

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Kelly de Vargas Pinheiro

**EFEITO DO BLOQUEIO COMBINADO DE RECEPTORES TIROSINA QUINASE  
NO CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMA EXPERIMENTAL**

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Kelly de Vargas Pinheiro

**EFEITO DO BLOQUEIO COMBINADO DE RECEPTORES TIROSINA QUINASE  
NO CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

2018

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, em nível de Doutorado do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.10.2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Márcia Rosângela Wink  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Fabio Klamt  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Patrícia Pereira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Pinheiro, Kelly de Vargas  
EFEITO DO BLOQUEIO COMBINADO DE RECEPTORES  
TIROSINA QUINASE NO CRESCIMENTO DE GLIOBLASTOMA  
EXPERIMENTAL / Kelly de Vargas Pinheiro. -- 2018.  
79 f.  
Orientador: Rafael Roesler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,  
BR-RE, 2018.

1. Glioblastoma. 2. Receptores tirosina quinase.  
3. TrkB. 4. Terapia alvo. 5. EGFR. I. Roesler,  
Rafael, orient. II. Título.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Câncer e Neurobiologia no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); processos número 409287/2016-4 (Edital Universal 01/2016 - Faixa C) e 303276/2013-4 (Produtividade em Pesquisa - PQ 2013 - Nível 1A), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto do Câncer Infantil (ICI), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) – Projetos nº 14-0622/16-0096/16-0098.

*Dedico este trabalho à minha amada família, em especial,  
aos meus sobrinhos Rafa e Tiago por me ensinarem  
que em meu coração cabe muito mais amor do que eu imaginava!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, iluminar e pela saúde para encarar com tranquilidade as dificuldades do cotidiano.

Ao meu orientador, professor Rafael pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, por acreditar no meu trabalho e ter aceitado me orientar no doutorado. Obrigada pelo exemplo, pela confiança e por compartilhar de sua visão científica, que motivou um novo olhar sobre a ciência.

À Carol por ter me acolhido no lab, pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade, pela paciência e pela dedicação em proporcionar condições para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e pelo apoio em todos os momentos desta caminhada.

Ao amor da minha vida, Beto, pelo amor, incentivo e compreensão durante estes anos. Sem você certamente eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelo companherismo, por me ouvir, por entender minhas faltas, pelos churrascos e IPAs na comemoração de cada etapa finalizada e por me fazer sentir capaz de realizar mais um sonho dizendo: “calma, a tua hora vai chegar!”. Eu te amo!!

À toda a minha família, em especial os meus pais Juarez e Nair, obrigada por serem os meus maiores incentivadores, por se orgulharem das minhas escolhas e sempre me ensinarem a perseguir meu ideal com dedicação e coragem. Minhas referências! À vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

Às minhas queridas amigas onde juntas construímos mais que um “Nós 4”. Vocês são o grande presente que o doutorado me deu. Camila, Mirela e Dani obrigada pela amizade, por escutarem minhas angústias e dividirem comigo sorrisos, sonhos, viagens, a vida. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos e pelas palavras de carinho e conforto.

Aos meus colegas do LAPESC pela convivência diária e pelos momentos que vivenciamos. Agradeço em especial a Nati (minha IC querida), a Bárbara e a Amanda, cuja ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada pelas inúmeras discussões sobre experimentos, protocolos e companhia para o cafezinho com brigadeiro no Caliente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização deste curso, assim como as instituições e fontes financiadoras pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração e o desenvolvimento deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

“There are many hypotheses in science which are wrong. That’s perfectly all right: it’s the aperture to finding out what’s right. Science is a self-correcting process.”

*Carl Sagan*

## RESUMO

O glioblastoma (GBM) — glioma grau IV OMS — é o tumor cerebral primário mais frequente em adultos, representando um grupo heterogêneo de neoplasias que estão entre os cânceres mais agressivos. Está associado com uma progressão clínica maligna, caracterizada pela invasão disseminada de todo o tecido cerebral e alta resistência a abordagens terapêuticas convencionais. O GBM tem uma patogênese muito complexa que envolve mutações e alterações de várias vias celulares que estão envolvidas na proliferação celular, sobrevivência, migração e angiogênese. Neste contexto, os receptores tirosina quinase tem um papel fundamental. Por isso, neste trabalho investigamos os efeitos da inibição seletiva combinada do receptor tropomiosina quinase B (TrkB) e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) na viabilidade celular de linhagens de GBM e em um modelo *in vivo* de GBM. Os inibidores seletivos de TrkB, ANA-12, e de EGFR, AG 1478, foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade em ambas as linhagens, mas um efeito sinérgico foi observado apenas nas células A172. Sugerimos que esses efeitos sejam mediados pela ativação de um G1/S *checkpoint*, resultando em uma parada no ciclo celular, em função dos danos induzidos na molécula de DNA. Da mesma forma, a atividade da proteína c-Myc foi interrompida de maneira crescente na linhagem tumoral A172 confirmando o envolvimento desse fator de transcrição na patogênese do GBM. Enquanto que os tratamentos promoveram redução do volume tumoral *in vivo* 15 e 31 dias após a inoculação subcutânea da linhagem celular U87. Esses resultados fornecem evidências de que o bloqueio combinado das funções dos receptores TrkB e EGFR pode se tornar um alvo atrativo no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para o GBM.

**Palavras-chave:** glioblastoma, receptores tirosina quinase, TrkB, terapia alvo, EGFR



## ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) — WHO grade IV glioma — is the most common primary brain tumor in adults, representing a heterogeneous group of neoplasms that are among the most aggressive cancers. It is associated with malignant clinical progression, characterized by disseminated invasion of all brain tissue and high resistance to conventional therapeutic approaches. GBM has a very complex pathogenesis involving mutations and alterations of various cellular pathways that are involved in cell proliferation, survival, migration and angiogenesis. In this context, tyrosine kinase receptors have a key role. Therefore, in this work investigated the effects of combined selective inhibition of tropomyosin kinase B receptor (TrkB) and epidermal growth factor receptor (EGFR) on the viability of GBM cells and *in vivo* GBM model. Selective inhibitors of TrkB, ANA-12, and EGFR, AG 1478, were able to reduce significantly viability in both cell lines, but a synergistic effect was observed only in A172 cells. We suggest that these effects be mediated by the activation of a G1/S checkpoint, resulting in a cell cycle arrest, due to induced damage in the DNA molecule. Likewise, c-Myc protein activity was increasingly disrupted in the A172 cell tumor line, confirming the involvement of this transcription factor in GBM pathogenesis. The treatments promoted reduction of tumor volume *in vivo* 15 and 31 days after subcutaneous inoculation of the U87 cell line. These results provide evidence that the combined blockade of TrkB and EGFR receptor functions may become an attractive target in the development of novel treatment strategies for GBM.

**Key words:** glioblastoma, tyrosine kinase receptors, TrkB, target therapy, EGFR

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Modelos de ativação dos receptores Trk e p75 .....	17
<b>Figura 2</b> – Ilustração da sinalização celular associada a receptores de neurotrofinas ..	19
<b>Figura 3</b> – Estrutura da molécula ANA-12 .....	21
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da ativação do receptor EGFR induzido por EGF .....	23
<b>Figura 5</b> – Via de sinalização mediada por EGFR/EGFRvIII .....	25
<b>Figura 6</b> – Estrutura da molécula AG 1478 .....	27

### ARTIGO 1

<b>Figure 1</b> - Selective TrkB inhibition reduces the viability of human glioma cells .....	30
---	----

### ARTIGO 2

<b>Figure 1</b> – Effect of TrkB and EGFR inhibition alone or in combination on cell viability of glioblastoma .....	47-48
<b>Figure 2</b> – Synergistic effect of TrkB and EGFR inhibition in A172 GBM cells .....	49
<b>Figure 3</b> – Effect of TrkB and EGRF inhibition alone or in combination on the cell cycle of GBM cell lines .....	50
<b>Figure 4</b> – Blocking of TrkB and EGFR induces downregulation of the ERK signaling pathway .....	51
<b>Figure 5</b> – Pharmacologic inhibition of TrkB or EGFR receptors in an <i>in vivo</i> GBM model .....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AG1478** N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinamine (Tyrphostin AG1478)

**AKT** Proteína quinase B

**ANA-12** (N-[2-[[[Hexa-hidro-2-oxo-1H-azepin-3-il)amino]-arbonil]fenil]benzo[b]tiofeno-2-carboxamida)

**BDNF** Brain-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do cérebro)

**DMSO** Dimetil sulfóxido

**EGFR** Epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)

**ERK** Extracellular signal-regulated kinases (quinase reguladora de sinal extracelular)

**EtOH** Etanol

**GBM** Glioblastoma

**IC<sub>50</sub>** Concentração Inibitória 50%

**MAPK** Proteína quinase mitógeno-ativada

**min** Minutos

**mm<sup>3</sup>** Milímetros cúbicos

**NT-3** Neurotrofina 3

**NT-4/5** Neurotrofina 4/5

**PI3K** Fosfatidilinositol 3 quinase

**PKC** Proteína cinase C

**RTK** Receptor tyrosine kinase (receptores tirosina quinase)

**SNC** Sistema Nervoso Central

**TMZ** Temozolomida

**TrkB** Tropomyosin related kinase B (Receptor quinase relacionado )

**μM** Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
1.1. Tumores cerebrais: glioblastoma .....	13
1.2. Novos alvos moleculares .....	15
1.2.1. Neurotrofinas .....	15
1.2.1.1. Sinalização celular associada a receptores de neurotrofinas .....	17
1.2.1.2. Neurotrofinas e Trk: papel no câncer cerebral .....	19
1.2.1.3. ANA-12 .....	21
1.2.2. Receptor do fator de crescimento epidérmico: EGFR .....	22
1.2.2.1. Tyrphostin AG 1478 .....	26
1.3 TrkB e EGFR .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. ABORDAGEM METODOLÓGICA</b> .....	28
<b>4. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	30
4.1. Targeting tirosine receptor kinase B in gliomas .....	30
4.2. Pharmacologic inhibition of TrkB and EGFR decreases cell viability and delays tumor growth by downregulating the ERK pathway in glioblastoma .....	33
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	68
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	69

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. Tumores cerebrais: glioblastoma

O câncer é caracterizado como uma doença multifatorial que envolve inúmeros mecanismos complexos e, além disso, está entre as principais causas de morte no mundo. Para o mundo economicamente em desenvolvimento, a incidência do câncer deve aumentar para cerca de 60% em relação aos novos casos. No Brasil, mais de 11 mil novos casos de tumores cerebrais ocorrerão em 2019, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017).

*Gliomas* são tumores primários do sistema nervoso central (SNC), que formam um grupo heterogêneo de neoplasias com vários tipos histológicos e graus de malignidade. (OSTROM et al, 2014). Entre os mais frequentes e agressivos diagnosticados estão os *Gliomas Difusos*, os quais possuem um elevado potencial maligno, caracterizado pela invasão generalizada de todo o tecido cerebral e alta resistência a abordagens terapêuticas convencionais (FURNARI et al., 2007; TAYLOR; FURNARI; CAVENEE, 2012). Os gliomas difusos são classificados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) de acordo com suas características histopatológicas em astrocitário, oligodendroglial, ou misto (oligodendroglial-astrocitário) juntamente com o grau de malignidade: II (baixo grau), III (anaplásico) ou IV (glioblastoma) (PERRY; WESSELING, 2016).

O mais comum e biologicamente agressivo destes é o *Glioblastoma* (GBM), e recebe grau IV, pois representa a máxima fase de evolução e é uma das malignidades humanas mais letais e desafiadoras a serem tratadas (SHERGALIS et al., 2018). Isso porque exibe características de proliferação celular descontrolada, propensão para a necrose, angiogênese robusta, intensa resistência à apoptose, e excessiva instabilidade genômica. Como refletido no seu antigo apelido de “multiforme” apresenta heterogeneidade intratumoral significativa no âmbito citopatológico, transcricional e genômico (SMITH; IRONSIDE, 2007; FURNARI et al., 2007; AGNIHOTRI et al., 2013).

São tumores que ocorrem, principalmente, nos hemisférios cerebrais, 95% destes são diagnosticados na região supratentorial, enquanto que raramente podem

ser encontrados no cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (NAKADA et al., 2011). O pico de incidência é uma idade média de 64 anos, mas pode estar presente em qualquer fase da vida, incluindo a infância (THAKKAR et al., 2014). E, considerando sua descrição e comportamento patológico, o prognóstico é bastante desfavorável em relação a sobrevida dos pacientes, aproximadamente, 12-15 meses, mesmo com o uso de modalidades de tratamento intensivo (FURNARI et al., 2007; TAYLOR; FURNARI; CAVENEE, 2012)

De fato, considerando sua complexa biologia e patogênese altamente letal, o tratamento do GBM requer uma abordagem multidisciplinar. A terapia padrão atual inclui ressecção cirúrgica segura máxima, seguida por radioterapia concomitante com a administração, via oral, de Temozolomida (TMZ) (Temodal®), um agente quimioterápico alquilante e, em seguida, quimioterapia adjuvante com TMZ (WEN; KESARI, 2008; KUMTHEKAR et al., 2014; DAVIS, 2016)

A ressecção cirúrgica extensa e completa do GBM é difícil, uma vez que esses tumores são frequentemente invasivos e na maioria das vezes, estão localizados em áreas importantes do cérebro, incluindo aquelas que controlam a fala, a função motora e os sentidos. Devido ao alto grau de invasividade, a retirada da massa tumoral primária não é curativa, e as células tumorais infiltrantes invariavelmente permanecem no tecido cerebral circundante, levando à progressão ou recorrência tardia da doença.

Assim, diante deste contexto, é essencial o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento deste tipo tumoral que contemplem sua heterogeneidade. Avanços significativos no entendimento da patologia molecular do GBM e nas vias de sinalização celular associadas estão abrindo oportunidades para novas terapias em casos de doença recorrente, como também, para aquelas recém diagnosticadas (ROESLER et al., 2010; PERRY et al., 2012)

O desenvolvimento emergente de novas terapias, direcionadas a múltiplos alvos moleculares, como uma abordagem alternativa às convencionais parece ser uma opção promissora em GBM.

## 1.2. Novos alvos moleculares

Vias de sinalização celular dinâmicas governam as células cancerígenas. Isso porque o desequilíbrio na expressão de proteínas, que constituem essas vias, pode permitir escapar da apoptose e proliferar, uma característica determinante para o desenvolvimento e progressão tumorais (SHERGALIS et al., 2018).

A busca de terapias-alvo para o tratamento de tumores cerebrais envolve uma melhor compreensão das vias moleculares subjacentes que conduzem à malignidade no glioblastoma. Identificando e caracterizando os componentes envolvidos nessas sinalizações torna possível a escolha de agentes moduladores como potenciais alvos terapêuticos, visando especificamente as células tumorais e o microambiente tumoral (TOUAT et al., 2017).

