. 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; 15:5962–7.
37. Amaral AT, Ordóñez JL, Otero-Motta AP, García-Domínguez DJ, Sevillano MV, de Álava E. Innovative therapies in Ewing Sarcoma. Adv Anat Pathol. 2014; 21:44–62.
38. Subbiah V, Kurzrock R. Ewing's sarcoma: overcoming the therapeutic plateau. Discov Med. 2012; 13:405–15.
39. Hawkins DS. Sarcomas gone bad: what to do about recurrent Ewing sarcoma. Pediatr Blood Cancer. 2012; 57:535–536.
40. Svensson T, Rydén M, Schilling FH, Dominici C, Sehgal R, Ibáñez CF, Kogner P. Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. Eur J Cancer. 1997; 33:2058–63.
41. Rydén M, Sehgal R, Dominici C, Schilling FH, Ibáñez CF, Kogner P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. Br J Cancer. 1996; 74:773–9.
42. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. Mol Cell Biol. 1994; 14:759–67.
43. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, Evans AE. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. J Clin Oncol. 2001; 19:689–96.
44. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, Ball DW, Baylin SB, Nelkin BD. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:4540–5.
45. 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; 62:6756–63.
46. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci. 2001; 24:677–736.
47. Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. Childs Nerv Syst. 2011; 27:897–901.
48. Lee SJ, Li GG, Kim ST, Hong ME, Jang J, Yoon N, Ahn SM, Murphy D, Christiansen J, Wei G, Hornby Z, Lee DW, Park JO, Park YS, Lim HY, Hong SN, Kim SH, Kang WK, Park K, Park WY, Kim KM, Lee J. NTRK1 rearrangement in colorectal cancer patients: evidence for actionable target using patient-derived tumor cell line. Oncotarget. 2015; 6:39028–35. doi: 10.18632/oncotarget.5494.
49. Fleuren ED, Hillebrandt-Roeffen MH, Flucke UE, Te Loo DM, Boerman OC, van der Graaf WT, Versleijen-Jonkers YM. The role of AXL and the *in vitro* activity of the receptor tyrosine kinase inhibitor BGB324 in Ewing sarcoma. Oncotarget. 2014; 5:12753–68. doi: 10.18632/oncotarget.2648.
50. Thompson AF, Levin LA. Neuronal differentiation by analogs of staurosporine. Neurochem Int. 2010; 56:554–60.
51. Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ. Class III beta-tubulin in human development and cancer. Cell Motil Cytoskeleton. 2003; 55:77–96.
52. Hetland TE, Hellesylt E, Flørenes VA, Tropé C, Davidson B, Kærn J. Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. Hum Pathol. 2011; 42:1019–1026.
53. Lebok P, Öztürk M, Heilenkötter U, Jaenicke F, Müller V, Paluchowski P, Geist S, Wilke C, Burandt E, Lebeau A, Wilczak W, Krech T, Simon R, Sauter G, Quaas A. High levels of class III β -tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer. Oncol Lett. 2016; 11:1987–1994.
54. Zhang HL, Ruan L, Zheng LM, Whyte D, Tzeng CM, Zhou XW. Association between class III β -tubulin expression and response to paclitaxel/vinorelbine-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. Lung Cancer. 2012; 77:9–15.
55. Gokce O, Runne H, Kuhn A, Luthi-Carter R. Short-term striatal gene expression responses to brain-derived neurotrophic factor are dependent on MEK and ERK activation. PLoS One. 2009; 4:e5292.
56. Ahmed AA, Zia H, Wagner L. Therapy resistance mechanisms in Ewing's sarcoma family tumors. Cancer Chemother Pharmacol. 2014; 73:657–63.
57. Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A., Kaneko, M. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Biochem Biophys Res Commun. 1987; 142:436–440.
58. Tapley P, Lamballe F, Barbacid M. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. Oncogene. 1992; 7:371–81.
59. Minturn JE, Evans AE, Villablanca JG, Yanik GA, Park JR, Shusterman S, Groshen S, Hellriegel ET, Bensen-Kennedy D, Matthay KK, Brodeur GM, Maris JM. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. Cancer Chemother Pharmacol. 2011; 68:1057–65.
60. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, Kell WJ, Agrawal S, Chopra R, Clark R, Levis MJ, Small D. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line

treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*. 2006; 108:3262–70.

61. Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, Bertucci F, Daubon T, Magné, Le Bourhis X, Toillon RA. NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget*. 2015; 6:9807–19. doi: 10.18632/oncotarget.3227.
62. Li Z, Zhang Y, Tong Y, Tong J, Thiele CJ. Trk inhibitor attenuates the BDNF/TrkB-induced protection of neuroblastoma cells from etoposide *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther*. 2015; 16:477–83.
63. Iyer R, Varela CR, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Light JE, Evans AE, Zhao H, Thress K, Brown JL, Brodeur GM. AZ64 inhibits TrkB and enhances the efficacy of chemotherapy and local radiation in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012; 70:477–86.
64. Croucher JL, Iyer R, Li N, Molteni V, Loren J, Gordon WP, Tuntland T, Liu B, Brodeur GM. TrkB inhibition by GNF-4256 slows growth and enhances chemotherapeutic efficacy in neuroblastoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 75:131–41.
65. Zhang J, Wang LS, Ye SL, Luo P, Wang BL. Blockage of tropomyosin receptor kinase a (TrkA) enhances chemosensitivity in breast cancer cells and inhibits metastasis *in vivo*. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8:634–41.
66. Shien K, Toyooka S, Yamamoto H, Soh J, Jida M, Thu KL, Hashida S, Maki Y, Ichihara E, Asano H, Tsukuda K, Takigawa N, Kiura K, et al. Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells. *Cancer Res*. 2013; 73:3051–61.
67. Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, Di Leone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res*. 2008; 5:99–105.
68. de Farias CB, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL, Kapczinski F, Brunetto AL, Ashton-Prolla P, Meurer L, Reis Bogo M, Damin DC, Schwartzmann G, Roesler R. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*. 2010; 79:430–9.
69. dos Santos MP, de Farias CB, Roesler R, Brunetto AL, Abujamra AL. *In vitro* antitumor effect of sodium butyrate and zoledronic acid combined with traditional chemotherapeutic drugs: a paradigm of synergistic molecular targeting in the treatment of Ewing sarcoma. *Oncol Rep*. 2014; 31:955–68.
70. Scott N, Millward E, Cartwright EJ, Preston SR, Coletta PL. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumors. *J Clin Pathol*. 2004; 57:189–192.
71. Chou TC: The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism. In: Synergism and Antagonism in Chemotherapy. Chou TC and Rideout DC (eds). Academic Press, San Diego, pp61–102, 1991.

6. DISCUSSÃO

Receptores tirosina cinases (RTKs) são uma subclasse de receptores transmembrana de fatores de crescimento. Eles regulam diversas funções em células normais, além de possuírem papel crucial na oncogênese. Por isso, grandes esforços têm sido realizados a fim de entender seu papel nos mais diversos processos celulares, como proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência. Quando mutados, estruturalmente alterados ou ativados constitutivamente, RTKs tornam-se potentes oncoproteínas, levando ao desenvolvimento e progressão tumoral. Em vista disso, RTKs e seus ligantes tornaram-se excelentes alvos terapêuticos através de sua inibição, seja por anticorpos, seja por pequenas moléculas (VECCHIONE *et al.*, 2011; HOJJAT-FARSANGI, 2014).

A partir desse conceito, diversas drogas foram disponibilizadas para o tratamento dos mais variados tipos de câncer: trastuzumabe (anti-HER2 para câncer de mama), imatinib (inibidor de Bcr-Abl para leucemia mieloide crônica), gefitinib (inibidor de EGFR para o câncer de pulmão), cetuximabe (anti-EGFR para o câncer colorretal), entre outros. Além disso, outros inibidores de RTKs estão em fase de pesquisa tanto básica quanto clínica. Trks, assim como esses outros receptores aqui citados, é um RTK e deve ser explorado não apenas para o tratamento do SE, mas, também, para outros tumores, uma vez que esses inibidores continuam salvando milhares de vidas e são, sem sombra de dúvida, uma das maiores conquistas para o tratamento oncológico nos últimos anos.

Receptores tropomiosina cinase foram inicialmente descritos como uma família de receptores de fatores de crescimento necessária ao desenvolvimento neuronal. Tem sido demonstrado, desde então, que eles influenciam o desenvolvimento e função neuronal em diversos aspectos, incluindo diferenciação, crescimento e plasticidade sináptica (CENI *et al.*, 2014). Além disso, as NTs apresentam capacidade de promoção da sobrevivência neuronal após dano cerebral em modelos animais, controlando tanto apoptose quanto proliferação, o que levou pesquisadores a desenvolverem a ideia de que esses fatores poderiam ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas. No contexto da doença de Alzheimer, por exemplo, a aplicação de NTs é baseada na premissa que elas são capazes de aumentar a função

colinérgica, além de deixar os neurônios menos vulneráveis a certos processos que causam degeneração (HEFTI, 1986).

Mas como essas moléculas que apresentam papéis tão cruciais no desenvolvimento do sistema nervoso poderiam relacionar-se com o câncer? Não é difícil pensar que um fator de crescimento capaz de controlar o crescimento e desenvolvimento neuronal, modelando o nosso sistema nervoso em sua organização, complexidade e plasticidade, poderia ser utilizado, também, como chave para uma doença essencialmente proliferativa como o câncer.

Nos últimos anos, a potencial utilidade de inibidores de Trks em oncologia tem sido ressaltada (THIELE *et al.*, 2009). O papel de receptores Trk em câncer surgiu de estudos com neuroblastomas e meduloblastomas (tumores pediátricos de origem neural, assim como é apontada a origem de SE). É de se espantar como que não houve, até então, algum estudo que aponte Trks como um potencial alvo para o tratamento desse tipo de tumor, uma vez que a quimioterapia clássica já alcançou um platô e pouco benefício é esperado para os próximos anos no que se refere a sobrevivência dos pacientes (SUBBIAH & KURZROCK, 2012). Tal fato pode ser explicado devido à baixa prevalência do SE, fazendo com que, por consequência, a indústria farmacêutica não tenha interesse em investir em pesquisa da qual não obterá lucros vultosos.

Em SE, pois, inexistem trabalhos que apontam o verdadeiro papel de NTs em sua biologia. A ativação, por exemplo, de BDNF/TrkB estimula a sobrevivência celular, angiogênese, além de contribuir com mecanismos de resistência a drogas citotóxicas e anoikis, fazendo com que as células adquiram diversas características necessárias à tumorigênese nos mais diferentes tipos de tumor (THIELE *et al.*, 2009). Aqui, verificamos que Trks possuem influência na proliferação e sobrevivência celular, além de serem capazes de subverter mecanismos de resistência tumoral quando inibidos. Como se trata de um trabalho pioneiro na área, abre margem para a descoberta dos mecanismos moleculares envolvidos nessas características apontadas.

Em relação ao que já se sabe sobre NTs/Trks em SE, o único estudo o qual verificou a expressão a nível proteico dos receptores utilizou um anticorpo pan-Trk em um total de cinco amostras de tumores de

pacientes (DONOVAN *et al.*, 1993). Nosso trabalho, entretanto, pela primeira vez, utilizou anticorpos específicos para TrkA e TrkB, além de verificar a expressão de NGF e BDNF. A maioria das amostras, de um total de sete, foi imunorreativa para esses marcadores, o que evidencia, conseqüentemente, que NTs apresentam papéis importantes na fisiologia desse tipo de tumor. Nosso pioneirismo abre portas para exploração das funções celulares desses marcadores através da utilização de técnicas, por exemplo, como siRNA contra NTs e seus receptores, além de verificar uma possível associação clínica em um número maior de amostras, comparando expressão com prognóstico, metástases, sobrevida, recidiva, malignidade. Por ser um tumor raro, há grande dificuldade em obter amostras de pacientes. Tal obstáculo é compartilhado por outros autores que trabalham com essa doença (BALAMUTH & WOMER, 2010). Nosso grupo de pesquisa, não obstante, tem projetos com centros do Brasil e da América Latina com intuito de aumentar o número de amostras tumorais e, por conseqüência, melhorar as correlações entre NTs e SE, além de explorar outros marcadores e mecanismos os quais estamos estudando. Esse contexto, pois, ressalta a importância de estudos multicêntricos para SE.

Inexistem trabalhos que utilizam o inibidor específico de TrkB (ANA-12) e há poucos estudos sobre o inibidor de TrkA (GW 441756) em câncer, os quais voltam seu foco para distúrbios neurológicos (HARRISON, 2011). No entanto, mostramos que eles apresentam atividade antiproliferativa contra linhagens de SE. Diferentemente dos inibidores específicos, o pan-inibidor de Trks (K252a), é muito utilizado em estudos pré-clínicos e clínicos para o tratamento de diversos tipos de câncer, como câncer gástrico e pulmonar (ODATE *et al.*, 2013; TANAKA *et al.*, 2014). Tal molécula obteve atividade antiproliferativa a nível nanomolar contra SE. A maior potência do pan-inibidor em comparação aos inibidores seletivos provavelmente se deve à interrupção da sinalização celular de todos os Trks. Essa observação é verificada ao realizarmos o experimento de tratamento conjunto com os inibidores específicos, uma vez que as combinações foram mais efetivas que o tratamento sozinho. A inibição de diversos caminhos, ao mesmo tempo, reduz a capacidade de a célula escapar dos efeitos anticancerígenos dos fármacos devido à redundância das vias de sinalização.

O dado obtido sobre a diminuição da proliferação das células SK-ES-1 quando combinamos baixas doses de ANA-12 e GW 441756 é de extrema importância e ressalta, ainda mais, a necessidade da utilização de um pan-inibidor de tirosina cinases no tratamento do SE. Esse resultado chama ainda mais atenção quando verificamos que estudos clínicos recentes em SE, os quais utilizaram anticorpos específicos anti-IGFR (OLMOS *et al.*, 2010; JUERGENS *et al.*, 2011; PAPPO *et al.*, 2011; MALEMPATI *et al.*, 2012), não apresentaram resposta clínica favorável segundo seus desfechos. Todos os trabalhos apresentaram respostas satisfatórias em apenas um grupo selecionado de pacientes (10% de pacientes com SE avançado e previamente tratados). Mesmo esses pacientes que responderam inicialmente ao tratamento, inevitavelmente desenvolveram resistência (SUBBIAH *et al.*, 2012). A via de sinalização celular de IGFR1 é a mais investigada em SE, uma vez que está superexpressa na maioria desses tumores (SCOTLANDI *et al.*, 2011). Apesar de a inibição desse receptor ter apresentado respostas fantásticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, no cenário clínico, como comentado, os resultados foram diferentes. Por isso, a importância da terapia alvo combinada não deve ser subestimada (AHMED *et al.*, 2014). Em vista disso, novos estudos têm associado anticorpos anti-IGFR1 em combinação com outros agentes, como, temsirolimus, um inibidor de mTOR (NAING *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2014). Essas respostas insatisfatórias podem ser explicadas pelo fato de que a inibição de apenas uma rota provê ao tumor a capacidade de sinalizar e manter os mecanismos de proliferação celular por outros caminhos. O K252a, diferentemente de um anticorpo monoclonal, tem a capacidade de inibir mais de um receptor, diminuindo, conseqüentemente, as chances de sobrevivência tumoral.

Além disso, encontramos, na maioria das vezes, efeitos sinérgicos entre K252a e quimioterapia clássica nos estudos de proliferação celular. Os resultados foram verificados tanto em células não resistentes quanto nas resistentes. Esse achado, principalmente em relação às células resistentes, é de extrema importância, uma vez que a maioria das mortes relacionadas ao SE é devido à resistência tumoral (KELLEHER & THOMAS, 2012). Um fármaco capaz de subverter os mecanismos de resistência é a chave para o tratamento dessa doença. Esses resultados vão ao encontro com outros achados em tumores de origem neuroectodérmica, como neuroblastoma e meduloblastoma (NOGUEIRA *et al.*, 1997; EVANS

et al., 1999; ZAGE *et al.*, 2011), em que o tratamento conjunto com inibidores de Trk e quimioterapia clássica também se mostrou mais efetivo que a terapia sozinha.

Apesar de a inibição de Trks ter se mostrado efetiva no tratamento do câncer nesse e em diversos outros trabalhos; interferências nessas vias, porém, estão associadas a diversas doenças neurológicas e não neurológicas (VAISHNAVI *et al.*, 2015). Em vista disso, a questão que surge é: ocorreriam quais tipos de dano ao paciente caso inibíssemos a ação das neurotrofinas e Trks? Há diversas experiências entre inibidores de Trks e o cenário clínico. Tanezumab (anti-TrkA), por exemplo, tem demonstrado eficácia clínica no tratamento da dor em pacientes com osteoartrite (LANE *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2013). Além disso, CT327 (inibidor de TrkA para uso tópico) foi eficaz no tratamento de prurido em pacientes com psoríase (ROBLIN *et al.*, 2015). Lestaurtinib, o primeiro inibidor de Trks utilizado clinicamente, em um estudo fase I, estabeleceu a dose máxima tolerada e identificou efeitos adversos como náusea, eventos gastrointestinais e dispepsia, sendo eventos bem tolerados (MARSHALL *et al.*, 2005). Além disso, esse fármaco não apresentou efeitos neurológicos com a dose utilizada, no entanto, não se sabe se essa dose foi capaz de inibir esses receptores. Devido à importância das NTs no SNC, principalmente TrkB que está intimamente ligado à sobrevivência neuronal, é que a indústria farmacêutica tem investido pesado no desenho de fármacos que evitem a inibição de Trks do cérebro (MCCARTHY & WALKER, 2014). Em vista da experiência do uso desses inibidores no cenário clínico, em poucos anos, certamente, mais neoplasias serão alvo, além das que já estão sendo investigadas (Tabela 1), em consequência do papel de NTs/Trks na oncogênese dos mais diversos tipos de câncer

Droga	Estágio de desenvolvimento	Alvos	Identificador
DCC 2701	Fase I em tumores sólidos avançados	TrkA/B/C , MET, TIE2, VEGFR	NCT02228811
LOXO-101	Fase I em pacientes com alterações genéticas em TrkA, TrkB ou TrkC	TrkA/B/C	NCT02122913
MGCD516	Fase I em pacientes com NSCLC avançado	Trk , MET, AXL, RET, DDR2, KDR, PDGFRA e KIT	NCT02219711
PLX7486	Fase I como agente único ou em combinação com gencitabina e nab-paclitaxel em tumores sólidos	TrkA/B/C , Fms	NCT01804530

RXDX-101	Fase I em pacientes com alterações genéticas em TrkA/B/C, ROS1 e ALK	TrkA/B/C , ALK, ROS1	NCT02097810
TSR-011	Fase I em tumores sólidos e hematológicos positivos para TrkA ou ALK	TrkA , ALK	NCT02048488
XL-184	Fase II em NSCLC avançado com fusões NTRK, RET, ou ROS1 ⁺ , ou atividade aumentada de MET ou AXL	TrkA , RET, AXL	NCT01639508

Tabela 1: *Inibidores de Trk em desenvolvimento.* A tabela apresenta uma lista de inibidores de Trk que estão sendo investigados atualmente em ensaios clínicos em oncologia. Fonte: adaptado de Vaishnavi et al., Cancer Discovery 2015. Original disponível em: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/5/1/25.long> (acessado em 14 de julho de 2015).

O tratamento conjunto, independente do que seja utilizado (quimioterápicos, anticorpos, pequenas moléculas), deve ser explorado, uma vez que, dessa forma, podemos diminuir a capacidade da célula em adquirir mecanismos de resistência, além de baixar as doses e tempo de tratamento, buscando, por consequência, uma diminuição da toxicidade sistêmica causada por todos esses fármacos.

Sabemos que o SE afeta, principalmente, crianças e adolescentes, os quais são submetidos a uma imensa carga quimioterápica (ciclos utilizando doxorrubicina, vincristina, etoposídeo, ciclofosfamida, ifosfamida). As consequências dessa exposição, no entanto, não podem ser calculadas, mas acarretam problemas cardiovasculares, metabólicos, pulmonares, neurológicos e, até mesmo, predispõem a formação de novos tumores (ROSEN *et al.*, 2013; LIVSHITS *et al.*, 2014). Ao verificarmos respostas na proliferação e sobrevivência celular utilizando baixas doses de quimioterápicos e K252a, podemos afirmar que nosso trabalho atingiu um dos seus principais objetivos, uma vez que, se pensarmos de maneira translacional, o mesmo pode ser replicado em pacientes, o que diminuiria, por conseguinte, os efeitos tóxicos dessas drogas.