Entre as várias abordagens que estão sendo investigadas, as que incluem terapias voltadas para vias de regulação celular associadas a receptores tirosina-quinase e inibidores de transdução desse sinal apresentam potenciais terapêuticos bem documentados por exemplos marcantes, como no caso do Trastuzumabe, Imatinibe, Bevacizumabe, Cetuximabe, Gefitinibe, e Erlotinibe (VIVANCO et al., 2012; PEARSON; REGAD, 2017).

No entanto, até o momento, nenhuma terapia direcionada foi formalmente validada como eficaz em testes clínicos, e as respostas terapêuticas ainda são semelhantes às aquelas documentadas com as terapias convencionais. A falta de conhecimento sobre fatores moleculares relevantes *in vitro* e *in vivo* combinada com a falta de bioatividade considerável das terapias dirigidas permanecem desafios significativos, sugerindo também, que a ênfase em um único alvo ou monomodal possa não representar a melhor abordagem terapêutica para o GBM, especialmente porque, sua alta complexidade, deve estar sendo desprezada.

Neste contexto, as neurotrofinas e os fatores de crescimento têm destaque especial, uma vez que podem ser uma promessa para o aperfeiçoamento dos tratamentos convencionais.

### 1.2.1. Neurotrofinas

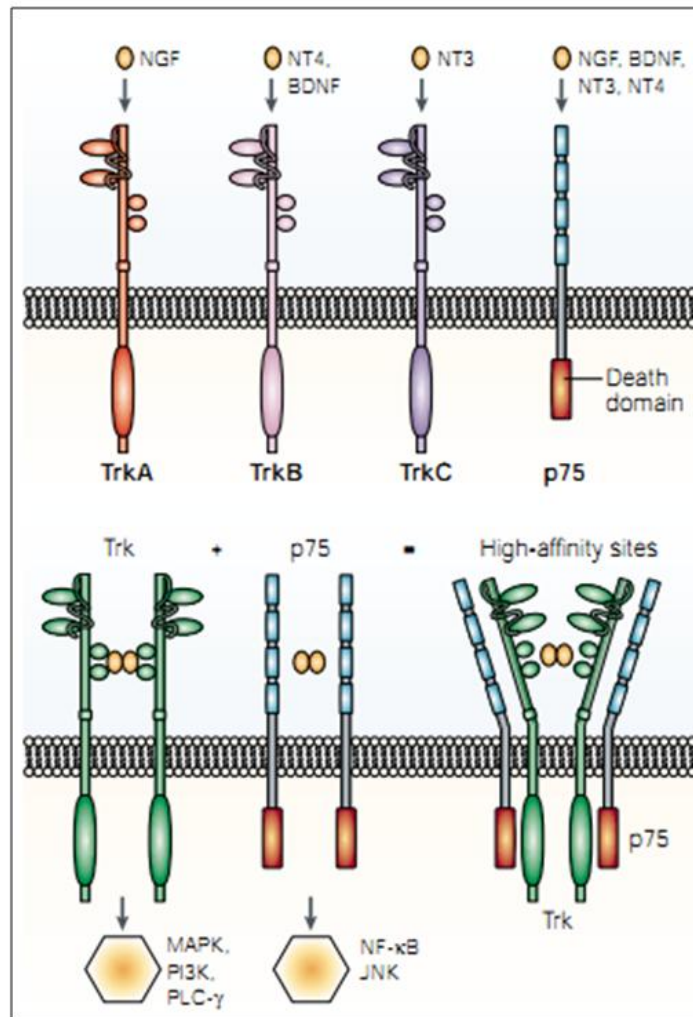
Neurônios são células especializadas que apresentam uma morfologia complexa e representam a unidade funcional do sistema nervoso. Durante o

desenvolvimento, as redes neurais são estabelecidas de forma altamente organizada, que persiste por toda a vida. O controle da vida e da morte de uma célula é um processo que se baseia em fatores de crescimento, citocinas, receptores, mecanismos de sinalização coordenados, e também em neurotrofinas, as quais desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento do sistema nervoso (COHEN-CORY et al, 2010). As decisões do destino da célula são essenciais para o desenvolvimento e funcionamento normal, bem como o desenvolvimento de estados de doença. O equilíbrio de sinalização dentro de um determinado tipo de célula determina este resultado (LYNN SNIDERHAN, 2008).

As neurotrofinas formam uma família de proteínas intimamente relacionadas, sendo o primeiro membro desta família identificado como Fator de Crescimento Neural ( NGF, da sigla em inglês para *Neural Growth Factor*), descoberto por Rita Levi-Montalcini na década de 1940 foi o pioneiro no campo da pesquisa de fatores de crescimento. O NGF é o membro protótipo da pequena família de neurotrofinas, que inclui também o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF da sigla em inglês de *brain derived neurotrophic factor*), neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (KRÜTTGEN; SCHNEIDER; WEIS, 2006; MOLLOY; READ; GORMAN, 2011).

Elas exercem suas ações através da ligação à duas diferentes classes de receptores transmembrana: uma família de receptores tirosina-quinase (RTKs) chamado receptores de quinase relacionados à tropomiosina (*tropomyosin related kinase*, ou TrkA, TrkB e TrkC) onde ocorre uma ligação com as neurotrofinas de alta afinidade e especificidade. E ligação ao receptor de comum às neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>, ao contrário do que ocorre com os Trks, a ligação é de baixa afinidade (KRÜTTGEN et al, 2006), como demonstrado na Figura 1. Esse sistema dual permite a transdução de diferentes sinais e é responsável por permitir às neurotrofinas controlar aspectos que envolvem o desenvolvimento e função de neurônios em ambos os sistemas nervosos central e periférico incluindo funções estabelecidas na diferenciação neuronal, regulação do crescimento de neuritos, regulação sináptica e sobrevivência e morte celular (HUANG; REICHARDT, 2001); SKAPER, 2012; MEEKER; WILLIAMS, 2014).





**Figura 1. Modelos de ativação dos receptores Trk e p75.** A ligação da neurotrofina resulta na dimerização de cada receptor. Neurotrofinas ligam-se seletivamente a receptores específicos Trk, enquanto todas as neurotrofinas ligam-se a p75. Receptores Trk contêm domínios extracelulares de imunoglobulina G (IgG) para a ligação do ligante e uma sequência tirosina-quinase catalítica no domínio intracelular. Adaptado de CHAO, 2003.

### 1.2.1.1. Sinalização celular associada a receptores de neurotrofinas

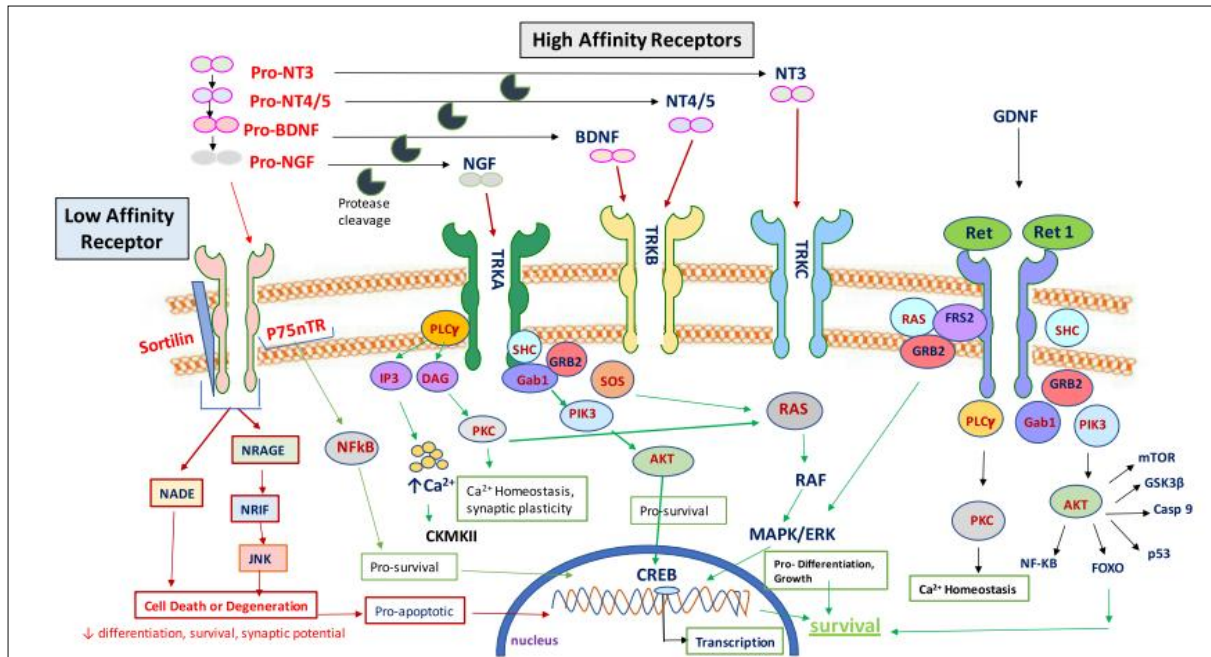
A sinalização mediada pelos receptores Trks ocorre através da dimerização do receptor e sua fosforilação nos resíduos de tirosina (domínio intracelular). A partir daí é desencadeada uma cascata de sinalização incluindo a ativação de vias intracelulares responsáveis por um efeito protetor nos neurônios (Figura 2). Uma via é a ativação da fosfolipase C gama ( $PLC\gamma$ ) com o consequente aumento dos níveis intracelulares de cálcio e ativação das vias da PKC (proteína cinase C) que promovem a plasticidade sináptica (SARIOLA et al., 1994; REICHARDT, 2006). Outra via inclui a ativação de proteínas como Shc que levam à ativação da RAS e, conseqüentemente, as vias da proteína quinase mitógeno-

ativada (MAPK) e da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Essas vias são responsáveis, em muitas células, pela regulação dos fenômenos de neuritogênese e sobrevivência (KAPLAN; MILLER, 2000).

Já as moléculas que participam do mecanismo de sinalização celular via receptor de baixa afinidade das neurotrofinas, o p75<sup>NTR</sup>, podem contribuir para a sobrevivência da célula, como é o caso da ativação da via NF- $\kappa$ B, crescimento de neuritos (regulando a atividade Rho) e a motilidade celular (IBÁÑÉZ, 2002). Quando a ativação via Trk está reduzida ou ausente, os níveis de expressão elevados de p75 pode levar as células susceptíveis à morte celular por apoptose através, por exemplo, da ativação de c-Jun N-terminal quinase (JNK) (YOON et al, 1998; FRIEDMAN, 2000).

Receptores Trks foram identificados pela primeira vez em 1986 como oncogenes presentes em um carcinoma de colo humano (MARTIN-ZANCA et al., 1986). A partir de então, iniciou-se pesquisas sobre o envolvimento dos Trks em câncer. Entretanto, ao longo dos anos, a caracterização de neurotrofinas e seus receptores como moléculas comprometidas, não somente, com funções normais no SNC como desenvolvimento, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica, mas também o seu papel em processos patológicos, especialmente no câncer tem sido explorada.

Dada à importância que as neurotrofinas e os receptores Trks desempenham sobre a sobrevivência de muitos tipos de células diferentes, em ambas as configurações normais e patológicas, é essencial compreender o mecanismo subjacente pelo qual estas moléculas e seus receptores exercem seus efeitos em processos tumorais, principalmente naqueles de difícil tratamento, como o glioblastoma, na procura por novas abordagens pertinentes à gênese, à progressão e ao comportamento clínico dos desses tumores cerebrais. E assim, identificar novos e possíveis alvos terapêuticos para esse tipo agressivo de neoplasia.



**Figura 2.** Ilustração da sinalização celular associada a receptores de neurotrofinas. (NT = neurotrofinas, BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro, TRK = receptor tirosina quinase, GDNF = fator neurotrófico derivado da glia, PLC = fosfolipase C, RAS = proteínas Ras, GRB = fator de crescimento proteína ligada ao receptor 2, PIK3 = fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, AKT = AKT serina/ treonina-proteína quinases, PKC = proteína quinase C, CREB = proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc). Adaptado de KASHYAP et al., 2018.

### 1.2.1.2. Neurotrofinas e Trk: papel no câncer cerebral

O fato de que os receptores de neurotrofinas e Trks desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão de cânceres humanos foi revelado na descoberta de muitas destas moléculas. Os receptores de neurotrofinas são expressos em muitos tipos de neoplasias importantes, e em alguns casos, há evidências convincentes que as neurotrofinas desempenham um papel importante na biologia de células tumorais.

Devido aos seus efeitos sobre várias células do corpo, a contribuição destas proteínas na progressão tumoral, demonstrado por alguns estudos, não é surpreendente (BARNABÉ-HEIDER & MILLER, 2003; ROESLER et al., 2010). E sendo esse processo complexo, por envolver vários passos distintos, a sinalização de neurotrofinas, principalmente através dos Trks, foram identificadas como sendo importantes para o desenvolvimento e progressão de uma variedade de tipos tumorais (MATSUMOTO et al, 1995; OELMANN et al, 1995; DESCAMPS et al.,

1998; WEERARATNA et al, 2000; RICCI et al, 2001; PEREZ-PINERA et al, 2007; STEPHAN et al, 2008).

As neurotrofinas, dependendo do tipo do tumor a que se relacionam, podem aumentar o crescimento tumoral, por exemplo, p75<sup>NTR</sup> em pacientes com melanoma; p75<sup>NTR</sup> e TrkA no câncer de mama ou suprimir esse crescimento, por exemplo, p75<sup>NTR</sup> no câncer de próstata e TrkC em meduloblastoma (KRÜTTGEN et al., 2006). Além disso, estudos sugerem que as neurotrofinas são importantes na progressão do tumor e que a via de BDNF/TrkB pode estar envolvida no crescimento, metástase e resistência às terapias em vários outros tipos de cânceres (DESMET; PEEPER, 2006; THIELE; LI; MCKEE, 2009).

De fato, das quatro neurotrofinas identificadas as ações do BDNF, em neurônios centrais, têm sido melhor caracterizadas. Evidências sugerem de que a via de BDNF/TrkB pode estar envolvida no crescimento, metástase e resistência às terapias em vários outros tipos de cânceres (DESMET; PEEPER, 2006; THIELE; LI; MCKEE, 2009). A superexpressão de TrkB foi detectada em vários cânceres humanos (THIELE; LI; MCKEE, 2009) incluindo neuroblastoma (MATSUMOTO et al, 1995), meduloblastoma (THOMAZ et al., 2016), pâncreas (SCLABAS et al, 2005), cólon (BRUNETTO DE FARIAS et al., 2010; YU et al, 2010), estômago (ZHANG et al, 2008), mieloma múltiplo (PEARSE et al, 2005), sarcoma de Ewing (HEINEN et al., 2016) e carcinoma oral (MORIWAKI et al., 2018).