Este trabalho deixou claro que Trks possuem influência na proliferação, sobrevivência e resistência de células de SE. Por isso que se deve ressaltar, ainda mais, a importância da avaliação da expressão de TrkA e TrkB nos tumores, a fim de identificar pacientes que podem responder, quem sabe em um futuro próximo, à terapia de inibição de Trks sozinha ou em combinação com outras drogas.

Há, certamente, um longo caminho para que uma droga ou tratamento possa ser validado a partir de um trabalho de biologia celular. Aqui apresentamos, pela primeira vez, resultados fortes e consistentes os quais mostram que a inibição de Trks pode tornar-se uma estratégia para o tratamento dessa doença.

Por fim, vale ressaltar que ambas as pesquisas acadêmica e farmacêutica devem manter o foco na avaliação de receptores tirosina cinases como alvos moleculares para o tratamento do câncer. Devido à complexidade das alterações patogênicas na sinalização celular tumoral, técnicas de diagnóstico baseadas em genômica, como análise de polimorfismo de nucleotídeo único e técnicas de microarranjo de DNA irão ajudar a selecionar pacientes que melhor responderão a uma droga específica. Em última análise, devido à plasticidade do genoma da célula tumoral, será essencial o desenvolvimento de terapias combinadas que envolvem o uso de pequenas moléculas, anticorpos e quimioterapia convencional, substâncias as quais funcionam através de mecanismos distintos e complementares, a fim de alcançar uma rápida e completa erradicação das células tumorais.

7. CONCLUSÕES

- BDNF, TrkB, NGF e TrkA são expressos em amostras de SE e nas linhagens celulares;
- Adição de neurotrofinas exógenas não influencia na proliferação das linhagens;
- As linhagens são sensíveis à inibição das principais vias celulares pelas quais é propagada a sinalização dos receptores Trks (MAPK, PI3K e PKC);
- As linhagens celulares são sensíveis à inibição de TrkA e TrkB, principalmente TrkA; o efeito é maior, porém, quando ambos os receptores são inibidos, seja pelo tratamento com K252a, seja pelo tratamento conjunto entre ANA-12 e GW 441756;
- K252a induz alterações morfológicas nas linhagens, com possível diferenciação e extensão de neuritos;
- O tratamento da linhagem SK-ES-1 com K252a 100 nM, por 24 h, diminuiu a expressão de mRNA de BDNF, TrkB, NGF e TrkA, diminuindo, também, a proliferação celular;
- K252a manteve seu efeito antiproliferativo nas células quimiorresistentes com a mesma sensibilidade a qual atinge as células não resistentes;
- A inibição de Trks em ajudância com quimioterapia clássica apresentou efeito aditivo ou sinérgico na maioria das combinações, seja em células não resistentes, seja nas quimiorresistentes;
- A inibição de Trks em ajudância com quimioterapia clássica apresentou efeito a longo prazo, uma vez que afetou a capacidade clonogênica das linhagens, seja no número de colônias formadas, seja na área total ocupada por elas em cada poço.

8. PERSPECTIVAS

- Verificação da expressão proteica de NTs e Trks nas linhagens quimiorresistentes;
- Avaliação de morte, senescência e diferenciação celular nas células tratadas com K252a;
- Avaliação da expressão proteica da translocação EWS/FLI1 das células de SE após tratamento com K252a;
- Utilizar técnicas de cultivo primário para avaliar os efeitos na proliferação das células tratadas com K252a sozinho ou combinado;
- Avaliação, *in vivo*, do tratamento com K252a sozinho ou combinado com quimioterapia clássica em um modelo de SE;
- Avaliar um número maior de amostras de pacientes quanto à expressão proteica de NTs e seus receptores, a fim de correlacionar os dados com prognóstico, metástase, recidiva.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.A.; ZIA, H. & WAGNER, L. Therapy resistance mechanisms in Ewing's sarcoma family tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73(4):657–63, 2014.

AMARAL, A.T.; MANARA, M.C.; BERGHUIS, D.; ORDÓÑEZ, J.L.; BISCUOLA, M.; LOPEZ-GARCÍA, M.A.; OSUNA, D.; LUCARELLI, E.; ALVIANO, F.; LANKESTER, A.; SCOTLANDI, K. & DE ÁLAVA, E. Characterization of human mesenchymal stem cells from ewing sarcoma patients. Pathogenetic implications. *PLoS One*, 9(2), 2014.

AMARAL, A. T.; ORDÓÑEZ, J. L.; OTERO-MOTTA, A. P.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, D. J.; SEVILLANO, M. V. & DE ÁLAVA, E. Innovative therapies in Ewing Sarcoma. *Adv Anat Pathol*, 21(1):44–62, 2014.

ANAGNOSTOPOULOU, V.; PEDIADITAKIS, I.; ALKAHTANI, S.; ALARIFI, S.A.; SCHMIDT, E.M.; LANG, F.; GRAVANIS, A.; CHARALAMPOPOULOS, I. & STOURNARAS, C. Differential effects of dehydroepiandrosterone and testosterone in prostate and colon cancer cell apoptosis: the role of nerve growth factor (NGF) receptors. *Endocrinology*, 154(7):2446–56, 2013.

ANTONESCU, C. Round cell sarcomas beyond Ewing: emerging entities. *Histopathology*, 64(1):26–37, 2014.

ARVAND, A. & DENNY, C.T. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene*, 20(40):5747–5754, 2001.

ASGHARZADEH, S.; PIQUE-REGI, R.; SPOSTO, R.; WANG, H.; YANG, Y.; SHIMADA, H.; MATTHAY, K.; BUCKLEY, J.; ORTEGA, A. & SEEGER, R.C. Prognostic significance of gene expression profiles of metastatic neuroblastomas lacking MYCN gene amplification. *J Natl Cancer Inst*, 98(17):1193–203, 2006;

BACCI, G.; BALLADELLI, A.; FORNI, C.; LONGHI, A.; SERRA, M.; FABBRI, N.; ALBERGHINI, M.; FERRARI, S.; BENASSI, M.S. & PICCI, P. Ewing's sarcoma family tumours. Differences in clinicopathological characteristics at presentation between localised and metastatic tumours. *J Bone Joint Surg Br*, 89(9):1229–1233, 2007.

BACCI, G.; FERRARI, S.; AVELLA, M.; BARBIERI, E.; PICCI, P.; CASADEI, R.; ROSITO, P.; NERI, S.; CAPANNA, R. & BATTISTINI, A. Non-metastatic Ewing's sarcoma: results in 98 patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ital J Orthop Traumatol*, 17(4):449–465, 1991.

BACCI, G.; TONI, A.; AVELLA, M.; MANFRINI, M.; SUDANESE, A.; CIARONI, D.; BORIANI, S.; EMILIANI, E. & CAMPANACCI, M. Long-term results in 144 localized Ewing's sarcoma patients treated with combined therapy. *Cancer*, 63(8):1477–1486, 1989.

BALAMUTH, N.J. & WOMER R.B. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol*, 11:184–192, 2010.

BAO, B.; AHMAD, A.; AZMI, A. S.; ALI, S. & SARKAR, F. H. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol*, 14(14):25, 2013.

BAO, W.; QIU, H.; YANG, T.; LUO, X.; ZHANG, H. & WAN, X. Upregulation of TrkB promotes epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in endometrial carcinoma. *PLoS One*, 8(7), 2013.

BARDELLI, A.; PARSONS, D.W.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; SAHA, S.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J.K.; PARMIGIANI, G.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. & VELCULESCU, V.E. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science*, 300(5621):949, 2003.

BARKER, L.M.; PENDERGRASS, T.W.; SANDERS, J.E. & HAWKINS, D.S. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol*, 23(19):4354–62, 2005.

BELLAN, D.G.; FILHO, R.J.G.; GARCIA, J.G.; PETRILLI, M.T.; VIOLA, D.C.M.; SCHOED, M.F. & PETRILLI, A. S. Sarcoma de Ewing: epidemiologia e prognóstico dos pacientes tratados no Instituto de Oncologia Pediátrica, IOP-GRAACC-UNIFESP. *Rev Bras Ortop*, 47(4), 2012.

BIBEL, M.; HOPPE, E. & BARDE, Y.A. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{ntr}. *EMBO J*, 18:616–622, 1999.

BROWN, M.T.; MURPHY, F.T.; RADIN, D.M.; DAVIGNON, I.; SMITH, M.D. & WEST, C.R. Tanezumab reduces osteoarthritic hip pain: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase iii trial. *Arthritis Rheum*, 65:1795–803, 2013.

BRUNETTO DE FARIAS, C.; ROSEMBERG, D.B.; HEINEN, T.E.; KOEHLER-SANTOS, P.; ABUJAMRA, A.L.; KAPCZINSKI, F.; BRUNETTO, A.L.; ASHTON-PROLLA, P.; MEURER, L.; REIS BOGO, M.; DAMIN, D.C.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. BDNF/TrkB content and

interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*. 79(5-6):430-9, 2010.

CAI, J.; HUA, F.; YUAN, L.; TANG, W.; LU, J.; YU, S.; WANG, X; & HU, Y. Potential therapeutic effects of neurotrophins for acute and chronic neurological diseases. *Biomed Res Int*, 2014:601084, 2014.

CAROLEO, M.C.; CARITO, V.; PINGITORE, A.; PERROTTA, I.D.; PERRI, M.; MANCUSO, D.; RUSSO, A. & CIONE, E. Human kidney podocyte cell population as a novel biological target of nerve growth factor. *Growth Factors*, 27:1–9, 2014.

CARVAJAL, R. & MEYERS, P. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal family of tumors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 19:501–525, 2005.

CAVAZZANA, A.O.; MISER, J.S.; JEFFERSON, J. & TRICHE, T.J. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol*, 127:507–518, 1987.

CAZORLA, M.; PRÉMONT, J.; MANN, A.; GIRARD, N.; KELLENDONK, C.; ROGNAN, D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest*, 121(5):1846–57, 2011.

CENI, C.; UNSAIN, N.; ZEINIEH, M.P. & BARKER, P.A. Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb Exp Pharmacol*, 220:193–221, 2014.

CHANDHANAYINGYONG, C.; KIM, Y.; STAPLES, J.R.; HAHN, C. & LEE, F.Y. MAPK/ERK signaling in osteosarcomas, Ewing sarcomas and chondrosarcomas: therapeutic implications and future directions. *Sarcoma*, 2012:404810, 2012.

CHAO, M.V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways . *Nat Rev Neurosci*, 4:299 – 309, 2003.

CIRONI, L.; RIGGI, N.; PROVERO, P.; WOLF, N.; SUVÀ, M.L.; SUVÀ, D.; KINDLER, V. & STAMENKOVIC, I. IGF1 is a common target gene of Ewing's sarcoma fusion proteins in mesenchymal progenitor cells. *PLoS ONE*, 3(7), 2008.

COLOMBO, E.; BEDOGNI, F.; LORENZETTI, I.; LANDSBERGER, N.; PREVITAL, S.C. & FARINA, C. Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. *J Pathol*, 231(2):190–8, 2013.

COTE, G.M. & CHOY, E. Update in treatment and targets in Ewing sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 27(5):1007–19, 2013.

DAUPHINOT, L.; DE OLIVEIRA, C.; MELOT, T.; SEVENET, N.; THOMAS, V.; WEISSMAN, B.E. & DELATTRE, O. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*, 20(25):3258–3265, 2001.

DAWSON, H.; GRUNDMANN, S.; KOELZER, V.H.; GALVÁN, J.A.; KIRSCH, R.; KARAMITOPOULOU, E.; LUGLI, A.; INDERBITZIN, D. & ZLOBEC, I. Tyrosine kinase receptor B (TrkB) expression in colorectal cancers highlights anoikis resistance as a survival mechanism of tumour budding cells. *Histopathology*, 2015.

DE ALAVA, E.; KAWAI, A.; HEALEY, J. H.; FLIGMAN, I.; MEYERS, P.A.; HUVOS, A.G.; GERALD, W.L.; JHANWAR, S.C.; ARGANI, P.; ANTONESCU, C.R.; PARDO-MINDAN, F.J.; GINSBERG, J.; WOMER, R.; LAWLOR, E.R.; WUNDER, J.; ANDRULIS, I.; SORENSEN, P.H.;

BARR, F.G. & LADANYI, M. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 16(4):1248–1255, 1998.

DE FARIAS, C.B.; HEINEN, T.E.; DOS SANTOS, R.P.; ABUJAMRA, A.L.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(2):328–32, 2012.

DISSEN, G.A.; HIRSHFIELD, A.M.; MALAMED, S. & EJEDA, S.R.; Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, 136:4681–92, 1995.

DONOVAN, M.J.; HEMPSTEAD, B.L.; HORVATH, C.; CHAO, M.V. & SCHOFIELD, D. Immunohistochemical localization of Trk receptor protein in pediatric small round blue cell tumors. *Am J Pathol*, 143(6):1560–7, 1993.

DREYFUS, C.F. Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons. *Trends Pharmacol Sci*, 10:145–149, 1989.

EGGERT, A.; GROTZER, M.A.; IKEGAKI, N.; LIU, X.G.; EVANS, A.E. & BRODEUR, G.M. Expression of the neurotrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 62:1802–8, 2002.

ENCINAS, M.; IGLESIAS, M.; LLECHA, N. & COMELLA, J.X. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurochem*, 73(4):1409–21, 1999.

ESIASHVILI, N.; GOODMAN, M. & MARCUS, R.B.JR. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30(6):425–430, 2008.

ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 25 (Suppl 3):113–123, 2014.

EVANS, A.E.; KISSELBACH, K.D.; YAMASHIRO, D.J.; IKEGAKI, N.; CAMORATTO, A.M.; DIONNE, C.A. & BRODEUR, G.M. Antitumor activity of CEP-751 (KT-658) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res*, 5:3594–3602, 1999.

EWING, J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc*, 21:17–24, 1921.

FENG, N.; HUKE, S.; ZH, G.; TOCCHETTI, C.G.; SHI, S.; AIBA, T.; KALUDERCIC, N.; HOOVER, D.B.; BECK, S.E.; MANKOWSKI, J.L.; TOMASELLI, G.F.; BERS, D.M.; KASS, D.A. & PAOLOCCI, N. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci*, 2015.

FESTUCCIA, C.; MUZI, P.; GRAVINA, G.L.; MILLIMAGGI, D.; SPECA, S.; DOLO, V.; RICEVUTO, E.; VICENTINI, C. & BOLOGNA, M. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol*, 18:193–200, 2007.

FISHER, R.; PUSZTAI, L. & SWANTON, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer*, 108(3):479–485, 2013.

GEIGER, T.R.; SONG, J.Y.; ROSADO, A. & PEEPER D.S. Functional characterization of human cancer-derived TRKB mutations. *PLoS ONE*, 6, 2011.

GERYK-HALL, M. & HUGHES, D.P. Critical signaling pathways in bone sarcoma: candidates for therapeutic interventions. *Curr Oncol Rep*, 11(6):446–453, 2009.

GHILARDI J.R.; FREEMAN, K.T.; JIMENEZ-ANDRADE, J.M.; MANTYH, W.G.; BLOOM, A.P.; KUSKOWSKI, M.A. & MANTYH, P.W. Administration of a tropomyosin receptor kinase inhibitor attenuates sarcoma-induced nerve sprouting, neuroma formation and bone cancer pain. *Mol Pain*, 6:87, 2010.

GIMM, O.; GRECO, A.; HOANG-VU, C.; DRALLE, H.; PIEROTTI, M.A. & ENG, C. Mutation analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(8):2784–7, 1999.

GODA, M.; ATAGI, S.; AMITANI, K.; HOBARA, N.; KITAMURA, Y. & KAWASAKI, H. Nerve growth factor suppresses prostate tumor growth. *J Pharmacol Sci*, 112(4):463–6, 2010.

GÖTZ, R.; KÖSTER, R.; WINKLER, C.; RAULF, F.; LOTTSPEICH, F.; SCHARTL, M. & THOENEN, H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, 372:266–269, 1994.

GREENE, L.A. & KAPLAN, D.R. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 5:579–87, 1995.

GRIER, H.E.; KRAILO, M.D.; TARBELL, N.J.; LINK, M.P.; FRYER, C.J.; PRITCHARD, D.J.; GEBHARDT, M.C.; DICKMAN, P.S.; PERLMAN, E.J.; MEYERS, P.A.; DONALDSON, S.S.;

MOORE, S.; RAUSEN, A.R.; VIETTI, T J. & MISER, J.S. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med*, 348(8):694–701, 2003.

HAMBURGER, V. & LEVI-MONTALCINI, R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, 111:457–501, 1949.

HARADA, T.; YATABE, Y.; TAKESHITA, M.; KOGA, T.; YANO, T.; WANG, Y. & GIACCONE G. Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 17:2638–45, 2011.

HAREL, L.; COSTA, B. & FAINZILBER, M. On the death Trk. *Dev Neurobiol*, 70(5):298–303, 2010.

HARRISON, C. Mood disorders: Small-molecule neurotrophin antagonist reduces anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6):415, 2011.

HEFTI, F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci*, 6:2155–2162, 1986.

HO, R.; EGGERT, A.; HISHIKI, T.; MINTURN, J.E.; IKEGAKI, N.; FOSTER, P.;

CAMORATTO, A.M.; EVANS, A.E. & BRODEUR, G.M. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*, 62(22):6462–6, 2002.

HOJJAT-FARSANGI, M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *Int J Mol Sci*, 15(8):13768–801, 2014.

HUANG, E.J. & REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24:677–736, 2001.

HUANG, E.J. & REICHARDT, L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 72:609–642, 2003.

HU-LIESKOVAN, S.; HEIDEL, J.D.; BARTLETT, D.W.; DAVIS, M.E. & TRICHE, T.J. Sequence-specific knockdown of EWSFLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Research*, 65(19):8984–8992, 2005.

IBÁÑEZ, C.F. Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. *Trends Biotech*, 13:217–227, 1995.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

IWAMOTO, Y. Diagnosis and treatment of Ewing's sarcoma. *Jpn J Clin Oncol*, 37:79–89, 2007.

JABOIN, J.; KIM, C.J.; KAPLAN, D.R. & THIELE, C.J. Brain derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*, 62:6756–63, 2002.

JIMENEZ-ANDRADE, J.M.; GHILARDI, J.R.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; KUSKOWSKI, M.A. & MANTYH, P.W. Preventive or late administration of anti-NGF therapy attenuates tumor induced nerve sprouting, neuroma formation, and cancer pain. *Pain*, 152:2564–2574, 2011.

JUERGENS, H.; DAW, N.C.; GEOERGER, B.; FERRARI, S.; VILLARROEL, M.; AERTS, I.; WHELAN, J.; DIRKSEN, U.; HIXON, M.L.; YIN, D.; WANG, T.; GREEN, S.; PACCAGNELLA, L. & GUALBERTO, A. Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. *J Clin Oncol*, 29:4534–40, 2011.

KAPLAN, D.R. & MILLER, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10(3):381–91, 2000.

KELLEHER, F.C. & THOMAS, D.M. Molecular pathogenesis and targeted therapeutics in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumours. *Clin Sarcoma Res*, 2(1):6, 2012.

KERMANI, P.; RAFII, D.; JIN, D.K.; WHITLOCK, P.; SCHAFFER, W.; CHIANG, A.; VINCENT, L.; FRIEDRICH, M.; SHIDO, K.; HACKETT, N.R.; CRYSTAL, R.G.; RAFII, S. & HEMPSTEAD, B.L. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 115:653–63, 2005.

KIM, G.J.; KIM, C.J.; CHO, S.Y.; CHUNG, I.P.; PARK, S.H.; LEE, M.J. & CHI, J.G. Activation of trkA induces differentiation and inhibits the growth of JK-GMS Askin tumor cells. *Lab Invest*, 82(2):221–9, 2002.

KLEIN, R.; JING, S.Q.; NANDURI, V.; O'ROURKE, E. & BARBACID, M. The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65:189–197, 1991.

KNEZEVICH, S.R.; HENDSON, G.; MATHERS, J.A.; CARPENTER, B.; LOPEZ-TERRADA, D.; BROWN, K.L.; SORENSEN, P.H.; Absence of detectable EWS/FLI1 expression after therapy-induced neural differentiation in Ewing sarcoma. *Hum Pathol*, 29:289–294, 1998.

KNÜSEL, B.; HEFTI, F. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J Neurochem*, 59(6):1987–96, 1992.

KOLOKYTHAS, A.; COX, D.P.; DEKKER, N. & SCHMIDT, B.L. Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? *J Oral Maxillofac Surg*, 68:1290–1295, 2010.