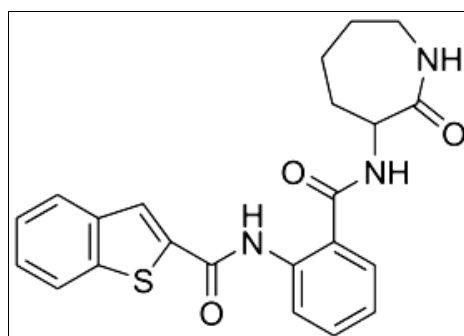
Além disso, o TrkB foi descrito estar relacionado com a indução resistência ao anoikis em câncer cervical (YUAN et al., 2018) e associado com um pior prognóstico e fenótipo maligno em câncer de pulmão (KIMURA et al., 2018). Têm sido relatado que a superexpressão de BDNF e seu receptor, TrkB, estão envolvidos com a indução da quimioresistência e facilitação da angiogênese em células de neuroblastoma (HUA et al., 2018; ASGHARZADEH et al., 2006; NAKAGAWARA *et al.*, 1994). Além disso, a superexpressão de TrkB e seu comprometimento com a sobrevivência de células iniciadoras de tumores cerebrais tem sido descrito em GBM (LAWN et al., 2015). Estes dados sugerem que o bloqueio da sinalização mediada pelas neurotrofinas podem constituir um instrumento terapêutico valioso para o tratamento de tumores que dependem dessas proteínas para a sobrevivência e/ou progressão.

Por isso, a introdução de terapias envolvidas com a inibição de receptores tirosina quinase tem se tornado comum em muitos ensaios clínicos em andamento.

Ensaio clínicos de fase II, estão sendo realizados para avaliação da eficácia terapêutica de moléculas como LOXO-101 (Larotrectinib) e Entrectinib, com indicação para uma série de tumores sólidos, incluindo tumores primários cerebrais como glioblastoma. Essas moléculas são classificadas como inibidores seletivos dos receptores de quinase relacionados a tropomiosina (RTKs), juntos eles mostraram uma precoce promessa como terapia antineoplásica (LANGE; LO, 2018). Porém, os inibidores de RTKs são relativamente novos no desenvolvimento clínico, ou seja, muitas informações sobre eles ainda permanecem desconhecidas ou pouco elucidadas.

### 1.2.1.3. ANA-12

O ANA-12 (N-[2 -[[[(Hexa-hidro-2-oxo-1H-azepin-3-il) amino] - carbonil] fenil]-benzo[b]tiofeno-2-carboxamida) liga-se seletivamente com alta potência ao TrkB, impedindo assim a ativação do receptor pelo BDNF. Cazorla e colaboradores (2011) utilizando, inicialmente, uma estrutura com base em uma triagem *in silico*, demonstraram, em um estudo envolvendo camundongos, a atividade ansiolítica e antidepressiva dessa molécula de baixo peso molecular. A porção benzeno identificada na sua estrutura confere a ela importantes propriedades farmacológicas e foi determinante para considerá-la seletiva para TrkB (Figura 3). ANA-12 é capaz de ligar-se na porção extracelular do receptor independentemente das alterações conformacionais desencadeadas pelo co-receptor p75 em TrkB (ver Figura 1).



**Figura 3.** Estrutura da molécula ANA-12 (CAZORLA et al., 2011)

Considerando os mecanismos que levam a uma regulação positiva de TrkB e BDNF nas células tumorais, crescentes são os estudos *in vitro* e *in vivo* que relatam o potencial quimioterapêutico de ANA-12 em ambas as modalidades. Uma

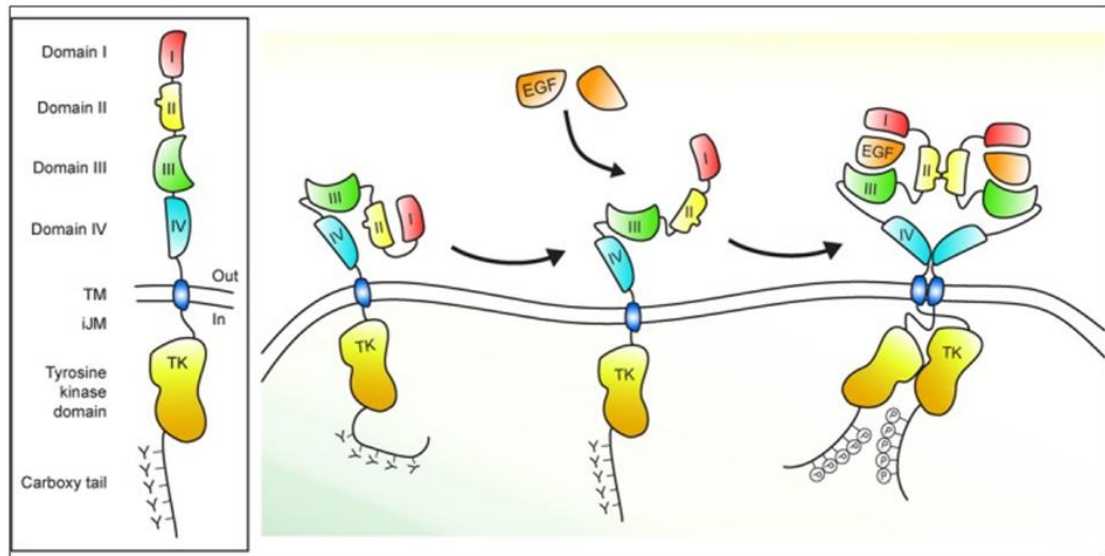
vez que essa pequena molécula inibidora bloqueia seletivamente a atividade de tirosina-quinase do TrkB torna-se potencialmente uma candidata para o tratamento de doenças malignas dependentes de neurotrofina (SINKEVICIUS et al., 2014; THOMAZ et al., 2016; HEINEN et al., 2016; MORIWAKI et al., 2018).

### 1.2.2. Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico: EGFR

O Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) também conhecido como HER1 ou ErbB1, é um receptor tirosina quinase transmembrana que pertence a superfamília ErbB de receptores. Esta é uma família composta por quatro receptores (ErbB 1-4 ou HER 1-4), sendo que o EGFR tem sido melhor caracterizado (ARTEAGA; ENGELMAN, 2014). A estrutura de cada um dos membros compreende: uma grande região extracelular (composta por quatro domínios - I, II, III e IV), um único domínio transmembrana, uma região intracelular justamembrana, um domínio tirosina quinase e uma região reguladora C terminal como demonstrado na Figura 4 (FERGUSON, 2008).

Os ligantes que regulam os receptores ErbB são fatores de crescimento da família do fator de crescimento epidérmico (EGF, sigla em inglês para *epidermal growth factor*) e podem ser classificados em dois grupos: agonistas EGF, que ativam EGFR e neuregulinas (NRG1-4), que ligam-se em ErbB3 e ErbB4. Os representantes do primeiro grupo são o EGF, o fator de crescimento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), a anfiregulina (AR), a epiregulina (EPR), a betacelulina (BTC). Destes, um subconjunto também pode ativar ErbB4 e são conhecidos como ligantes biespecíficos (HB-EGF, EPR e BTC) (FERGUSON, 2008).

A ligação do ligante à região extracelular do EGFR de cadeia única promove uma reorganização importante dos domínios, além de mudanças conformacionais locais, que são necessárias para gerar um homo ou heterodímero, resultando na autofosforilação da porção citoplasmática do receptor através da sua atividade de tirosina quinase (CIARDELLO & TORTORA, 2008; SINGH; COFFEY, 2014). A autofosforilação desencadeia uma série de sinalizações intracelulares mediadas pelas vias da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/ Akt) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)/quinase regulada por sinal extracelular (ERK), entre outras, (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; HYNES ; LANE, 2005).



**Figura 4.** Representação esquemática da ativação do receptor EGFR induzido por EGF. A região extracelular de EGFR abrange os domínios I, II, III e IV; A seguir estão a região transmembrana (TM), o domínio intracelular de justamembrana (iJM), o domínio tirosina quinase (TK) e a cauda carboxi-terminal. Adaptado de SIGISMUND *et al.*, 2018.

Sob condições fisiológicas, as células recebem sinais determinantes para seus destinos, a partir dos tecidos circundantes, principalmente sob a forma desses fatores de crescimento. A integração destes sinais extracelulares está na base da homeostase tecidual (WITSCH; SELA; YARDEN, 2010). Atuando através dos seus receptores de superfície celular, os fatores de crescimento são necessários para comunicações célula-célula, indução de tecido embrionário, proliferação, sobrevivência, apoptose, especialização tecidual e migração (WIEDUWILT; MOASSER, 2008).

O envolvimento desses fatores não se limitam a processos fisiológicos normais. As células cancerígenas adquirem a capacidade de proliferação autônoma desregulada, principalmente, através da produção descontrolada desses fatores de crescimento, ou através de um aumento da expressão anormal, nas membranas celulares, dos seus receptores. Ambos os processos desencadeiam uma série de sinais intracelulares, que em última análise levam à proliferação de células tumorais, indução de angiogênese, e metástase (SKOG *et al.*, 2008; FURNARI *et al.*, 2015; AL-NEDAWI *et al.*, 2016).

O EGFR está expresso em altos níveis em vários tipos de câncer como cabeça e pescoço, colorretal, próstata, rim, pâncreas, ovário e bexiga (MARTINELLI

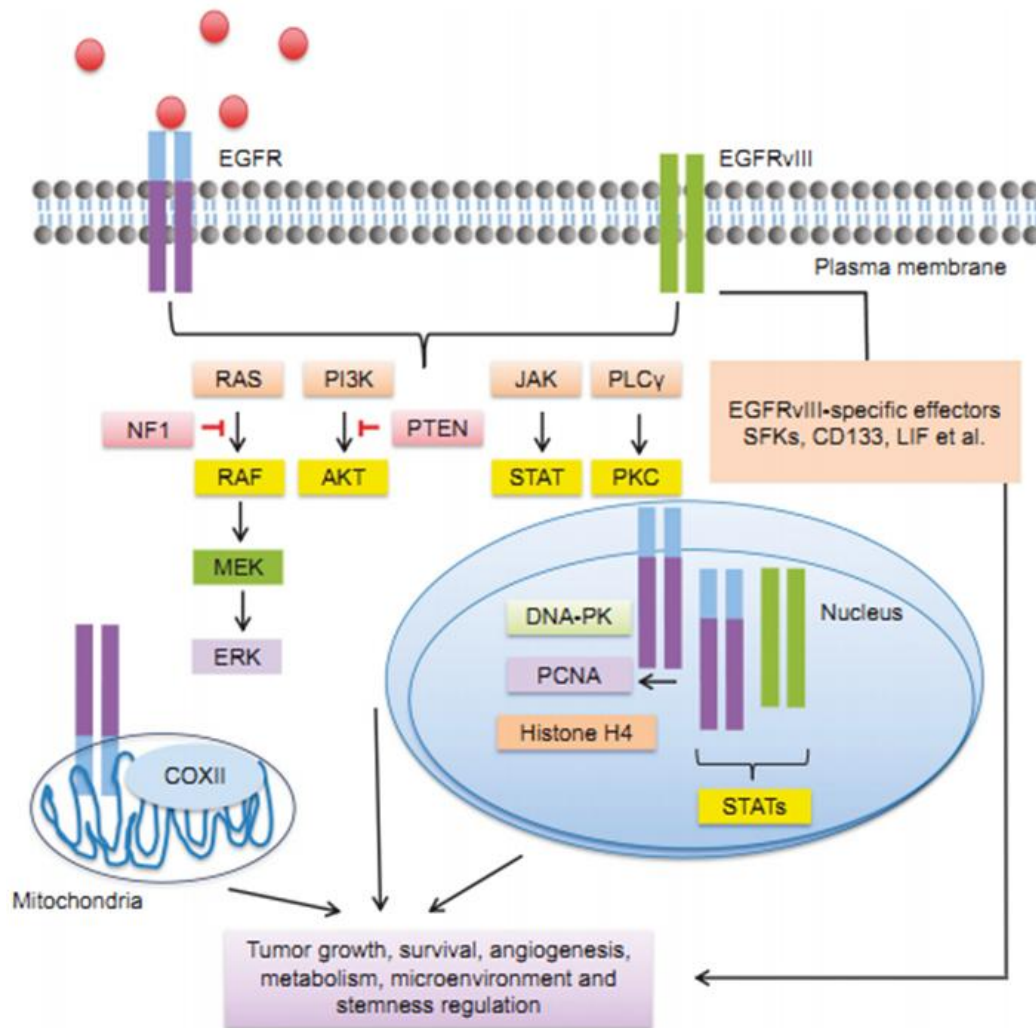
et al., 2009). No câncer de pulmão, mama e no glioblastoma, o EGFR é um fator determinante da tumorigênese. A ativação inapropriada do EGFR é um resultado, principalmente, de amplificação e mutações pontuais no *locus* genômico, mas a regulação positiva da transcrição ou a superprodução de ligantes devido a mecanismos autócrinos/parácrinos também tem sido descrita (SIGISMUND et al., 2018). Diante desse fenômeno, o EGFR foi o primeiro receptor de fator de crescimento a ser proposto como alvo para terapia antitumoral (CIARDIELLO; TORTORA, 2008).

Entre os pacientes diagnosticados com glioblastoma, em torno de, 60% deles apresentam superexpressão e/ou mutação de EGFR (AN et al., 2018). A essas condições são associadas rearranjos que resultam em variantes de EGFR mutadas. A variante constitutivamente ativada EGFRvIII é uma característica importante e tem se tornado frequente nos processos envolvidos com a patogênese do GBM. Uma vez que, está relacionada a fenótipos mais agressivos, como invasividade e resistência terapêutica em GBM.

As células que expressam essa variante são mais tumorigênicas, em camundongos, em comparação àquelas com EGFR do tipo selvagem. Em glioblastoma “cancer stem cells” a alta expressão de EGFRvIII está relacionada com a iniciação e recorrência tumorais (SOEDA et al., 2008; BRENNAN et al., 2013; DEL VECCHIO et al., 2013; EMLET et al., 2014). A ativação das vias de sinalização e moléculas efetoras mediadas por EGFR e/ou EGFRvIII (Figura 5) promovem, juntas, a aptidão da grande maioria dos tumores. E, além disso, também estão frequentemente mutadas no GBM.

Por isso, terapias específicas direcionadas ao EGFR têm atraído muita atenção e estão sendo extensivamente avaliadas pré e clinicamente em GBM. Os inibidores tirosina quinase (TKIs), como o gefitinibe e o erlotinibe, aumentaram a sobrevivência livre de progressão em câncer de pulmão de não pequenas células, mas não se mostraram eficazes no GBM (LIANG et al., 2014). Anticorpos que ligam-se ao domínio extracelular do EGFR, como o cetuximabe, mostrou diminuição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida em modelos de xenoenxerto em camundongos, mas, novamente, não demonstraram um benefício de sobrevida em pacientes ( ELLER et al., 2002).





**Figura 5.** Via de sinalização mediada por EGFR/EGFRvIII. EGFR e EGFRvIII são capazes de transduzir sinais através vias clássicas de RTK incluindo a via RAS/RAF/MEK/ERK, a via PI3K/AKT, JAK/STAT e a PKC (Adaptado de AN et al., 2018)

Em uma abordagem atualizada sobre as terapias direcionadas à GBM, a *Rindopepimut* é uma EGFRvIII vacina peptídica que demonstrou sinais de atividade em modelos pré-clínicos de glioblastoma e testes clínicos em fases iniciais (SAMPSON et al., 2010; ADAMSON; BABU, 2012; SCHUSTER et al., 2015). Depatuzumabe mafodotin (ABT 414), é um conjugado anticorpo-fármaco composto por um anticorpo monoclonal dirigido ao EGFR e seu desenvolvimento clínico está em andamento com estudos randomizados de fase II/III (TOUAT et al., 2017)

Embora os estudos pré-clínicos tenham mostrado alguns resultados interessantes, ensaios clínicos têm consistentemente produzido benefícios limitados de sobrevivência, sugerindo a falta de eficácia dos agentes atualmente disponíveis.