KUSHNER, B.H. & MEYERS, P.A. How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 19(3):870–880, 2001.

LAGADEC, C.; MEIGNAN, S.; ADRIAENSSENS, E.; FOVEAU, B.; VANHECKE, E.; ROMON, R.; TOILLON, R.A.; OXOMBRE, B.; HONDERMARCK, H. & LE BOURHIS, X. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*, 28:1960–1970, 2009.

LAI, K.O.; FU, W.Y.; IP, F.C.F. & IP, N.Y. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci*, 11:64–76, 1998.

LAM, C.T.; YANG, Z.F.; LAU, C.K.; TAM, K.H.; FAN, S.T. & POON, R.T. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 17(10):3123–33, 2011.

LAMBALLE, F.; KLEIN, R. & BARBACID, M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66: 967–979, 1991.

LANE, N.E.; SCHNITZER, T.J.; BIRBARA, C.A.; MOKHTARANI, M.; SHELTON, D.L.; SMITH, M.D. & BROWN, M.T. Tanezumab for the treatment of pain from Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 363:1521–31, 2010.

LAWN, S.; KRISHNA, N. & PISKLAKOVA, A. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*, 290(6):3814–24, 2015.

LE DELEY, M.C.; DELATTRE, O.; SCHAEFER, K.L.; BURCHILL, S.A.; KOEHLER, G.; HOGENDOORN, P.C.; LION, T.; POREMBA, C.; MARANDET, J.; BALLEET, S.; PIERRON, G.; BROWNHILL, S.C.; NESSLBÖCK, M.; RANFT, A.; DIRKSEN, U.; OBERLIN, O.; LEWIS, I.J.; CRAFT, A. W.; JÜRGENS, H. & KOVAR H. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 28(12):1982–1988, 2010.

LEAVEY, P.J.; MASCARENHAS, L.; MARINA, N.; CHEN, Z.; KRAILO, M.; MISER, J.; BROWN, K.; TARBELL, N.; BERNSTEIN, M.L.; GRANOWETTER, L.; GEBHARDT, M. & GRIER, H.E. Children's Oncology Group. Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 51(3):334–8, 2008.

LEE, J.; HOANG, B.H.; ZIOGAS, A. & ZELL, J.A. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. *Cancer*, 116(8):1964–1973, 2010.

LEE, R.; KERMANI, P.; TENG, K.K.; HEMPSTEAD, B.L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294:1945–1948, 2001.

LEVI-MONTALCINI, R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237:1154–1162, 1987.

LI, Z.; JABOIN, J.; DENNIS, P.A. & THIELE, C.J. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res*, 65:2070–5, 2005.

LIN, M.I.; DAS, I.; SCHWARTZ, G.M.; TSOULFAS, P.; MIKAWA, T. & HEMPSTEAD, B.L. Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development *in vivo*. *Dev Biol*, 226:180–91, 2000.

LIN, P. P.; WANG, Y. & LOZANO, G. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma. *Sarcoma*, 2011.

LIU, C.; ZHANG, Z.; TANG, H.; JIANG, Z.; YOU, L. & LIAO, Y. Crosstalk between IGF-1R and other tumor promoting pathways. *Curr Pharm Des*, 19:1–10, 2013.

LIVSHITS, Z.; RAO, R.B. & SMITH, S.W. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*, 32:167–203, 2014.

LUO, Y.; KAZ, A.M.; KANNGURN, S.; WELSCH, P.; MORRIS, S.M.; WANG, J.; LUTTERBAUGH, J.D.; MARKOWITZ, S.D. & GRADY, W.M. NTRK3 is a potential tumor suppressor gene commonly inactivated by epigenetic mechanisms in colorectal cancer. *PLoS Genet*, 9(7), 2013.

LY, K.; RÉGENT, A.; MOLINA, E.; SAADA, S.; SINDOU, P.; LE-JEUNNE, C.; BRÉZIN, A.; WITKO-SARSAT, V.; LABROUSSE, F.; ROBERT, P.Y.; BERTIN, P.; BOURGES, J.L.; FAUCHAIS,

A.L.; VIDAL, E.; MOUTHON, L. & JAUBERTEAU M.O. Neurotrophins are expressed in giant-cell arteritis lesions and may contribute to vascular remodeling. *Arthritis Res Ther*, 16(6):487, 2014.

MACGROGAN, D.; SAINT-ANDRÉ, J.P. & DICOU, E. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor genes in human tissues and in prostatic adenocarcinoma cell lines. *J Neurochem*, 59:1381–1391, 2006.

MACKINTOSH, C.; ORDONEZ, J.L.; GARCIA-DOMINGUEZ, D.J.; SEVILLANO, V.; LLOMBART-BOSCH, A.; SZUHAI, K.; SCOTLANDI, K.; ALBERGHINI, M.; SCIOT, R.; SINNAEVE, F.; HOGENDOORN, P.C.; PICCI, P.; KNUUTILA, S.; DIRKSEN, U.; DEBIEC-RYCHTER, M.; SCHAEFER, K.L. & DE ÁLAVA, E. 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene*, 31:1287–1298, 2012.

MALEMPATI, S.; WEIGEL, B.; INGLE, A.M.; AHERN, C.H.; CARROLL, J.M.; ROBERTS, C.T.; REID, J.M.; SCHMECHEL, S.; VOSS, S.D.; CHO, S.Y.; CHEN, H.X.; KRAILO, M.D.; ADAMSON, P.C. & BLANEY, S.M. Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Clin Oncol*, 30:256–62, 2012.

MANTYH, W.G.; JIMENEZ-ANDRADE, J.M.; STAKE, J.I.; BLOOM, A.P.; KACZMARSKA, M.J.; TAYLOR, R.N.; FREEMAN, K.T.; GHILARDI, J.R.; KUSKOWSKI, M.A. & MANTYH, P.W. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. *Neuroscience*, 171:588–598, 2010.

MARCHETTI, A.; FELICIONI, L.; PELOSI, G.; DEL GRAMMASTRO, M.; FUMAGALLI, C.; SCIARROTTA, M.; MALATESTA, S.; CHELLA, A.; BARASSI, F.; MUCILLI, F.; CAMPLESE, P.;

D'ANTUONO, T.; SACCO, R. & BUTTITTA, F. Frequent mutations in the neurotrophic tyrosine receptor kinase gene family in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Hum Mutat*, 29:609–16, 2008.

MARSHALL, J.L.; KINDLER, H.; DEEKEN, J.; BHARGAVA, P.; VOGELZANG, N.J.; RIZVI, N.; LUHTALA, T.; BOYLAN, S.; DORDAL, M.; ROBERTSON, P.; HAWKINS, M.J. & RATAIN, M.J. Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Invest New Drugs*, 23:31–7, 2005.

MARTENS, L.K.; KIRSCHNER, K.M.; WARNECKE, C. & SCHOLZ, H. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem*, 282:14379–88, 2007.

MCCARTHY, C. & WALKER, E. Tropomyosin receptor kinase inhibitors: a patent update 2009 - 2013. *Expert Opin Ther Pat*, 24(7):731–44, 2014.

MCGREGOR, L.M.; MCCUNE, B.K.; GRAFF, J.R.; MCDOWELL, P.R.; ROMANS, K.E.; YANCOPOULOS, G.D.; BALL, D.W.; BAYLIN, S.B. & NELKIN, B.D. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(8):4540–5, 1999.

MELAMED, I.; KELLEHER, C.A.; FRANKLIN, R.A.; BRODIE, C.; HEMPSTEAD, B.; KAPLAN, D. & GELFAND, E.W. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk. *Eur J Immunol*, 26:1985–92, 1996.

MIRANDA, C.; MAZZONI, M.; SENSI, M.; PIEROTTI, M.A. & GRECO, A. Functional characterization of NTRK1 mutations identified in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 53:875–80, 2014.

MOLLOY, N.H.; READ, D.E. & GORMAN, A.M. Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers*, 3:510–530, 2011.

MOORE, D.D. & HAYDON, R.C. Ewing's sarcoma of bone. *Cancer Treat Res*, 162:93–115, 2014.

NAING, A.; LORUSSO, P.; FU, S.; HONG, D.S.; ANDERSON, P.; BENJAMIN, R. S.; LUDWIG, J.; CHEN, H.X.; DOYLE, L.A. & KURZROCK, R. Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res*, 18(9):2625–2631, 2012.

NAKAGAWARA, A.; ARIMA-NAKAGAWARA, M.; SCAVARDA, N.J.; AZAR, C.G.; CANTOR, A.B. & BRODEUR, G.M. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med*, 328:847–54, 1993.

NAKAGAWARA, A.; AZAR, C.G.; SCAVARDA, N.J. & BRODEUR, G.M. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*, 14:759–67, 1994.

NAKAMURA, K.; MARTIN, K.C.; JACKSON, J.K.; BEPPU, K.; WOO, C.W. & THIELE, C.J. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res*, 66:4249–55, 2006.

NAKAMURA, T.; GRIMER, R.J.; GASTON, C.L.; WATANUKI, M.; SUDO, A. & JEYS, L. The prognostic value of the serum level of C-reactive protein for the survival of patients with a primary sarcoma of bone. *Bone Joint J*, 95-B(3):411–418, 2013.

NAKATANI, F.; TANAKA, K.; SAKIMURA, R.; MATSUMOTO, Y.; MATSUNOBU, T.; LI, X.; HANADA, M.; OKADA, T. & IWAMOTO Y. Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein. *J Biol Chem*, 278(17):15105–15115, 2003.

NOGUEIRA, E.; NAVARRO, S.; PELLÍN, A. & LLOMBART-BOSCH, A. Activation of TRK genes in Ewing's sarcoma. Trk A receptor expression linked to neural differentiation. *Diagn Mol Pathol*, 6(1):10–6, 1997.

NONG, X.L.; XIA, Y.; YANG, Y.P.; QING, H.Y.; LI, J.Q.; LI, Y.N.; CAO, Y.; LI, H. & CHEN, Q. Tyrosine kinase A and vascular endothelial growth factor receptor 2 in the invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 28(4):420–4, 2010.

O'REGAN, S.; DIEBLER, M.F.; MEUNIER, F.M. & VYAS, S. A Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron. *J Neurochem*, 64: 69–76, 1995.

ODATE, S.; ONISHI, H.; NAKAMURA, K.; KOJIMA, M.; UCHIYAMA, A.; KATO, M. & KATANO, M. Tropomyosin-related kinase B inhibitor has potential for tumor regression and relapse prevention in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. *Anticancer Res*, 33(9):3699–703, 2013.

OKAMURA, K.; HARADA, T.; WANG, S.; IJICHI, K.; FURUYAMA, K.; KOGA, T.; OKAMOTO, T.; TAKAYAMA, K.; YANO T. & NAKANISHI, Y. Expression of TrkB and BDNF is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 78(1):100–6, 2012.

OLMOS, D.; POSTEL-VINAY, S.; MOLIFE, L.R.; OKUNO, S.H.; SCHUETZE, S.M.; PACCAGNELLA, M.L.; BATZEL, G.N.; YIN, D.; PRITCHARD-JONES, K.; JUDSON, I.; WORDEN, F.P.; GUALBERTO, A.; SCURR, M.; DE BONO, J.S. & HALUSKA, P. Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. *Lancet Oncol*, 11:129–35, 2010.

ORDÓÑEZ, J.L.; OSUNA, D.; HERRERO, D.; DE ALAVA, E. & MADOZ-GÚRPIDE, J. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead. *Cancer Res*, 69(18):7140–7150, 2009.

PAPPO, A.S.; PATEL, S.R.; CROWLEY, J.; BOLEJACK, V.; HOGENDOORN, P.C.; CHUGH, R.; LADANYI, M.; GRIPPO, J.F.; DALL, G.; STADDON, A.P.; CHAWLA, S.P.; MAKI, R.G.; ARAUJO, D.M.; GEOERGER, B.; GANJOO, K.; MARINA, N.; BLAY, J.Y.; SCHUETZE, S.M.; CHOW, W.A. & HELMAN, L.J. R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: results of a phase II Sarcoma Alliance for Research through Collaboration study. *J Clin Oncol*, 29:4541–7, 2011.

PATRICIO, M.B.; VILHENA, M.; NEVES, M.; RAPOSO, S.; CATITA, J.; DE SOUSA, V. & MARTINS, A.G. Ewing's sarcoma in children: twenty-five years of experience at the Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil (I.P.O.F.G.). *J Surg Oncol*, 47(1):37–40, 1991.

PAULUSSEN, M.; AHRENS, S.; BURDACH, S.; CRAFT, A.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; DUNST, J.; FRÖHLICH, B.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A. & JÜRGENS, H. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. *Annals of Oncology*, 9(3):275–281, 1998.

RAAP, U.; DENEKA, N.; BRUDER, M.; KAPP, A. & WEDI, B. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clin Exp Allergy*, 38:1493–8, 2008.

RANDALL, R.L.; LESSNICK, S.L.; JONES, K.B.; GOUW, L.G.; CUMMINGS, J.E.; CANNON-ALBRIGHT, L. & SCHIFFMAN, J.D. Is there a predisposition gene for Ewing's sarcoma? *J Oncol*, 2010:397632, 2010.

REICHARDT, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473):1545–64, 2006.

REUTHER, G.W.; LAMBERT, Q.T.; CALIGIURI, M.A. & DER. C.J. Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, 20:8655–66, 2000.

RICHTER, G. H. S.; PLEHM, S.; FASAN, A.; RÖSSLER, S.; UNLAND, R.; BENNANI-BAITI, I.M.; HOTFILDER, M.; LÖWEL, D.; VON LUETTICHAU, I.; MOSSBRUGGER, I.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; KOVAR, H.; STAEGE, M.S.; MÜLLER-TIDOW, C. & BURDACH, S. EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(13):5324–5329, 2009.

RIGGI, N. & STAMENKOVIC I. The biology of Ewing sarcoma. *Cancer Letters*, 254(1):1–10, 2007.

RIGGI, N.; SUVA, M.L. & STAMENKOVIC, I. Ewing's sarcoma origin: from duel to duality. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9(8):1025–30, 2009.

RIGGI, N.; SUVÀ, M.L.; DE VITO, C.; PROVERO, P.; STEHLE, J.C.; BAUMER, K.; CIRONI, L.; JANISZEWSKA, M.; PETRICEVIC, T.; SUVÀ, D.; TERCIER, S.; JOSEPH, J.M.; GUILLOU, L. & STAMENKOVIC, I. EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes Dev*, 24(9):916–932, 2010.

RIGGI, N.; SUVA, M.L.; SUVA, D.; CIRONI, L.; PROVERO, P.; CIRONI, L.; PROVERO, P.; TERCIER, S.; JOSEPH, J.M.; STEHLE, J.C.; BAUMER, K.; KINDLER, V. & STAMENKOVIC, I. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res*, 68:2176–2185, 2008.

RIVERA-VALENTIN, R.K.; ZHU, L. & HUGHES, D.P. Bone Sarcomas in Pediatrics: Progress in Our Understanding of Tumor Biology and Implications for Therapy. *Paediatr Drugs*, 2015.

ROBLIN, D.; YOSIPOVITCH, G.; BOYCE, B.; ROBINSON, J.; SANDY, J.; MAINERO, V.; WICKRAMASINGHE, R.; ANAND, U. & ANAND, P. Topical TrkA kinase inhibitor CT327 is an effective, novel therapy for the treatment of pruritus due to psoriasis: results from experimental studies, and efficacy and safety of CT327 in a phase 2b Clinical Trial in patients with psoriasis. *Acta Derm Venereol*, 95(5):542–8, 2015.

ROSEN, G.P.; NGUYEN, H.T.; SHAIBI, G.Q. Metabolic syndrome in pediatric cancer survivors: a mechanistic review. *Pediatr Blood Cancer*, 60:1922–8, 2013.

ROUX, P.P. & BARKER, P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 67:203–33, 2002.

RUTKOWSKI, P.; KAMIN´SKA, J.; KOWALSKA, M.; RUKA, W. & STEFFEN, J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol*, 84(3):151–159, 2003.

SAINI, V. & SHOEMAKER, R.H. Potential for therapeutic targeting of tumor stem cells. *Cancer Sci*, 101(1):16–21, 2010.

SCHAIBLE, H.G. Emerging concepts of pain therapy based on neuronal mechanisms. *Handb Exp Pharmacol*, 227:1–14, 2015.

SCHULTE, J.H.; SCHRAMM, A.; KLEIN-HITPASS, L.; KLENK, M.; WESSELS, H.; HAUFFA, B. P.; EILS, J.; EILS, R.; BRODEUR, G.M.; SCHWEIGERER, L.; HAVERS, W. & EGGERT, A. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of TrkA- and TrkB-expressing neuroblastomas. *Oncogene*, 24(1):165–77, 2005.

SCLABAS, G.M.; FUJIOKA, S.; SCHMIDT, C.; LI, Z.; FREDERICK, W.A.; YANG, W.; YOKOI, K.; EVANS, D.B.; ABBRUZZESE, J.L.; HESS, K.R.; ZHANG, W.; FIDLER, I.J. & CHIAO P.J. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 11:440–9, 2005.

SCOTLANDI, K.; MANARA, M.C.; SERRA, M.; MARINO, M.T.; VENTURA, S.; GAROFALO, C.; ALBERGHINI, M.; MAGAGNOLI, G.; FERRARI, S.; LOPEZ-GUERRERO, J.A.; LLOMBARD-BOSCH, A. & PICCI P. Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing’s sarcoma and their association with survival. *Eur J Cancer*, 47:1258–1266, 2011.

SEGAL, R.A., GOUNNEROVA, L.C.; KWON, Y.K.; STILES, C.D. & POMEROY, S.L. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:12867–71, 1994.

SEGAL, R.A. & GREENBERG, M.E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 19:463–489, 1996.

SHARROCKS, A.D. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2):827–837, 2001.

SINKEVICIUS, K.W.; KRIEGEL, C.; BELLARIA, K.J.; LEE, J.; LAU, A.N.; LEEMAN, K.T.; ZHOU, P.; BEEDE, A.M.; FILLMORE, C.M.; CASWELL, D.; BARRIOS, J.; WONG, K.K.; SHOLL, L.M.; SCHLAEGER, T.M.; BRONSON, R.T.; CHIRIEAC, L.R.; WINSLOW, M.M.; HAIGIS, M.C. & KIM, C.F. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28): 10299–304, 2014.

SMITH, R.; OWEN, L.A.; TREM, D.J.; WONG, J.S.; WHANGBO, J.S.; GOLUB, T. R. & LESSNICK, S.L. Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*, 9(5):405–416, 2006.

SQUINTO, S.P.; STITT, T.N.; ALDRICH, T.H.; DAVIS, S.; BIANCO, S.M.; RADZIEJEWSKI, C.; GLASS, D.J.; MASIAKOWSKI, P.; FURTH, M.E. & VALENZUELA, D.M. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 65:885–893, 1991.

STAEGE, M.S.; HUTTER, C.; NEUMANN, I.; FOJA, S.; HATTENHORST, U.E.; HANSEN, G.; AFAR, D. & BURDACH, S.E. DNA microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res*, 64:8213–8221, 2004.

STUCKY, C.L. & KOLTZENBURG, M. The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J Neurosci*, 17:4398–4405, 1997.

STURLA, L.M.; WESTWOOD, G.; SELBY, P.J.; LEWIS, I.J. & BURCHILL, S.A. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 60(21):6160–70, 2000.

SUBBIAH, V. & KURZROCK, R. Ewing's sarcoma: overcoming the therapeutic plateau. *Discov Med*, 13(73):405–15, 2012.

SUBBIAH, V.; ANDERSON, P.; LAZAR, A.J.; BURDETT, E.; RAYMOND, K. & LUDWIG, J.A. Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr Treat Options Oncol*, 10(1-2):126–140, 2009.

SUGIMOTO, T.; UMEZAWA, A. & HATA, J. Neurogenic potential of Ewing's sarcoma cells. *Virchows Arch*, 430(1):41–6, 1997.

SUH, C.H.; ORDÓÑEZ, N.G.; HICKS, J. & MACKAY, B. Ultrastructure of the Ewing's sarcoma family of tumors. *Ultrastruct Pathol*, 26(2):67–76, 2002.

SUTOW, W.W. & SULLIVAN, M.P. Cyclophosphamide therapy in children with Ewing's sarcoma. *Cancer Chemother Rep*, 23:55–60, 1962.