Mais estudos devem ser conduzidos avaliando novos agentes ou combinações garantindo reavaliar o valor da inibição do EGFR em populações selecionadas

#### **1.2.2.1. Tyrphostin (AG 1478)**

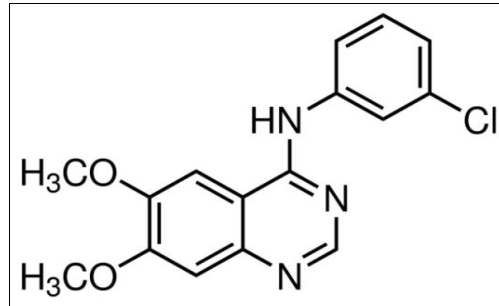
Atualmente, uma série de estratégias, destinadas a impedir a função do receptor do fator de crescimento epidérmico, estão sendo desenvolvidas como potenciais terapias antitumorais. O Tyrphostin AG 1478 (N- (3-Clorofenil) -6,7-dimetoxi-4-quinazolinamina), ou somente, AG 1478 é uma pequena molécula que inibe a porção tirosina quinase de EGFR. Em função da sua ação competitiva pelo sítio de ligação do ATP, no domínio da quinase, é altamente potente e seletiva (ELLIS et al.,2006).

Características químicas importantes para a sua atividade contra o EGFR incluem: a presença de grupos doadores de elétrons nas posições 6 e 7 da quinazolina; a presença de pequenos grupos lipofílicos na posição 3 da anilina e por último a orientação dos nitrogênios no anel quinazolina (Figura 6) (BRIDGES, 1999).

AG1478 é ativo em câncer de cólon, câncer de pulmão de não pequenas células e em glioblastoma. Além disso, tem demonstrado efeitos antiproliferativos significativos e aumenta a sensibilidade a drogas citotóxicas como a cisplatina e doxorubicina (LEI; MAYOTTE; LEVITT, 1999; PARTIK et al., 1999; NAGANE et al., 1998).

A atividade antitumoral de AG 1478 já foi demonstrada por Johns e colaboradores (2003) em um estudo envolvendo diferentes linhagens tumorais juntamente com um modelo *in vivo* de glioblastoma. Huang e colaboradores (2007) inferiram que AG 1478 pode representar uma abordagem terapêutica para superar a quimiorresistência observada em pacientes com GBMs que expressam EGFRvIII.

Dessa forma, essa molécula fornece auxílio para identificar novos alvos terapêuticos em vias de sinalização envolvidas com a patofisiologia do GBM.



**Figura 6.** Estrutura da molécula AG 1478 (ELLIS et al., 2006)

### 1.3. TrkB e EGFR

Como já descrito anteriormente o receptor de quinase relacionado a tropomiosina B (TrkB) medeia os efeitos do BDNF em células neuronais e não neuronais. Além disso, com base em estudos recentes, o TrkB também pode ser transativado pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Este evento de transativação está envolvido com a regulação da migração de neurônios precoces e também, em uma condição patológica, no tumor de pulmão (GÖTZ; SENDTNER, 2014; PUEHRINGER et al, 2013). Além disso, de Farias e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento com cetuximabe em células de câncer de cólon humano em cultura *in vitro* está associado com uma redução na expressão tanto de BDNF quanto de TrkB, juntamente com outras evidências, inferindo que a sinalização BDNF/TrkB pode desempenhar um papel na resistência ao bloqueio EGFR, e que a inibição de TrkB pode potencializar os efeitos antitumorais da terapia anti-EGFR.

A heterodimerização dos receptores ErbB2 e TrkB garante à células de câncer de mama uma vantagem de sobrevivência no cérebro (CHOY et al., 2017). Além disso, em linhagens celulares de câncer de pulmão de não pequenas células o uso de TrkB como proteína alvo, tem sido relatado e reforçado por evidência pré-clínica mostrando crosstalk entre este receptor e o EGFR, sugerindo uma nova abordagem para o tratamento em câncer de pulmão (GOMEZ et al., 2018).

Por outro lado, estudos envolvendo a sinalização de TrkB e a interação desta com o EGFR em glioblastoma humano ainda são poucos e inconclusivos, por isso a necessidade de se investigar em diferentes modalidades experimentais o possível envolvimento, em cooperação, dessas proteínas em glioblastoma. Uma vez

que ela fornece suporte para identificar estratégias para manipulação da proliferação dessas células pela utilização de agentes moduladores de diferentes componentes da sinalização celular e assim, o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do bloqueio seletivo de TrkB e EGFR, isolados ou em combinação.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio seletivo de TrkB utilizando uma pequena molécula inibidora, ANA-12, em uma linhagem celular de glioblastoma (Artigo 1).
- Avaliar os efeitos do bloqueio seletivo de TrkB e EGFR, isolados ou em combinação, na viabilidade celular, ciclo celular e expressão proteica em linhagens celulares de glioblastoma e em um modelo *in vivo* de xenoinxerto de glioblastoma (Artigo 2).

## 3. ABORDAGEM METODOLÓGICA

Para realizar os primeiros dados apresentados (Artigo 1) utilizamos apenas uma linhagem tumoral de GBM (A172) para demonstrar que a inibição seletiva de TrkB poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de pacientes com GBM, considerando sua capacidade robusta na redução na viabilidade celular quantificada pelo método de exclusão com azul de Tripán. Com nossos resultados iniciais fornecemos um comentário crítico sobre alguns aspectos do artigo publicado por Ni e colaboradores (2016).

Para avaliar o envolvimento de TrkB e EGFR, na manutenção da viabilidade de linhagens tumorais de GBM (A172 e U87), foram utilizadas duas pequenas moléculas inibidoras ANA-12 e AG 1478 (Artigo 2). Análises do efeito da inibição isolada ou combinada foram realizadas utilizando diferentes metodologias *in vitro*: avaliação da viabilidade celular, progressão do ciclo celular e avaliação da expressão proteica; e em *in vivo* em um modelo subcutâneo de GBM.

**ARTIGO 1****Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas**

Situação: Publicado

Revista: Neuro-Oncology (Impact Factor: 9.384)

Ano: 2017

Volume: 19

Páginas: 138-141

Referência: NI, Jing et al. Tyrosine receptor kinase B is a drug target in astrocytomas. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 22–30, 2017.

## Artigo 1

138

## Neuro-Oncology

19(1), 138–141, 2017

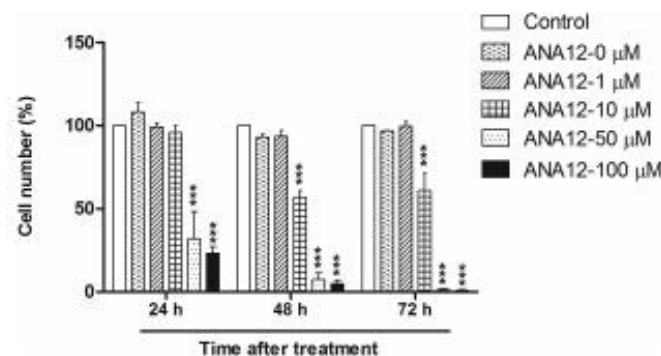
## Letters to the Editor

## Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas

We read with great interest the recent article by Ni et al.<sup>1</sup> on the role of the tyrosine receptor kinase B (TrkB) as a drug target for the treatment of astrocytomas. Among central nervous system tumors, astrocytomas are the most frequent type of glioma, and grade IV astrocytoma (also called glioblastoma) is the most aggressive type of primary brain cancer. As pointed out by the authors, signaling triggered by TrkB, which is activated by its endogenous ligand, the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF), plays a crucial role in normal development and plasticity of the central nervous system,<sup>2</sup> but increasing evidence also indicates a role for BDNF/TrkB upregulation in different types of cancer.<sup>3,4</sup> By systematically screening a library of human tyrosine kinases for their oncogenic potential in astrocytoma formation and then characterizing functional features and molecular mechanisms associated with TrkB-induced oncogenesis, Ni et al. have provided compelling findings indicating that TrkB can play a role in astrocytoma formation.<sup>1</sup>

It is worth pointing out that previous studies not cited by Ni et al.<sup>1</sup> had already identified an increase in TrkB expression in both low-grade astrocytoma and glioblastoma,<sup>5,6</sup> and a role for TrkB signaling in the growth of gliomas and other types of brain tumors or peripheral tumors of possible neural origin has been previously proposed. For example, BDNF-induced activation of TrkB increases the viability of brain-tumor stem cells (BTSCs) isolated from gliomas through activation of the extracellular-regulated kinase (ERK) and Akt pathways, whereas TrkB knockdown or pharmacological inhibition reduces BTSC growth and BDNF-dependent ERK activation.<sup>7</sup> Another recent study has suggested that glioma growth may be regulated by TrkB expressed in exosomes.<sup>8</sup> We have recently provided evidence for a potential role of TrkB inhibition as a strategy to reduce cell proliferation and potentiate the effects of chemotherapy in medulloblastoma<sup>9</sup> and Ewing sarcoma.<sup>10</sup>

In order to investigate the antitumor effects of pharmacological inhibition of TrkB-associated signaling, Ni et al. used the compounds AZD1480, a janus kinase (JAK) inhibitor, and RXDX-101, which nonselectively inhibit different members of the Trk receptor family (TrkA, TrkB, and TrkC), C-ros oncogene 1 (ROS1), and the anaplastic lymphoma kinase (ALK).<sup>1</sup> Thus, they did not assess the effects of selective TrkB blockade, and



**Fig. 1** Selective tyrosine receptor kinase B (TrkB) inhibition reduces the viability of human glioma cells. A172 cells obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Cells were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, were seeded at a density of 5 × 10<sup>3</sup> cells/well in 96-well plates and allowed to grow for 24 hours. The medium was replaced for treatments with increasing concentrations of ANA-12 (1, 10, 50, or 100 μM). Control cells were exposed to vehicle (dimethylsulfoxide, [DMSO], 1.6%) alone, and cells in the ANA-12 0 μM group were not exposed to either vehicle or drug as an additional control showing that the vehicle had no effect by itself. Cell viability was assessed by trypan blue cell counting 24, 48, and 72 hours after treatment. Data normalized to control cells are presented as means ± SEM and represent 2 independent experiments performed in quadruplicate; \*\*\* *P* < .001 compared with control cells exposed to vehicle alone (2-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc tests). All experimental procedures were approved by the institutional research ethics committee (GPPG HCPA number 1406–22).



the effects they observed could be influenced by inhibition of other types of Trk receptors or signaling molecules downstream of Trk. We have recently started a series of experiments aiming to verify whether specific TrkB inhibition reduces glioma cell proliferation using ANA-12, a small-molecule selective TrkB antagonist. Our first results showed that ANA-12 effectively and dose-dependently reduces the viability of a human glioblastoma cell line with almost complete disappearance of cultured cells 72 hours after treatment (Fig. 1). Therefore, selective TrkB inhibition might prove to be an effective experimental therapeutic strategy, possibly with fewer off-target toxicities compared with multitarget drugs in patients with astrocytomas harboring oncogenic TrkB.

### Funding

Supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012–8 and 303276/2013–4 to R.R., and 309430/2012–7 to G.S.); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the South American Office for Anticancer Drug Development; the Children's Cancer Institute (ICI); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

**Kelly V. Pinheiro, Camila Alves,  
Marienela Buendia, Mirela S. Gil,  
Amanda Thomaz, Gilberto Schwartzmann,  
Caroline Brunetto de Farias, and Rafael Roesler**

*Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (K.V.P., C.A., M.B., M.S.G., A.T., G.S., C.B.F., R.R.); Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (K.V.P., C.A., M.B., M.S.G., A.T., R.R.); Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (G.S.), Children's Cancer Institute, Porto Alegre, Brazil (C.B.F.).*

**Corresponding Author:** Rafael Roesler, PhD, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050–170 Porto Alegre, RS, Brazil. (rafaelroesler@hcpa.edu.br; rafael.roesler@pq.cnpq.br).

### References

- Ni J, Xie S, Ramkissoon SH, et al. Tyrosine receptor kinase B is a drug target in astrocytomas. *Neuro Oncol*. 2016; doi: 10.1093/neuonc/now139.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:609–642.
- Thiele CJ, Li Z, McKee AC. On Trk—the TrkD signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):5962–5967.
- 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(10):1473–1475.
- Wadhwa S, Nag TC, Jindal A, et al. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci*. 2003;28(2):181–188.
- Assimakopoulou M, Kondyli M, Gatzounis G, Maraziotis T, Varakis J. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. *BMC Cancer*. 2007;7:202.
- Lawn S, Krishna N, Pisklakova A, et al. Neurotrophin signaling via TrkB and TrkC receptors promotes the growth of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3814–3824.
- Pinet S, Bessette B, Vedrenne N, et al. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. *Oncotarget*. 2016; doi: 10.18632/oncotarget.10387.
- Thomaz A, Jaeger M, Buendia M, et al. BDNF/TrkB signaling as a potential novel target in pediatric brain tumors: anticancer activity of selective TrkB inhibition in medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci*. 2016;59(3):326–333.
- Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860–34880.

© The Author(s) 2016. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com. doi:10.1093/neuonc/now199  
Advance Access date 14 September 2016

**ARTIGO 2****Pharmacologic inhibition of TrkB and EGFR decreases cell viability and delays tumor growth by downregulating the ERK pathway in glioblastoma**

Situação: Em preparação



## Artigo 2

### Pharmacologic inhibition of TrkB and EGFR decreases cell viability and delays tumor growth by downregulating the ERK pathway in glioblastoma

PINHEIRO, Kelly de Vargas<sup>1,2</sup>; THOMAZ, Amanda Cristina Guidot<sup>1,2</sup>; SOUZA, Bárbara Kunzler<sup>1,2</sup>; FREIRE, Natália Hogetop<sup>1,2</sup>; SCHWARTSMANN, Gilberto<sup>1,4</sup>; DE FARIAS, Caroline Brunetto<sup>1,3</sup>; ROESLER, Rafael<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil; <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil; <sup>3</sup>Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS 90620-110, Brazil. <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: Rafael Roesler (Email address: rafaelroesler@hcpa.edu.br)

#### ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most frequent primary malignant brain tumor diagnosed in adulthood. Considering the limitations of the current treatment modalities, more efficient therapeutic approaches for the treatment of GBM should be identified. These tumors frequently expressed deregulated signaling through the tyrosine kinase receptor B (TrkB) and epidermal growth factor receptor (EGFR). In the present study, we aimed to investigate the effects of the TrkB and EGFR inhibitors, ANA-12, and AG1478, respectively, alone or in combination in glioblastoma cell lines. The treatments significantly affected all the tumor cell lines studied although we found that synergism to occur in a cell-specific manner. G<sub>1</sub> arrest in the cell cycle was associated with AG 1478, while few changes were observed in the other treatments. The mechanism of these effects has been investigated and a reduced activity of downstream signaling molecules such as ERK and c-Myc was interrupted with under inhibitors. We examined concomitantly the involvement in the tumorigenesis of inhibitors in xenograft mice glioblastoma model. Both treatment groups had a reduction in tumor size fifteen days after inoculation. Thus, small-molecules inhibitors of TrkB and EGFR, used in combination may be a therapeutic approach for the treatment of glioblastoma patients in the future.