SUVÀ, M.L.; RIGGI, N.; STEHLE, J.C.; BAUMER, K.; TERCIER, S.; JOSEPH, J.M.; SUVÀ, D.; CLÉMENT, V.; PROVERO, P.; CIRONI, L.; OSTERHELD, M.C.; GUILLOU, L. & STAMENKOVIC, I. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 69(5):1776–81, 2009.

TACCONELLI, A.; FARINA, A.R.; CAPPABIANCA, L.; DESANTIS, G.; TESSITORE, A.; VETUSCHI, A.; SFERRA, R.; RUCCI, N.; ARGENTI, B.; SCREPANTI, I.; GULINO, A. & MACKAY, A.R. TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 6:347–60. 2004.

TANAKA, K.; OKUGAWA, Y.; TOIYAMA, Y.; INOUE, Y.; SAIGUSA, S.; KAWAMURA, M.; ARAKI, T.; UCHIDA, K.; MOHRI, Y. & KUSUNOKI, M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced tropomyosin-related kinase B (Trk B) signaling is a potential therapeutic target for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *PLoS One*, 9(5), 2014.

TANAKA, K.; SHIMURA, T.; KITAJIMA, T.; KONDO, S.; IDE, S.; OKUGAWA, Y.; SAIGUSA, S.; TOIYAMA, Y.; INOUE, Y.; ARAKI, T.; UCHIDA, K.; MOHRI, Y.; KUSUNOKI, M. Tropomyosin-related receptor kinase B at the invasive front and tumour cell dedifferentiation in gastric cancer. *Br J Cancer*, 110(12):2923–34, 2014.

TENG, K.K.; FELICE, S.; KIM, T. & HEMPSTEAD B.L. Understanding pro neurotrophin actions: recent advances and challenges. *Developmental Neurobiology*, 70:350–9, 2010.

THIELE, C.J.; LI, Z. & MCKEE, A.E. On Trk--the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*, 15:5962–7, 2009.

THOMSON, T.M.; PELLICER, A. & GREENE, L.A. Functional receptors for nerve growth factor on Ewing's sarcoma and Wilm's tumor cells. *J Cell Physiol*, 141(1):60–4, 1989.

TIRODE, F.; LAUD-DUVAL, K.; PRIEUR, A.; DELORME, B.; CHARBORD, P. & DELATTRE, O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell*, 11(5):421–9, 2007.

TOMASSON, M.H.; XIANG, Z.; WALGREN, R.; ZHAO, Y.; KASAI, Y.; MINER, T.; RIES, R.E.; LUBMAN, O.; FREMONT, D.H.; MCLELLAN, M.D.; PAYTON, J.E.; WESTERVELT, P.; DIPERSIO, J.F.; LINK, D.C.; WALTER, M.J.; GRAUBERT, T.A.; WATSON, M.; BATY, J.; HEATH, S.; SHANNON, W.D.; NAGARAJAN, R.; BLOOMFIELD, C.D.; MARDIS, E.R.; WILSON, R.K.; LEY, T.J. Somatic mutations and germline sequence variants in the expressed tyrosine kinase genes of patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*; 111:4797–808, 2008.

TOOMEY, E.C.; SCHIFFMAN, J.D. & LESSNICK, S.L. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene*, 29(32):4504–4516, 2010.

VECCHIONE, L.; JACOBS, B.; NORMANNO, N.; CIARDIELLO, F. & TEJPAR, S. EGFR-targeted therapy. *Exp Cell Res*, 317(19):2765–71, 2011.

VON LEVETZOW, C.; JIANG, X.; GWYE, Y.; VON LEVETZOW, G.; HUNG, L.; COOPER, A.; HSU, J.H. & LAWLOR, E.R. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One*, 6(4), 2011.

WAGNER, L.M.; FOULADI, M.; AHMED, A.; KRAILO, M.D.; WEIGEL, B.; DUBOIS, S.G.; DOYLE, L.A.; CHEN, H. & BLANEY, S.M. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: A report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer*, 2014.

WAGNER, M.J. & MAKI, R.G. Type 1 insulin-like growth factor receptor targeted therapies in pediatric cancer. *Front Oncol*, 3:9, 2013.

WANG, L.; BHARGAVA, R.; ZHENG, T.; WEXLER, L.; COLLINS, M. H.; ROULSTON, D. & LADANYI, M. Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *J Mol Diagn JMD*, 9(4):498–509, 2007.

WARRINGTON, R.J. & LEWIS, K.E. Natural antibodies against nerve growth factor inhibit in vitro prostate cancer cell metastasis. *Cancer Immunol Immunother*, 60:187–195, 2011.

WIDHE, B. & WIDHE, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am*, 82(5):667–674, 2000.

WOO, C.W.; LUCARELLI, E. & THIELE, C.J. NGF activation of TrkA decreases N-myc expression via MAPK path leading to a decrease in neuroblastoma cell number. *Oncogene*, 23:1522–30, 2004.

WOOD, E.R.; KUYPER, L.; PETROV, K.G., HARRIS, P.A.; LACKEY, K. Discovery and *in vitro* evaluation of potent TrkA kinase inhibitors: oxindole and aza-oxindoles. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(4):953–7, 2004.

YAMASHIRO, D.J.; NAKAGAWARA, A.; IKEGAKI, N.; LIU, X.G. & BRODEUR, G.M. Expression of TrkC in favorable human neuroblastomas. *Oncogene*, 12:37–41, 1996.

YANG, X.Q.; XU, Y.F.; GUO, S.; LIU, Y.; NING, S.L.; LU, X.F.; YANG, H. & CHEN, Y.X. Clinical significance of nerve growth factor and tropomyosin-receptor-kinase signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 20(14):4076–84, 2014.

YORK, R.D.; MOLLIVER, D.C.; GREWAL, S.S.; STENBERG, P.E.; MCCLESKEY, E.W. & STORK, P.J. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal- regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol*, 20:8069–8083, 2000.

YOUSSEF, G.; GILLETT, C.; AGBAJE, O.; CROMPTON, T.; MONTANO, X. Phosphorylation of NTRK1 at Y674/Y675 induced by TP53-dependent repression of PTPN6 expression: a potential novel prognostic marker for breast cancer. *Mod Pathol*, 27(3):361–74, 2014.

ZAGE, P.E.; GRAHAM, T.C.; ZENG, L.; FANG, W.; PIEN, C.; THRESS, K.; OMER, C.; BROWN, J.L. & ZWEIDLER-MCKAY, P.A. The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer*, 117:1321–1391, 2011.

ZHANG, W.; LIN, Z.C.; ZHANG, T.X.; LIU, S.; LIU, X.; LIU, J.J. & NIU, Y. TrkC expression predicts favorable clinical outcome in invasive ductal carcinoma of breast independent of NT-3 expression. *Am J Cancer Res*, 4(6):811–23, 2014.

ZHANG, Y.; FUJIWARA, Y.; DOKI, Y.; TAKIGUCHI, S.; YASUDA, T.; MIYATA, H.; YAMAZAKI, M.; NGAN, C.Y.; YAMAMOTO, H.; MA, Q. & MONDEN, M. Overexpression of tyrosine kinase B

protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*, 75:17–26, 2008.

ZHANG, Z.; HAN, L.; LIU, Y.; LIANG, X. & SUN, W. Upregulation of Tropomyosin related kinase B contributes to resistance to detachment-induced apoptosis in hepatoma multicellular aggregations. *Mol Biol Rep*, 36:1211–6, 2009.

ZHENG, W.; DAI, Q.; TAO, P.; SUN, A.; WANG, Y.; BAO, L. & ZHANG, G. Overexpression of tyrosine kinase receptor B promotes metastasis of ovarian serous adenocarcinoma by lymphangiogenesis. *Tumori*, 97(6):756–61, 2011.

ZHU, Z.W.; FRIESS, H.; WANG, L.; BOGARDUS, T.; KORC, M.; KLEEFF, J. & BÜCHLER, M.W. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 7:105–112, 2001.

ZUCMAN-ROSSI, J.; BATZER, M.A.; STONEKING, M.; DELATTRE, O. & THOMAS, G. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet*, 99:357–363, 1997.

10. CURRÍCULO LATTES RESUMIDO

Identificação

Nome Tiago Elias Heinen
Nascimento 16/12/1985 Lajeado/RS - Brasil

É formado pelo Curso de Biomedicina com habilitação em Biologia Molecular e Toxicologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e, atualmente, está estudando Medicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Possui mestrado em Ciências da Saúde pela UFCSPA e está fazendo doutorado no programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS.

Endereço profissional Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Laboratório de Pesquisas em Câncer
Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, Centro de Pesquisas
Experimentais
Santana - Porto Alegre
90035-903, RS - Brasil
Telefone: 51 2101.7616

Endereço eletrônico tiagoheinen@gmail.com

Nome em citações bibliográficas HEINEN, T. E.; Heinen, Tiago Elias; Tiago E.
Heinen; Tiago Elias Heinen; TIAGO E. HEINEN;
TIAGO ELIAS HEINEN; Heinen, T. E.

Formação acadêmica/titulação

2012 - atual Graduação em andamento em Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

2011 - atual Doutorado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de terapias-alvo para o tratamento do sarcoma de Ewing: um estudo molecular e celular, Orientador: Rafael Roesler.

2009 - 2011 Mestrado em Ciências da Saúde (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Estudo dos efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de células tumorais, Ano de Obtenção: 2011. Orientador: Cláudio Osmar Pereira Alexandre.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

2005 – 2008 Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* Sobre a Poliferação e Viabilidade de Células Tumorais. Orientador: Ana

Beatriz Gorini da
de

Veiga. Bolsista do(a): Universidade Federal de Ciências da Saúde
Porto Alegre, UFSCPA, Brasil.

Atuação Profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2011 - Atual Vínculo: Doutorado acadêmico, Enquadramento Funcional: Aluno de doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

2008 - 2008 Vínculo: Estágio Curricular, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20. Outras informações: Estágio curricular para a habilitação em Toxicologia no curso de biomedicina da UFCSPA. adquirir

Atividades

2011-Atual Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Biotecnologia. Linhas de pesquisa: Identificação de terapias-alvo para o tratamento de sarcoma de Ewing.

01/2008 - 07/2008 Estágios, Centro de Biotecnologia. Estágio realizado. Estágio em análises toxicológicas e genotoxicológicas.

2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

2007 - 2009 Vínculo: Aluno de Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Aluno de Iniciação Científica, Carga horária: 25.