**Keywords:** glioblastoma, TrkB, EGFR, synergism, ERK, c-Myc

## 1. INTRODUCTION

Primary brain tumors are among the most feared malignancies and refer to a heterogeneous group of neoplasias arising from cells within the central nervous system. (LAPOINTE & BUTOWSKI, 2018; TSITSIA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Glioblastoma (GBM) is the most frequent and malignant histological type, accounts for approximately 65% of all primary brain tumors and is highly aggressive, classified according to their histopathological and molecular features resulting in the assignment of grade IV, the highest grade in the World Health Organization (WHO) classification of brain tumors (WIRSCHING *et al.*, 2016). Despite multimodality therapies including surgical resections, radiotherapy, and chemotherapy with the alkylating agent temozolomide (TMZ), a large fraction of patients still undergoes tumor recurrence and have an overall survival of 14–15 months (WEN & KESARI, 2008; STUPP *et al.*, 2009; JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 2015; OSTROM *et al.*, 2017).

Even with advances in the current treatment options, for GBM, the outcomes remain quite poor and are required development of new treatment modalities that can improve prognosis and prolong patients survival (YAO *et al.*, 2018; FROSINA, 2016). Then, a better understanding of tumor biology may yield strategies which could facilitate the search for more effective approaches or to improve the overall therapeutic ratio of conventional treatments (PERRY *et al.*, 2012). Active targeted drug has emerged as a promising strategy for glioblastoma therapy, however highly bioactive and specific drugs remain the biggest challenges. A number of approaches are being investigated like therapies targeting tumor growth factor receptors and downstream pathways (TOUAT *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2015). The discovery of small molecule inhibitors and early clinical analysis of several this compounds has yielded promising results for a variety of cancers (LANGE & LO, 2018). Furthermore, these molecules can act together concomitantly in more than one target resulting in a therapeutic perspective relevant.

The disruption of signal transduction in GBM occurs mainly through over-expression or a gain-of-function mutation of tyrosine-kinase receptors. Neurotrophin tyrosine kinase receptors (TrkA, TrkB and TrkC), also named tropomyosin kinase (Trk) receptors, contribute to neuronal development, function, survival, and proliferation during the development and into adulthood (LANGE & LO 2018,

DRILON et al., 2017; NAKAGAWARA, 2001). TrkB, activated by BDNF (brain-derived neurotrophic factor), is also implicated in the activation of autocrine and paracrine signaling in tumor cells, facilitating angiogenesis and resistance to anticancer drugs (LUCARELLI et al., 1997). Trks are known to promote growth and proliferation of GBM cells. The overexpression of TrkB has been reported in GBM and was described to promote the growth and survival of brain tumor-initiating cells (LAWN et al., 2015). Another study suggests that TrkB-containing exomes can control GBM progression and aggressiveness (PINET *et al.*, 2016). We also have provided evidence for a potential role of TrkB selective inhibition as a strategy to reduce cell viability in GBM cell line *in vitro* (PINHEIRO *et al.*, 2017).

,Epidermal growth factor receptor (EGFR) induces proliferation and/or has a trophic effect on multiple cell types, like TrkB, also play an essential role in the development and maintenance of normal tissues (HATANPAA *et al.*, 2010; WIEDUWILT & MOASSER 2008). On the other hand, many studies and clinical trials have identified the EGFR as specific biomarker on glioblastoma (MAO *et al.*, 2017; ARTEAGA & ENGELMAN, 2014). It contributes to uncontrolled cell proliferation, cell invasiveness, and angiogenesis in cancer suggesting a function in the pathogenesis of this neoplasia (AN et al., 2018; PEARSON & REGAD, 2017; KAPLAN *et al.*, 2016; LO, 2010). Overall, about 60% of GBM patients presents genomic alteration affecting this pathway (AN et al., 2018; BRENNAN *et al.*, 2013). Therefore, Targeting EGFR has been previously proposed as a promising targeted therapy for GBM (VIVANCO *et al.*, 2012). However, monotherapy with EGFR inhibitors has been unsuccessful clinically in glioma patients and faces several issues resulting in redundant alternative signaling pathway activation or rapid adaptation (WESTPHAL *et al.*, 2017).

Crosstalk between EGFR and TrkB have been proven to play an important role in regulating tumorigenesis in different types of cancer. TrkB activation by BDNF results in EGFR phosphorylation and activation in an EGF independent-manner (RADIN & PATEL, 2017). EGF-mediated transactivation of TrkB facilitates migration of lung cancer cells (GÖTZ & SENDTNER, 2014) and enhances proliferation and migration of ovarian cancer cells (QIU *et al.*, 2006). We have previously demonstrated that combined inhibition of EGFR and TrkB can synergistically inhibit colon cancer cell proliferation (DE FARIAS *et al.*, 2012). Additionally, activation of Trk receptors in GBM brain tumor-initiating cells can surpass the effects of

pharmacologic EGFR inhibition (LAWN *et al.*, 2015). However, the effects of dual inhibition of TrkB and EGFR in GBM remain unexplored.

In the present study, we investigated whether combining targeted inhibition of EGFR and TrkB could enhance the antitumor efficacy of both single treatments in GBM cancer. The TrkB antagonist ANA-12 was combined with the EGFR inhibitor AG1478 in GBM cell lines *in vitro* and *in vivo*. Globally, our findings demonstrated that both single treatments promote inhibition of cell viability, changes in cell cycle features, decrease ERK activation and c-Myc protein content and delayed tumor growth *in vivo*. The combined inhibition of TrkB plus EGFR can induce synergistically more pronounced antitumor effects in A172 GBM cells *in vitro* when compared to either drug given alone. Taken together, both *in vitro* and *in vivo* analysis suggest that TrkB and EGFR play an important role in the sustained tumorigenesis of GBM cancer cells.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Cell culture**

Human GBM tumor cell lines A172 and U87 were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco® by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Brazil), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% fungizone® (250 mg/kg; Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brazil). Cells were maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2. Drug treatments**

Selective antagonists of TrkB (ANA-12) and EGFR (Tyrphostin AG 1478) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). ANA-12 was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) in a stock solution of 6140 µM and AG 1478 was diluted in ethanol

(EtOH) in a stock solution of 3167  $\mu\text{M}$ . Other chemical reagents were obtained from qualified national and international suppliers.

### **2.3. Determination of cytotoxicity— Trypan blue**

After confluence, A172 and U87 cells were trypsinized, placed in 96-well plates at an initial density of  $5.0 \times 10^3$  cells per well and after 24h the medium was replaced by increasing concentrations of ANA-12 (0, 1, 10, 20, 30 and 50  $\mu\text{M}$ ), AG- 1478 (0,1,5, 10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ ) and also combinations of both inhibitors for 24, 48 or 72 hours , while the control cells were maintained in DMSO or EtOH when the treatments were used alone or a vehicle solution (DMSO plus EtOH) when the treatments were used in combination. In any of the situations the vehicles used did not exceed the concentration of 1% (v/v). The effect on cell cytotoxicity was evaluated using the trypan blue exclusion method in the Neubauer chamber (FARIAS, DE et al., 2012; THOMAZ et al., 2016). All assays were performed in triplicate and repeated in three independent sets.

### **2.4. Cell cycle analysis**

To assess cell cycle, GBM cells were cultured in 12-well plates under the same conditions as described above and after 24h of exposure to treatments cells were detached, centrifuged and washed with PBS twice. After, the cells were resuspended in 50  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) in 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate solution and incubated on ice and protected from light for 15 min. The cells were analyzed by flow cytometry (Attune® Applied Biosystems) and 20,000 events were collected per sample. Three individual experiments were performed.

### **2.5. Western Blot**

Protein lysates were collected, separated using 8–14% SDS Tris-glycine gels, and transferred onto a polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% fat-free milk or bovine serum albumin when appropriate and incubated with

antibodies against pERK (E-4 sc-7383, Santa Cruz, CA, USA), ERK1 (K-23, sc-94, Santa Cruz, CA, USA), c-MYC (D84C12 – Cell Signaling Technology, MA, USA) and  $\beta$ -actin (A2228, Sigma-Aldrich, MO, USA) used as loading control. Incubation for 1 h with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz) at RT was performed. Chemiluminescence was detected using ECL Western Blotting Substrate (Pierce™ ECL Thermo Fisher Scientific) and analyzed by ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, UK).

## 2.6. Animals and tumor xenografts

Athymic nude mice (*nu-nu*) (25-30g/6 to 8 weeks old) were obtained from the University Hospital Animal Research Facility (UEA, CPE-HCPA). Animals were housed four per cage in plastic cages with sawdust bedding and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . They were allowed *ad libitum* access to standardized pellet food and water. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG-HCPA protocol no. 16-0098) and complied with Brazilian Law (Brazil, Law No. 11.794, 2008; 2013), and conformed to the Laboratory Guide for the Care and Use of Animals (The National Academies Press, Eighth Edition, 2011). For the *ex-vivo* pharmacological inhibition, U87 cells were cultured in 75 cm<sup>2</sup> or 175 cm<sup>2</sup> culture flasks and treated with 13.85  $\mu\text{M}$  of ANA-12, 13.26  $\mu\text{M}$  of AG 1478 (alone or in combination) or vehicle (DMSO plus ethanol) for 24 hr and then  $1 \times 10^6$  cells were injected subcutaneously into the right flank (6-8 mice per group). Measurements started at the first sign of the appearance of tumors, five days after tumor injection, when tumors reached approximately 40-75 mm<sup>3</sup>. The dimensions, length (L) and width (W), of the resulting tumors were determined every two days using a manual caliper, and the tumor volume (mm<sup>3</sup>) was calculated using the formula: tumor volume =  $[\text{length}^2 \times \text{width}/2]$ . Furthermore, when tumors reached the endpoint (800-1000 mm<sup>3</sup>) mice were euthanized and the tumor xenografts were measured and weighted.

## 2.7. Statistical analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Values were analyzed using the GraphPad Prism software package, v. 5.0 (GraphPad, San Diego, CA). The level of significance between different experimental groups was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by appropriate post-hoc tests. Significant differences were p values below 0.05. A drug combination analysis was performed based on the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the treatments. For calculation of IC<sub>50</sub> data were fitted in a dose response curve (Graphpad Prism v. 5.0) using the equation  $Y=100/(1+10^{((X-\text{LogIC}_{50}))})$ . The interaction between ANA-12 and AG-1478 was assessed by the combination index method (CI) (CHOU; TALALAY, 1984). Synergism, addition and antagonism between drug combinations was defined as CI <0.9, CI = 0.9-1.1 and CI > 1.1, respectively.

## 3. RESULTS

### 3.1. Selective blocking of TrkB and EGFR decreased the viability of GBM cell lines

To determine the effect of TrkB and EGFR selective inhibition on cell viability, different GBM cell lines were treated with ANA-12 and AG 1478 alone or in combination and assessed by trypan blue exclusion method. Time course analysis showed that both single treatments decreased A172 and U87 cell viability when compared with control cells ( $P < 0.001$ ). The effect was observed in A172 cells after 48 hours of treatment with ANA-12 at 10  $\mu\text{M}$  or AG1478 at 30  $\mu\text{M}$  (Fig. 1A and 1B). U87 cells displayed similar effect after 24 hours of treatment with the dose of 10  $\mu\text{M}$  of ANA-12 or AG1478 (Fig. 1F and 1G). We also analyzed whether the reduction of cell viability with ANA-12 or AG1478 were dose-dependent. As depicted in figure 1 (C, D, H and I) both treatments showed features of dose-dependent effect in A172 and U87 cells. After time course and dose-response curves analysis, we defined proper doses and time to evaluate the effect of the combination (ANA-12 plus AG1478) in cell viability. When the two drugs were combined the inhibitory effect was more pronounced in A172 cells compared to either IC<sub>50</sub>-equivalent isolated drugs and in the combination of both drugs in higher doses (see figure 1E for detailed

results and P values for specific comparisons). In contrast, the combined treatments did not increase the effect of both single treatments in U87 cells, only when compared to the combination of high doses of the inhibitors (Fig.1J).

### **3.2. Combined inhibition of TrkB and EGFR promotes pharmacologic synergism in A172 cells**

Next, for evaluating the drug interaction in GBM cell lines the IC<sub>50</sub>-values were calculated from the effects in the cytotoxicity and are shown in the table. ANA-12 yield an IC<sub>50</sub> values of 10.0 (7-14)  $\mu$ M and 13.85 (11-17)  $\mu$ M for A172 and U87 cells, respectively. IC<sub>50</sub> values of AG1478 were 20.0 (16-21)  $\mu$ M for A172 cells and 13.26 (11-16)  $\mu$ M for U87 cells (Fig. 2A). Pharmacologic interactions of a combined treatment of ANA-12 and AG1478 were investigated in the cytotoxicity of GBM cell lines and evaluated by Chou-Talalay method. Synergism, addition and antagonism between drug combinations was defined as CI <0.9, CI = 0.9-1.1 and CI > 1.1, respectively. We observed synergy of the combined treatments only in the A172 cells (CI= 0.75). However, in the U87 cells the inhibitors presented antagonism, since the combination index value was 2.2 (Fig. 2B).

### **3.3. TrkB and EGFR inhibitors induce changes in cell cycle features of GBM cell lines**

The effects on the cell cycle were evaluated by flow cytometry after treatment with ANA-12, AG 1478 alone or in combination in GBM cell lines. As shown in Figure 3A the selective TrkB inhibitor induced a significant reduction in S phase, which starts at the dose of 10  $\mu$ M and persists at a dose of 20  $\mu$ M in A172 cells (P< 0.001 and P< 0.0001, respectively). The reduction of S phase due to TrkB inhibition was also observed in U87 cells, but only at the dose of 50  $\mu$ M when compared to the control group (P< 0.05, figure 3D). On the other hand, the treatment with 30  $\mu$ M of AG 1478 significantly increased the number of A172 and U87 cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase when compared with the control cells (Fig. 3B and 3E - P< 0.01 and P< 0.05, respectively ). The combined treatment lead to an accumulation of cells in cell cycle distribution after combined treatment lead to accumulation of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase while reducing them in S (Fig. 3C - P< 0.05 and P<0.01). .The combined treatment did not



cause great changes in the cell cycle of U87 cells, just a small percentage of cells in Sub-G1 phase when compared with the control cells (Fig. 3F –  $P < 0.05$ ).

### **3.4. Downregulation of ERK pathway after blocking TrkB and EGFR receptors**

Additional analysis by western blot were performed to investigate the effects of TrkB and EGFR inhibition in ERK signaling. A172 and U87 cells were treated with concentrations correspondent to IC50 values of ANA-12, AG 1478 or a combination of both for 48 hours in U87 cells and 24 hours for A172 cells. When the A172 cells were treated with ANA-12 plus AG 1478 was observed an increase in protein levels of ERK, while phosphorylated extracellular-regulated kinase (pERK) appears to be slightly reduced in the same group. Similarly, the protein levels of c-Myc in treatment to ANA-12 in combination with AG 1478 were increased when compared with control or with each drug alone (Fig. 4A). We also determined the levels of the same proteins for U87 cells after blocking TrkB and/or EGFR. The expression of ERK signaling pathway, including total expression and phosphorylation were decreased after treatment with ANA-12 and AG 1478, alone or in combination when compared to the control. However, only treatments with AG 1478 or the combination was able to inhibit the expression of c-Myc when compared to the control (Fig. 4B). These findings, even preliminary ones, may indicate that the effects of the combination of drugs, observed on cytotoxicity, synergism for A172 and antagonism for U87 may explain the different effects on the protein levels of these cell lines.

### **3.5. Long-term effects of TrkB and EGFR inhibition in GBM xenograft mouse model**

To explore the roles of ANA-12 and AG 1478 alone or in combination, during tumorigenesis, we used a preclinical xenotopic model for GBM. U87 cell line was treated with ANA-12, AG 1478, ANA-12 plus AG 1478 or control, after 24 hours the animals were randomized and treated U87 cells were injected subcutaneously. Xenografts tumors were measured every two days. Figure 5B demonstrates tumor volume size vs. days, plotted as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), the effect of the overall treatments is similar between groups when compared to the control. The tumor size is significantly different in day 15 in all treatments when

compared with the control, while in day 30, in the group with cells treated with AG 1478 there was no reduction in tumor size as the other groups. On any of the days there was no difference between groups that received cells treated with single drugs when compared to group that received cells with combination therapy (Fig. 5C). When tumors reached 800-100 mm<sup>3</sup> the mice were euthanized, and the tumors were excised, and weight and volume were determined. Figure 5D shows that there is a tendency for tumor volume *ex vivo* be significantly different in the groups when compared to the control. Therefore, there were no statistically significant differences when the treatment groups were compared with one another for two parameters (weight and volume *ex vivo*).

#### 4. DISCUSSION

GBM is the most frequent primary malignant brain tumor diagnosed in adults (KHASARAW *et al.*, 2012; OHGAKI & KEIHUES 2007; SHIRAHATA, 2009). Despite the greater understanding of the mechanisms involved with the molecular regulation of GBM and consequently the processes that involve tumor genesis, development and progression, most efforts have not achieved long-term remissions in clinical trials, even though some of them are promising in animal models, making treatment options still limited ( HE *et al.*, 2016)

Our data demonstrated that ANA-12, a tropomyosin kinase receptor B (TrkB) selective ligand that prevents activation of the receptor by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with a high potency (CAZORLA *et al.*, 2015), decreased dose-dependently the viability in both human GBM cell lines. Even preliminaries, these results support the increasing interest in the TrkB and its recognized role in cancer signaling (THIELE & MCKEE, 2009; ROESLER *et al.*, 2011).

BDNF-TrkB signal transduction has been demonstrated is associated with cell proliferation, differentiation, survival, invasion facilitating angiogenesis and resistance to anticancer drugs in various types of malignancies like breast, small cell lung cancer, oral squamous cell carcinoma and cervical cancer (MORIWAKI *et al.*, 2018; KIMURA *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2018; CHOY *et al.*, 2017; LUCARELLI *et al.*, 1997).

This role of TrkB also was identified in CNS (central nervous system) neoplasias as neuroblastoma, medulloblastoma and GBM (JIANG *et al.*, 2018; HUA

*et al.*, 2018; THOMAZ *et al.*, 2016). Xiong and colleagues (2015) investigated the expression of expression of BDNF and TrkB in human glioma tissues and a correlation between at various grades of malignancy was demonstrated. Mature BDNF expression was significantly increased in high-grade gliomas (also named GBM) and was positively correlated with the malignancy of the tumor and TrkB receptor expression (XIONG *et al.*, 2015).

Similarly, Pinet and colleagues (2016) demonstrated that TrkB expression was detected in exosomes isolated from plasma of GBM patients. Therefore, based on these data that shows a correlation of BDNF/TrkB with prognosis and tumor aggressiveness, in multiple tumors, this pathway is emerging as an important target for cancer therapeutics (LANGE & LO, 2018).

The GBM (A172 and U87) cells also exhibited a reduction in the viability after treatment with AG 1478, a selective inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein that shares the same structural quinazoline main chain that the clinically used drugs gefitinib and erlotinib, whereas have different properties (ELLIS *et al.*, 2006). The role of EGFR in oncogenesis has been extensively demonstrated and as opposed to TrkB was the first growth factor receptor to be proposed as a target for cancer therapy. Since those are marked by functional activation of growth factors and receptors of the EGFR family (CIARDELLO & TORTORA, 2008).

Considering all types of tumors, the implication of EGFR signaling network in the development, physiology, progression and maintenance tumoral is a particularly striking feature of GBM (BRENNAN *et al.*, 2013). This is the result of significant dysregulation of EGFR in GBM characterized by its cell-surface overexpression often associated gene amplification and/or mutation (HATANPAA *et al.*, 2010). So, the current study corroborates with others studies that regarding specific inhibitors against EGFR and, consequently, its signaling pathway as an important target for pharmacological intervention in GBM (TAYLOR *et al.*, 2012; CARRASCO-GARCÍA *et al.*, 2011; MARTINELLI *et al.*, 2009; JIMENO & HIDALGO, 2006).

Taken together, these data led us to investigate the effect after dual blockade of TrkB and EGFR in the GMB cell lines. In the other words, if a drug combination would be more effective in reducing cell viability when compared to treatments alone. Once, the clinical experience has been that many GBM patients do not respond to these target therapies and those that do eventually show progression (COHEN *et al.*, 2009). Besides, in translational terms, malignant gliomas are able to

escape the need for receptor function by activating alternative compensatory pathways when challenged with receptor-targeted therapeutics (MELLINGHOFF *et al.*, 2005).

There was a significant increase in cytotoxicity after the combined treatment of ANA-12 plus AG 1478 all the tumor cell lines tested, however it is notable that a synergistic effect was observed only in A172 cells. Then, this phenomena is cell-line specific and we hypothesized that the implication of these results is that combination therapy would be effective in a select group of patients with GBM.

Molecular-targeted agents used in combination therapy for cancer is constantly under investigation and our result representing a possible problem for the clinical use of target drugs developed for coadministration (GOMEZ *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2017; CHOY *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2016; LAWN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2006). It is imperative to develop novel strategies and to identify a more effective therapeutic approaches take into consideration the biological heterogeneity in GBM. An immunohistochemical study published by Torp and colleagues (2007) had already demonstrated differences in the EGFR protein levels of expression in GBM tissue. According to the results to assess the effectiveness of a therapeutic agent can be necessary for detecting the different systems in tumor tissue.

To understand the mechanism by ANA-12 or/ and AG 1478 decreased cell viability, tests were performed to evaluate the cell cycle in A172 and U87 cells. Interestingly, however, current results have shown that in A172 cells there was the reduction of cells in the S phase of the cell cycle while increasing cells in the same phase in U87 cells after treatment with ANA-12.

These results showing it is possible that this drug modulates cell lines by different points whereas in A172 cells decreased the percentage of these cells in the S phase of the cell cycle, while it seems increasing the cells in G0/G1 (non-significant data). In U87 cells, probably that like the DNA damage accumulates to a level at which DNA replication is slowed and S-phase arrest is induced to allow for repair at this point, by the intra-S phase checkpoint, however additional studies investigating this effects will be needed for a more understanding of the underlying mechanisms (HEBAR *et al.*, 2012; BARTEK *et al.*, 2004).

AG 1478 was able to inhibit the progression of the cell cycle in both cell lines, increasing the percentage of these cells in the G0–G1 phase, causing a G1

arrest in the cell cycle, after exposure to the highest inhibitor dose. This result corroborates data obtained by Carrasco-García and colleagues (2011). In a study involving GBM cell lines undergo a G1 arrest in response to AG1478 was mediated by p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI), which often mutate into cancer cells, leading to uncontrolled proliferation (KIM & ZHAO, 2005).

The effects in the cell cycle induced by combination therapy in A172 cells increased of cells in the G0/G1 phase, while decreasing cells in the S phase, to inhibit the progression of the cell cycle. A small population in sub-G1 phase was evidenced after treatment, only higher doses combination, of ANA-12 with AG 1478, this accumulation of cells can indicate involvement with apoptosis (CHOU *et al.*, 2015). In fact, this data taken together remain controversial, so is currently under investigation, and some points need to be reviewed for explaining low ineffectiveness or differences on cell cycle analysis.

The involvement of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway will also be investigated. This pathway signaling is often up-regulated in human tumors and as such represents an attractive target for the development of anticancer drugs (BUROTTO *et al.*, 2014; MONTAGUT & SETTLEMAN, 2009; MCCUBREY *et al.*, 2007).

We demonstrated by western blot analyses that alone treatments with ANA-12 or AG 1478 were able to reduce phosphorylation of downstream ERK signaling in both cell lines of GBM. Whereas that this effect was more efficient after combination exposure only in A172 cells. There are studies in other diseases suggesting crosstalk between the TrkB and EGFR receptors (QIU *et al.*, 2006). It is possible that in A172 cells TrkB or EGFR is a resistance/escape mechanism each other through downstream effects, such that the combination of these two agents is superior to a TrkB or EGFR inhibitor alone. Or, TrkB and EGFR could be expressed preferentially in the same cells and in specific cell lines, thus leading to selective synergy in these cells.

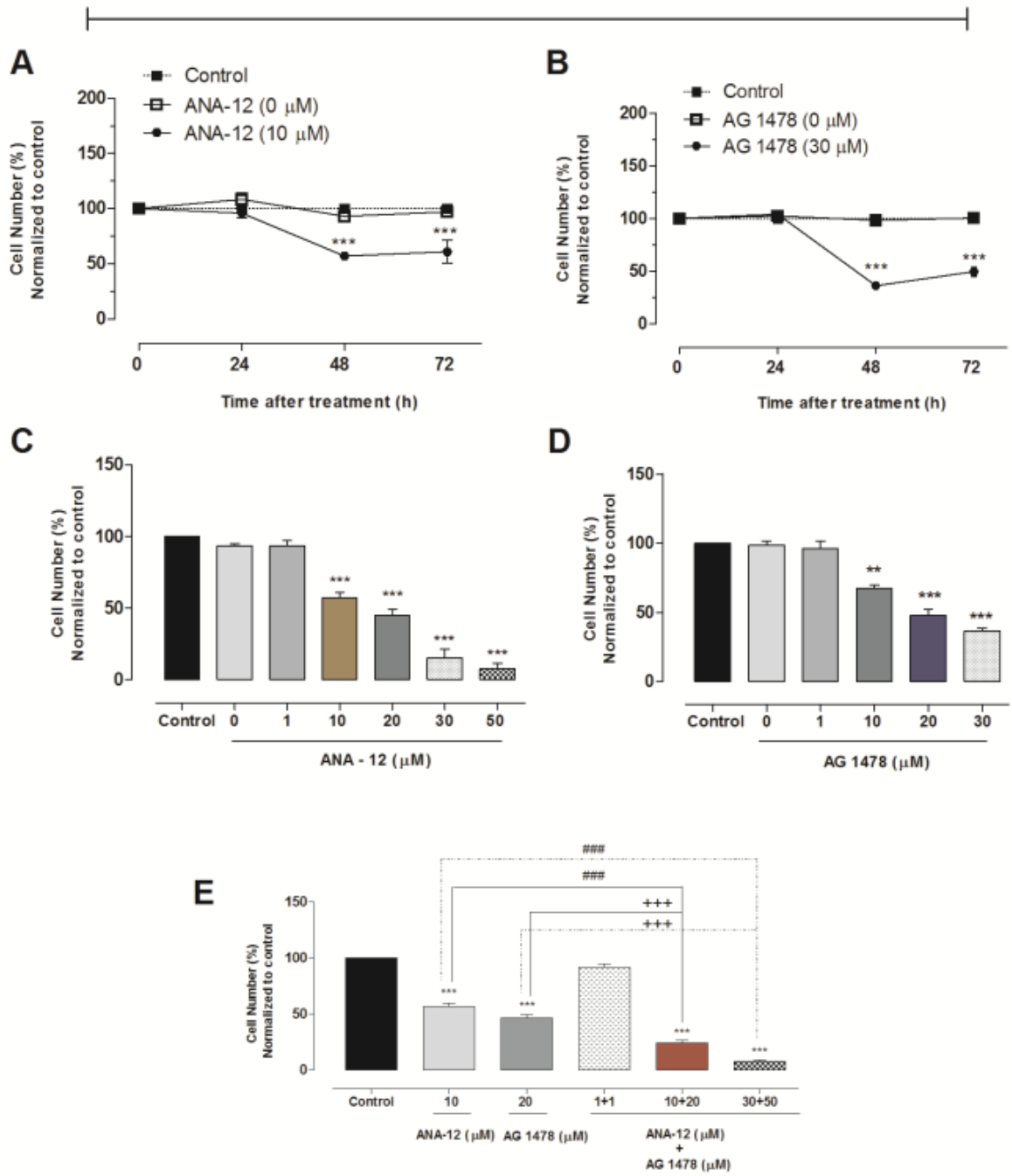
In addition, we observed a reduction in the levels of c-Myc protein. Similarly to occur with ERK signaling, this decrease was occurred gradually after treatments in A172 cells, reaching its maximum in the cells under treatment with ANA-12 plus AG 1478. While in the U87 cells only blocking of EGFR it seems have caused a reduction in the c-Myc levels. The c-Myc oncoprotein has been extensively studied for its instrumental role in proliferation and growth of normal and neoplastic cells. c-