Atividades

5/2007 - 12/2008 Estágios, Laboratório de Pesquisa em Câncer. Estágio realizado. Estudo dos efeitos do veneno da lagarta *Lononia obliqua* na proliferação viabilidade de células tumorais.

3. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

2009 – 2011 Vínculo: Mestrado acadêmico, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

2006 – 2008 Vínculo: Aluno de Iniciação Científica, Carga horária: 20.

2005 - 2006 Vínculo: Aluno de Iniciação Científica, Carga horária: 20.

Atividades

- 7/2006 - 12/2008** Estágios, Departamento de Ciências Fisiológicas, Biologia Molecular. Estágio realizado. Estudo dos efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de células tumorais.
- 6/2005 - 1/2006** Estágios, Departamento de Ciências Fisiológicas. Estágio realizado. Estudo da densidade de espinhos dentríticos da região CA1 do hipocampo dorsal e da região pósterodorsal da amígdala medial de ratos após treino em esquivas inibitórias.

Projetos de pesquisa

- 2011 - Atual** Identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de terapias-alvo para o tratamento de sarcoma de Ewing: um estudo molecular e celular. Descrição: O estudo visa empregar diferentes técnicas de biologia celular e molecular com o intuito de descobrir novos tratamentos farmacológicos para o tratamento do sarcoma de Ewing. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
- 2006 - 2006** Efeito da *Casearia sylvestris* sobre a ulceração da mucosa gástrica produzida pelo aas e álcool. Descrição: verificar os efeitos de substâncias ativas da casearia sylvestris na prevenção de úlceras gástricas. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
- 2005 - 2006** Obtenção e caracterização de substâncias ativas de folhas de *Morus alba* e avaliação da citologia vaginal de ratas wistar. Descrição: separação e quantificação de princípios ativos de morus alba para testar seus efeitos sobre a citologia vaginal de ratas oovarectomizadas.

Revisor de periódico

Cell Death and Disease - 2013

The Chinese Journal of Physiology – 2013

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. HEINEN, T. E. ; FARIAS, C.B. ; ABUJAMRA, A.L. ; MENDONÇA, R.Z. ; ROESLER, R. ; ROESLER, R. ; DA VEIGA, A.B. . Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines (published online January 22 2013). *Cytotechnology* (Dordrecht) ^{JCR}, v. x, p. x, 2013.

2. de Farias, Caroline Brunetto ; SCHWARTSMANN, G. ; Heinen, Tiago Elias ; Schwarstmann, Gilberto ; dos Santos, Rafael Pereira ; Abujamra, Ana Lucia ; Roesler, Rafael . BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Print) ^{JCR}, v. x, p. x-xx, 2012. Citações: [WEB OF SCIENCE](#) = 7 | [SCOPUS](#) 8

3. Heinen, Tiago Elias ; Gorini da Veiga, Ana Beatriz . Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* (Oxford) ^{JCR}, v. 57, p. 497-511, 2011. Citações: [WEB OF SCIENCE](#) = 23|[SCOPUS](#)28

4. Brunetto de Farias, Caroline ; Rosemberg, Denis Broock ; Heinen, Tiago Elias ; Koehler-Santos, Patricia ; Abujamra, Ana Lucia ; Kapczinski, Flávio ; Brunetto, Algemir Lunardi ; Ashton-Prolla, Patricia ; Meurer, Luise ; Reis Bogo, Maurício ; Damin, Daniel C. ; Schwartzmann, Gilberto ; Roesler, Rafael . BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Oncology* ^{JCR}, v. 79, p. 430-439, 2010. Citações: [WEB OF SCIENCE](#) = 12|[SCOPUS](#)9

Artigos aceitos para publicação

1. CORNELIO, D. B. ; FARIAS, C. B. ; PRUSCH, D. S. ; Heinen, Tiago Elias ; dos Santos, Rafael Pereira ; Abujamra, Ana Lucia ; Schwarzmman, Gilberto ; Roesler, Rafael . Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Molecular and Clinical Oncology*, 2013.

Apresentações de Trabalho

1. HEINEN, T. E. ; Rocha, A. ; FARIAS, C. B. ; Santos, R. ; ABUJAMRA, A. ; ROESLER, R. . O papel de neurotrofinas e seus receptores em linhagens celulares de sarcoma de Ewing. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

2. HEINEN, T. E. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; ROESLER, R. ; Alexandre, C.O.P. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de células tumorais. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

3. HEINEN, T. E. ; FARIAS, C. B. ; PRUSCH, D. S. ; ABUJAMRA, A. ; ROESLER, R. ; VEIGA, A. B. G. ; ALEXANDRE, C. O. P. . Estudos dos efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de células tumorais. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. FARIAS, C. B. ; ROSEMBERG, D. B.DENIS, ; HEINEN, T. E. ; ABUJAMRA, A. ; KOEHLER-SANTOS, P. ; KAPCZINSKI, F. ; BRUNETTO, A. L. ; ASHTON-PROLLA, P. ; MEURER, L. ; BOGO, M. R. ; DAMIN, D. C. ; SCHWARTSMANN, G. ; ROESLER, R. . GRPR regula a expressão e secreção de BDNF em células de câncer colorretal humanas através de um mecanismo dependente de EGFR. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5. FARIAS, C. B. ; HEINEN, T. E. ; SANTOS, R. P. ; PRUSCH, D. S. ; ABUJAMRA, A. ; KAPCZINSKI, F. ; BRUNETTO, A. L. ; DAMIN, D. C. ; SCHWARTSMANN, G. ; ROESLER, R. . Avaliação dos níveis de BDNF em tecidos de pacientes com câncer colorretal. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. PRUSCH, D. S. ; FARIAS, C. B. ; ROSEMBERG, D. B.DENIS, ; HEINEN, T. E. ; KOEHLER-SANTOS, P. ; ABUJAMRA, A. ; KAPCZINSKI, F. ; BRUNETTO, A. L. ; ASHTON-PROLLA, P. ; MEURER, L. ; BOGO, M. R. ; DAMIN, D. C. ; SCHWARTSMANN, G. ; ROESLER, R. . Avaliação da expressão de GRPR e TRKB em câncer colorretal. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).

7. PRUSCH, D. S. ; FARIAS, C. B. ; ROSEMBERG, D. B.DENIS, ; HEINEN, T. E. ; ABUJAMRA, A. ; KAPCZINSKI, F. ; BRUNETTO, A. L. ; ASHTON-PROLLA, P. ; MEURER, L. ; BOGO, M. R. ; SCHWARTSMANN, G. ; ROESLER, R. . Regulação dos níveis de neurotrofinas pelo receptor do

- peptídeo liberador de gastrina em células de câncer colorretal humano. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
8. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
9. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; LIMA, R. C. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
10. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; LIMA, R. C. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
11. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; LIMA, R. C. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
12. FARIAS, C. B. ; LIMA, R. C. ; HEINEN, T. E. ; NERY, L. R. ; LUBIAN, A. ; BRUNETTO, A. L. ; SCHWARTSMANN, G. ; ROESLER, R. . The Cotreatment Between RC-3095 and Chemotherapics: a New Antitumoral Strategy to Colorectal Cancer in vitro. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
13. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
14. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; BRUNETTO, A. L. ; FARIAS, C. B. ; ABUJAMRA, A. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
15. HEINEN, T. E. ; FARIAS, C. B. ; LIMA, R. C. ; ABUJAMRA, A. ; BRUNETTO, A. L. ; ROESLER, R. ; VEIGA, A. B. G. . Efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de células tumorais. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
16. HEINEN, T. E. ; ROESLER, R. ; VEIGA, A. B. G. . Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e a Viabilidade de Células Tumorais. 2007. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
17. HEINEN, T. E. ; COUTO, Vinícius Sgorla ; DANTAS, D. C. M. . Efeito da *Caseraria sylvestris* sobre a ulceração de mucosa gátrica pelo AAS e álcool. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
18. HEINEN, T. E. ; DANTAS, D. C. M. ; RHODEN, C. R. . O Uso de Bioindicadores Para o Monitoramento Ambiental. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
19. COUTO, Vinícius Sgorla ; HEINEN, T. E. ; BOLZAN, V. C. ; LANDO, V. R. ; DANTAS, D. C. M. . Identificação de Compostos Esteróides nas Folhas de *Morus nigra*. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

20. BRUSCO, Janaína ; HEINEN, T. E. ; RASIA-FILHO, A. ; Fin, C. A. . Estudo da densidade de espinhos dendríticos na região pósterio-dorsal da amígdala medial durante a formação da memória. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
21. BRUSCO, Janaína ; HEINEN, T. E. ; RASIA-FILHO, A. ; Fin, C. A. . Estudo da densidade de espinhos dendríticos na região CA1 hipocampal durante a formação da memória. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
22. HEINEN, T. E. ; COUTO, Vinícius Sgorla ; LANDO, V. R. ; DANTAS, D. C. M. ; BOLZAN, V. C. . Extração de Princípios Ativos de Morus alba e Morus nigra. 2005. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. HEINEN, T. E.. Participação em banca de Rafael Pereira dos Santos. Avaliação do papel de BDNF/TrkB em processos de resiliência em células de câncer colorretal humano. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. HEINEN, T. E.. II Semana Científica da UFCSPA. 2009. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. HEINEN, T. E. ; COMIM, G.O. ; VEIGA, A. B. G. ; NATAN, G. ; MORESCO, M. ; BACK, F. P. . IV Jornada Acadêmica de Biomedicina da UFCSPA. 2008. (Outro).
2. HEINEN, T. E. ; VEIGA, A. B. G. ; MATTEVI, V. S. ; ALEXANDRE, C. O. P ; ALMEIDA, S. ; GALVÃO, A.C.S. ; GASPAROTTO, A. S . IV Curso de Biologia Molecular Aplicado às Ciências da Saúde. 2007. (Outro).
3. HEINEN, T. E. ; COUTO, Vinícius Sgorla ; COMIM, G.O. ; NICOLINI, C. ; LEGUISAMO, N. ; CASTRO, E. . III Jornada Acadêmica da Biomedicina da FFFCMPA. 2007. (Outro).
4. HEINEN, T. E. ; GALVÃO, A.C.S. ; GASPAROTTO, A. S ; VEIGA, A. B. G. ; ALEXANDRE, C. O. P ; ALMEIDA, S. ; MATTEVI, V. S. . I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada às Ciências da Saúde. 2007. (Outro).
5. HEINEN, T. E. . I Curso de Boas Práticas de Laboratório. 2006. (Outro).