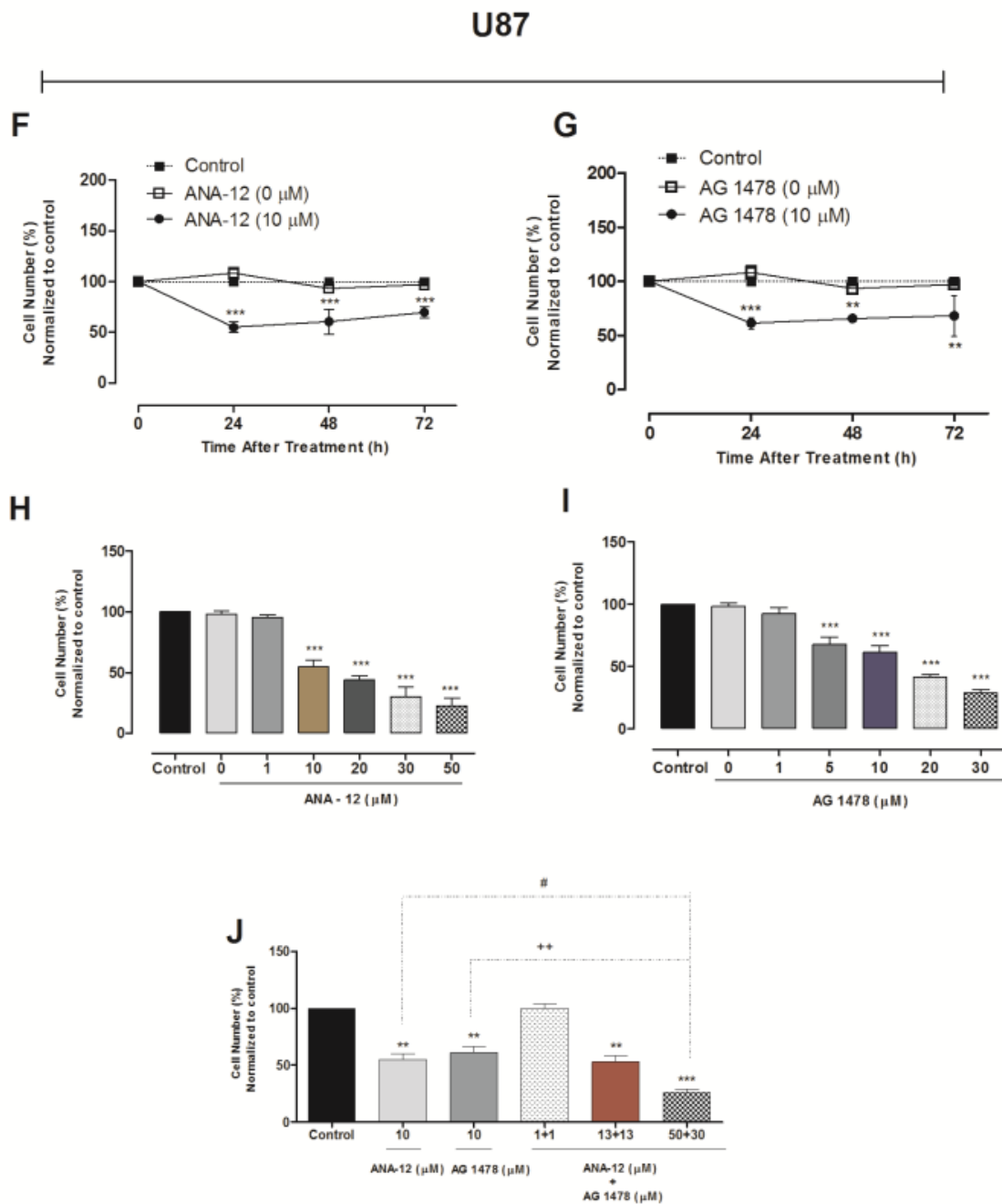
Myc is required for maintenance and contribute to glioma cancer cell biology (WANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2008). C-myc proto-oncogene expression has been found to correlate with the grade of malignancy in the same pathology (ANNIBALI *et al.*, 2014; HERMS *et al.*, 1999). Our data may imply that of c-Myc inhibition followed TrkB and EGFR may explain a decrease in cell viability and suggests that this pathway may be a suitable target for therapeutic intervention in brain tumors like GBM.

We next examined the tumorigenic effect of selective inhibitors in U87 GBM cells *in vivo* model. The first step was to treat the cells for 24 hours and after to randomize the animals for inoculation with cells exposed to vehicle, ANA-12, AG 1478 or a combination the both. Treatments appear to affect tumor growth during every the evaluation period, but interestingly only fifteen days after the inoculation there was a significant reduction in tumor volume when groups were compared to vehicle. These results may suggest that a short treatment was unable to be maintained over time interruption in the signaling pathways and therefore, resulting in recovering of cell proliferation and consequent increase in tumor volume. On other hand exciting results also use preclinical GBM models involving a combination of inhibitors has been reported, however this studies follow a protocol with repeated administrations these drugs and used an intraperitoneal route for this. We can presume that was had may be determinant for unsuccessful of therapy under investigation in our study (Wu *et al.*, 2016; NITTA *et al.*, 2016; EL MESKINI *et al.*, 2015; GOLUBOVSKAYA *et al.*, 2012). In the same time, our objectives with this model were to understand of mechanisms involved in the tumorigenesis and maintenance of GBM, for this the animals a long-term evaluation was performed.

In conclusion, our results demonstrate that the decrease in viability of GBM cells may be is associated with ERK and c-Myc signaling pathways. So, a combining use of molecules targeting against TrkB and EGFR may significantly improve the therapeutic outcome in GBM.

## A172





**Figure 1. Effect of TrkB and EGFR inhibition alone or in combination on cell viability of glioblastoma.** Time course and dose–response curves after treatment with ANA-12 (1-50  $\mu$ M) or AG 1478 (1-30  $\mu$ M) in A172 and U87 cells. Four wells were assigned to each experimental treatment. Experiments were repeated three times, data are presented as means  $\pm$  SEM. \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 compared with the control group, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test (A-B-F-G). \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 compared with the control group, one-way ANOVA followed by Dunnett's test (C-D-H-I). Dose-response curves after treatment with ANA-12 plus AG 1478 in



A172 and U87 cells. Four wells were assigned to each experimental treatment. Experiments were repeated three times, data are presented as means  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$  compared with the control group, ### $P < 0.001$  and # $P < 0.05$  compared with the ANA-12 group, +++ $P < 0.001$  and ++ $P < 0.01$  compared with the AG 1478 group, one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test (E-J).

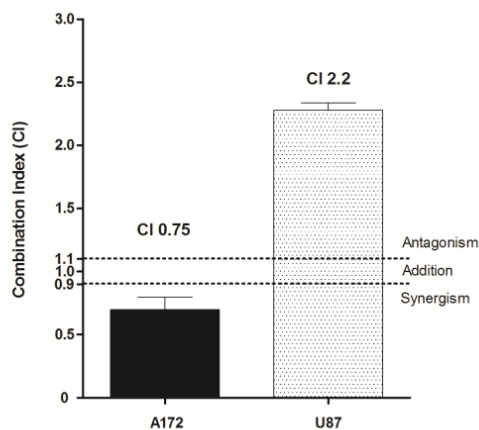
## A

**Table 1.** IC values of ANA-12 and AG 1478, alone or in combination for glioblastoma cell lines.

Inhibitors	IC 50 ( $\mu\text{M}$ )	
	A172	U87
ANA-12	10.0 (7 – 14)	13.85 (11 – 17)
AG 1478	20.0 (16 – 21)	13.26 (11 – 16)
ANA-12 + AG 1478	4.27 (2 – 6) + 6.70 (5 – 8)	15.33 (11 – 19) + 12.47 (9 – 16)

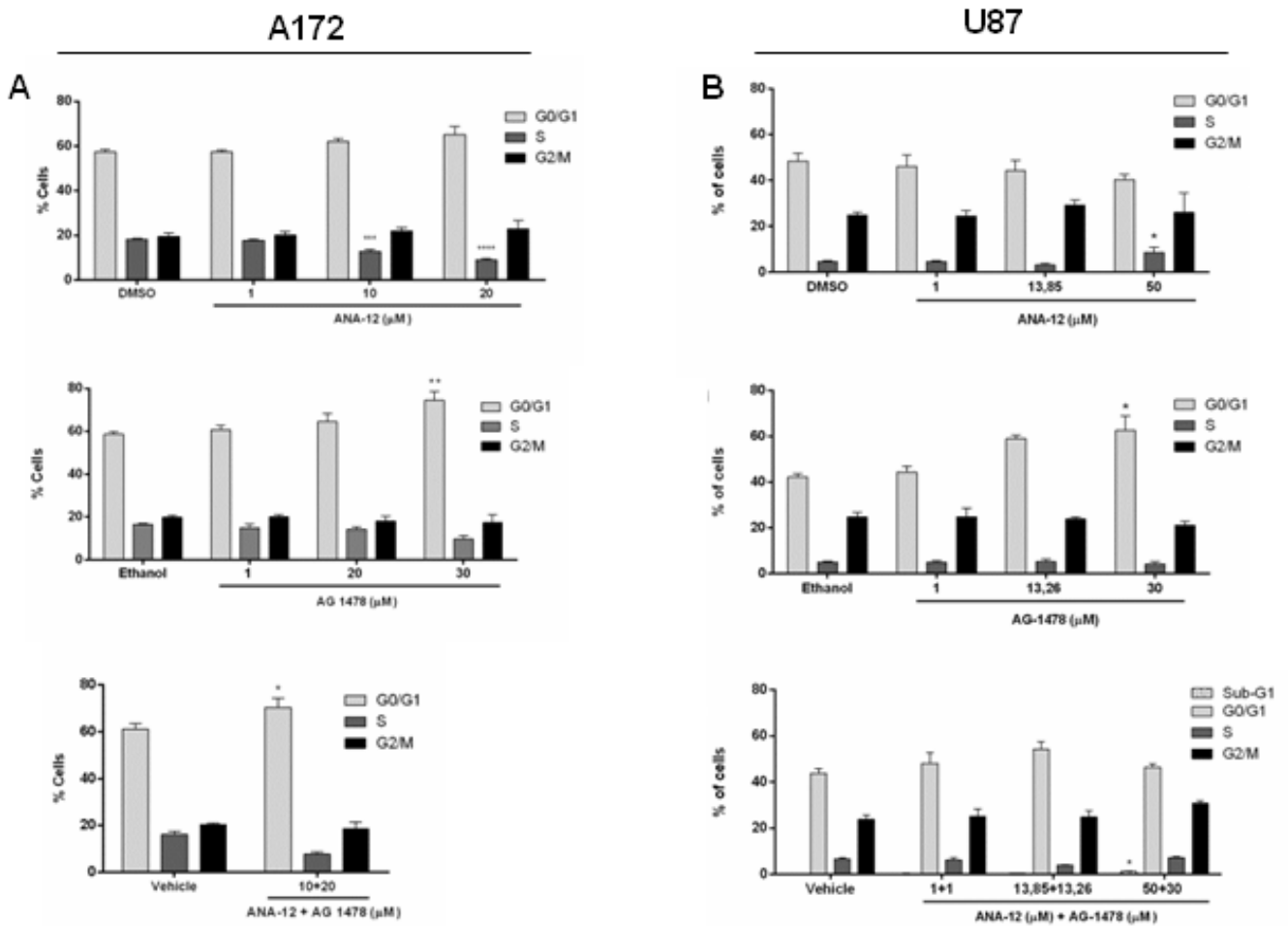
Data are expressed with their respective 95% confidence intervals.

## B

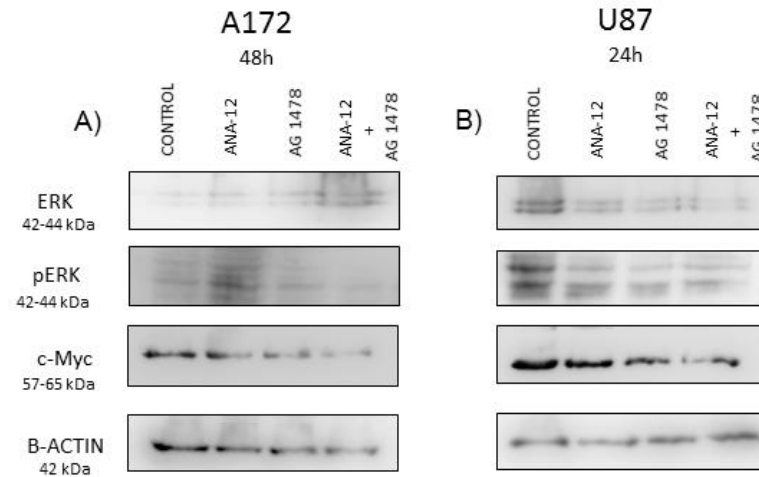


**Figure 2.** Synergistic effect of TrkB and EGFR inhibition in A172 GBM cells.

Both cell lines were treated with varying concentrations of ANA-12 or/and AG 1478, their growth was inhibited in a dose-dependent manner, although with different efficacy. The IC<sub>50</sub>-values were calculated from the dose-response curves after different times of treatment (48 hours for A172 and 24 hours for U87 cells) and expressed with their respective 95% confidence intervals and summarized in table (A). The CI (combination index) was determined by the method of Chou-Talalay for A172 and U87, respectively. Data are presented as means  $\pm$  SEM (B).

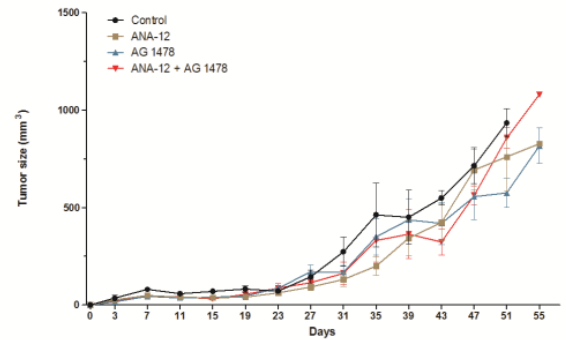
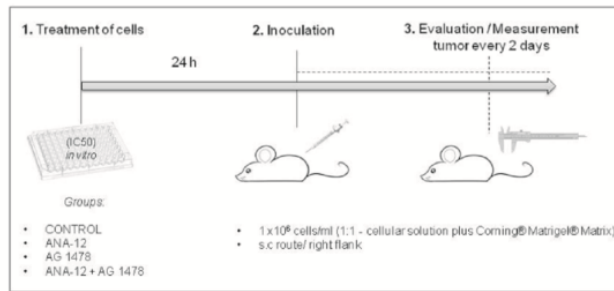


**Figure 3. Effect of TrkB and EGRF inhibition alone or in combination on the cell cycle of GBM cell lines.** Cells were exposed to ANA-12, AG 1478 or ANA-12 plus AG 1478 for 24h, and subsequently the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M of the cell cycle was evaluated. Two wells were assigned to each treatment and the experiments were repeated at least three times. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of the % cells in each phase. \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001 and \*\*\*\*P < 0.0001 compared to the DMSO, ethanol or vehicle group, one-way ANOVA followed by the Dunnett test (A and B).

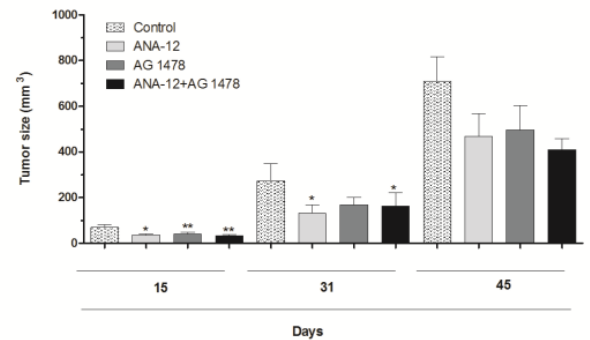
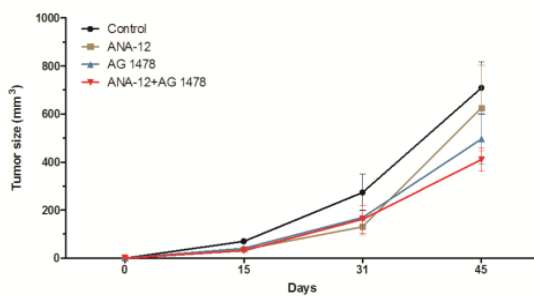


**Figure 4. Blocking of TrkB and EGFR induces downregulation of the ERK signaling pathway.** Western blot analysis of ERK1, pERK and c-Myc in protein lysates prepared from A172 (A) or U87 cells (B). Cells were treated with ANA-12, AG 1478 or ANA-12 plus AG 1478 for the indicated time. The immunoblots are representative of one independent experiment with  $\beta$ -actin serving as a protein loading control.

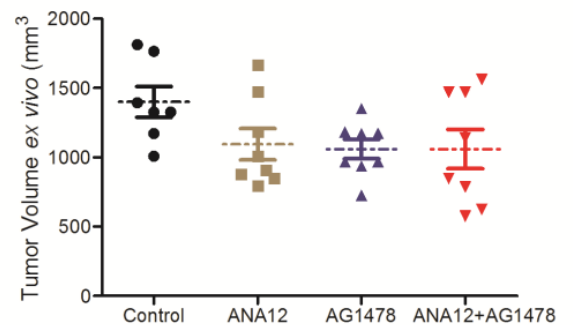
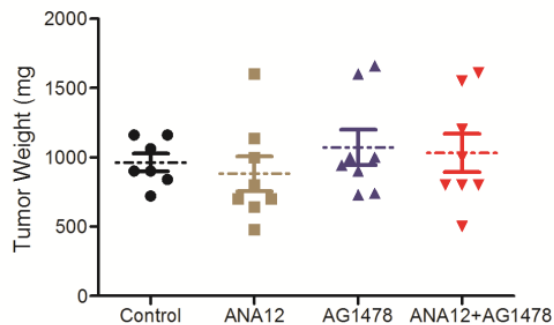
A



B



C



**Figure 5. Pharmacological inhibition of TrkB or EGFR receptors in an *in vivo* GBM model.** U87 cells were previously treated *in vitro* for 24 hours with ANA-12 (13,85  $\mu$ M), AG-1478 (13,26  $\mu$ M) or ANA-12 plus AG-1478, and then injected into the flanks of Nude mice randomly segregated into 4 cohorts (6-7 mice per group) as shown in the schematic drawing. Tumor volume measurements were performed from the day 3. Tumors were excised when reached approximately 800-1000 mm<sup>3</sup> (A). Tumor growth curve is shown on time points of 15, 31 and 45 days (B). *Ex vivo* tumor weight (left panel) and volume (right panel) measured after excision (C). Data

are expressed as mean  $\pm$  SEM (\*P<0.05; \*\*P<0.01). Statistical analysis was performed using one way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

**Acknowledgments:** This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 303276/2013-4 and 409287/2016-4 to RR); the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); the Children's Cancer Institute (ICI); and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

## 5. REFERENCES

- AN, Zhenyi et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. **Oncogene**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1561–1575, 2018.
- ANNIBALI, Daniela et al. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2014.
- ARTEAGA, Carlos L.; ENGELMAN, Jeffrey A. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 282–303, 2014.
- ARTICO, Marco et al. Immunohistochemical profile of neurotrophins in human cranial dura mater and meningiomas. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1373–1380, 2009.
- BARRETT, A. M. Some reflections on those who taught me -- a personal view. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 4 SUPPL, p. 338–341, 1976.
- BARTEK, Jiri; LUKAS, Claudia; LUKAS, Jiri. Checking on DNA damage in S phase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 792–804, 2004.
- RADIN, D.P. & PATEL, P. BDNF: An Oncogene or Tumor Suppressor? **Anticancer Research**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 3983-3990, 2017.
- BRENNAN, Cameron W. et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013.
- BRODEUR, Garrett M. et al. Therapeutic targets for neuroblastomas. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 277–292, 2014.

BUROTTO, Mauricio et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective: Tissue-Specific MAPK Signaling. **Cancer**, [s. l.], v. 120, n. 22, p. 3446–3456, 2014.

CARRASCO-GARCÍA, Estefanía et al. Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 317, n. 10, p. 1476–1489, 2011.

CAZORLA, Maxime et al. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 121, n. 5, p. 1846–1857, 2011.

CHANG, Chia-Hsin et al. Synergistic inhibition of tumor growth by combination treatment with drugs against different subpopulations of glioblastoma cells. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2017.

CHOU, Yu-Cheng et al. PEITC induces apoptosis of Human Brain Glioblastoma GBM8401 Cells through the extrinsic- and intrinsic -signaling pathways. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 81, p. 32–40, 2015.

CHOY, Cecilia et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2017.

CIARDIELLO, Fortunato; TORTORA, Giampaolo. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 11, p. 1160–1174, 2008.

COHEN, M. H. et al. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. **The Oncologist**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1131–1138, 2009.

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

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

EL MESKINI, R. et al. A preclinical orthotopic model for glioblastoma recapitulates key features of human tumors and demonstrates sensitivity to a combination of MEK and PI3K pathway inhibitors. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 45–56, 2015.

ELLIS, A. G. et al. Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 1422–1434, 2006.

FROSINA, Guido. Nanoparticle-mediated drug delivery to high-grade gliomas. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1083–1093, 2016.

GOLUBOVSKAYA, V. M. et al. Pharmacologic Blockade of FAK Autophosphorylation Decreases Human Glioblastoma Tumor Growth and Synergizes with Temozolomide. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 162–172, 2013.

GOMEZ, Daniel Richard et al. Integrative proteomic and transcriptomic analysis provides evidence for TrkB (NTRK2) as a therapeutic target in combination with tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 18, 2018.

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

HATANPAA, Kimmo J. et al. Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance. **Neoplasia**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 675–684, 2010.

HE, Hua et al. MEK2 is a prognostic marker and potential chemo-sensitizing target for glioma patients undergoing temozolomide treatment. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 658–668, 2016.

HEBAR, Alexandra; RÜTGEN, Barbara C.; SELZER, Edgar. NVX-412, a New Oncology Drug Candidate, Induces S-Phase Arrest and DNA Damage in Cancer Cells in a p53-Independent Manner. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e45015, 2012.

HENDRICKSON, W. A.; WARD, K. B. Atomic models for the polypeptide backbones of myohemerythrin and hemerythrin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1349–1356, 1975.

HERMS, J. W. et al. c-myc oncogene family expression in glioblastoma and survival. **Surgical Neurology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 536–542, 1999.

HUA, Zhongyan et al. P53/PUMA are potential targets that mediate the protection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/TrkB from etoposide-induced cell death in neuroblastoma (NB). **Apoptosis**, [s. l.], v. 23, n. 7–8, p. 408–419, 2018.

JHANWAR-UNIYAL, Meena et al. Glioblastoma: Molecular Pathways, Stem Cells and Therapeutic Targets. **Cancers**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 538–555, 2015.

JIANG, Lai et al. MNX1 reduces sensitivity to anoikis by activating TrkB in human glioma cells. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], 2018.

JIMENO, Antonio; HIDALGO, Manuel. Pharmacogenomics of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1766, n. 2, p. 217–229, 2006.

KAPLAN, Mohammed et al. EGFR Dynamics Change during Activation in Native Membranes as Revealed by NMR. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 5, p. 1241–1251.e11, 2016.

KHASRAW, Mustafa; SIMEONOVIC, Marcelle; GROMMES, Christian. Bevacizumab for the treatment of high-grade glioma. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1101–1111, 2012.

- KIM, Young Tae; ZHAO, Min. Aberrant Cell Cycle Regulation in Cervical Carcinoma. **Yonsei Medical Journal**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 597, 2005.
- KIMURA, Shinichi et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. **Lung Cancer**, [s. l.], v. 120, p. 98–107, 2018.
- LAISHLEY, E. J. Regulation and properties of an invertase from *Clostridium pasteurianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 1711–1718, 1975.
- LANGE, Allison; LO, Hui-Wen. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 105, 2018.
- LAPOINTE, Sarah; PERRY, Arie; BUTOWSKI, Nicholas A. Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10145, p. 432–446, 2018.
- LAWN, Samuel et al. Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-initiating Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 6, p. 3814–3824, 2015.
- LI, Feifei; ZHAO, Changqi; WANG, Lili. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: Developments and potentials: MTAs combination therapy for cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 134, n. 6, p. 1257–1269, 2014.
- LO, Hui-Wen. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 37–52, 2010.
- LUCARELLI, E.; KAPLAN, D.; THIELE, C. J. Activation of trk-A but not trk-B signal transduction pathway inhibits growth of neuroblastoma cells. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 2068–2070, 1997.
- MAO, Jiani et al. EGFR/EGFRvIII Dual-Targeting Peptide-Mediated Drug Delivery for Enhanced Glioma Therapy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 29, p. 24462–24475, 2017.
- MARTINELLI, E. et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. **Clinical & Experimental Immunology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 1–9, 2009.
- MCCUBREY, James A. et al. Targeting the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT and P53 pathways in hematopoietic drug resistance. **Advances in Enzyme Regulation**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 64–103, 2007.
- MELLINGHOFF, Ingo K. et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 19, p. 2012–2024, 2005.
- MONTAGUT, Clara; SETTLEMAN, Jeff. Targeting the RAF–MEK–ERK pathway in cancer therapy. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 283, n. 2, p. 125–134, 2009.



MORIWAKI, Kazumasa et al. TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 38, 2018.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 169, n. 2, p. 107–114, 2001.

NITTA, Yusuke et al. Nimotuzumab enhances temozolomide-induced growth suppression of glioma cells expressing mutant EGFR in vivo. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 486–499, 2016.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 170, n. 5, p. 1445–1453, 2007.

OSTROM, Quinn T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. suppl\_5, p. v1–v88, 2017.

PEARSON, Joshua R. D.; REGAD, Tarik. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 2, p. 17040, 2017.

PERRY, James et al. Novel Therapies in Glioblastoma. **Neurology Research International**, [s. l.], v. 2012, p. 1–14, 2012.

PINET, Sandra et al. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 31, 2016.

PINHEIRO, Kelly V. et al. Targeting tyrosine receptor kinase B in gliomas. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 138–139, 2017.

QIU, Lihua et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1003–1011, 2006.

ROESLER, Rafael et al. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. **Expert Review of Anticancer Therapy**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1473–1475, 2011.

SHIRAHATA, Mitsuaki et al. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. **Cancer Science**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 165–172, 2009.

STEPHAN, Harald et al. Neurotrophin receptor expression in human primary retinoblastomas and retinoblastoma cell lines. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 218–222, 2008.

STUPP, Roger et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.

TAYLOR, T. E.; FURNARI, F. B.; CAVENEE, W. K. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 197–209, 2012.

THIELE, C. J.; LI, Z.; MCKEE, A. E. On Trk--The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 15, n. 19, p. 5962–5967, 2009.

THOMAZ, Amanda et al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 326–333, 2016.

TORP, S. H. et al. Coexpression of c-erbB 1-4 receptor proteins in human glioblastomas. An immunohistochemical study. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 353–359, 2007.

TOUAT, M. et al. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1457–1472, 2017.

TSITSIA, Vasiliki et al. Multimodality-multiparametric brain tumors evaluation. **Hellenic Journal of Nuclear Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 57–61, 2017.

VIVANCO, Igor et al. Differential Sensitivity of Glioma- versus Lung Cancer-Specific EGFR Mutations to EGFR Kinase Inhibitors. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 458–471, 2012.

WANG, Jialiang et al. c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. **PloS One**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. e3769, 2008.

WANG, Xiuxing et al. MYC-Regulated Mevalonate Metabolism Maintains Brain Tumor-Initiating Cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 77, n. 18, p. 4947–4960, 2017.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 359, n. 5, p. 492–507, 2008.

WESTPHAL, Manfred; MAIRE, Cecile L.; LAMSZUS, Katrin. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise. **CNS Drugs**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 723–735, 2017.

WESTWICK, C. R. Item analysis. **The Journal of Nursing Education**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 27–32, 1976.

WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 10, p. 1566–1584, 2008.

WIERNIK, A.; JARSTRAND, C.; TUNEVALL, G. The value of immunoelectroosmophoresis (IEOP) for etiological diagnosis of acute respiratory tract infections due to pneumococci and Mycoplasma pneumoniae. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 173–176, 1978.

WIRSCHING, Hans-Georg; GALANIS, Evanthia; WELLER, Michael. Glioblastoma. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] : Elsevier, 2016. v. 134p. 381–397.

WU, YiHan et al. FK228 augmented temozolomide sensitivity in human glioma cells by blocking PI3K/AKT/mTOR signal pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 462–469, 2016.

XIONG, Jing et al. Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 223–227, 2015.

XU, Yuan-Yuan et al. Development of targeted therapies in treatment of glioblastoma. **Cancer Biology & Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 223–237, 2015.

YAO, Maojin et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], 2018.

YUAN, Yuan; YE, Hai-Qiong; REN, Qian-Chuan. Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. **Oncology Reports**, [s. l.], 2018.

ZHANG, Jing et al. Prognostic role of neutrophil lymphocyte ratio in patients with glioma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 35, p. 59217–59224, 2017.

ZHAO, Hua-Fu et al. PI3K p110 $\beta$  isoform synergizes with JNK in the regulation of glioblastoma cell proliferation and migration through Akt and FAK inhibition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 35, n. 1, 2016.

## 5. DISCUSSÃO

Glioblastoma (GBM) é o mais freqüente tumor cerebral maligno primário diagnosticado em adultos. E apesar da maior compreensão dos mecanismos envolvidos com a regulação molecular do GBM e conseqüentemente sobre os processos que envolvem a gênese, desenvolvimento e progressão tumoral, muitas terapias alvo-específicas não têm atingido as expectativas esperadas e o prognóstico desta neoplasia ainda permanece desfavorável (KHASRAW; LASSMAN, 2010; OHGAKI; KLEIHUES, 2007; SHIRAHATA et al., 2009). Mesmo assim, entre todas essas tentativas, uma conclusão evidente é que monoterapias resultam em efeitos discretos que pouco contribuem para a sobrevivência dos pacientes (PERRY et al., 2012). Dessa forma, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes para o tratamento de glioblastoma é imprescindível. Além disso, encontrar alternativas por meio da utilização de protocolos constituídos por terapias alvo-específicas com diferentes mecanismos parece ser uma investida viável na busca por novas estratégias de tratamento.

As neurotrofinas são caracterizadas como um grupo de proteínas as quais estão envolvidas com diversos processos em neurogênese, tais como a sobrevivência neuronal, crescimento e diferenciação dependendo do contexto celular (CHAO, 2003; REICHARDT, 2006). E esses efeitos são exercidos, principalmente, mediante a ligação dessas moléculas aos seus receptores Trks. Crescentes são os estudos demonstrando o envolvimento das neurotrofinas em configurações patológicas incluindo o câncer. Assim como ocorre com muitos outros fatores de crescimento, uma desregulação na transdução de sinal da neurotrofina (sinalização neurotrofina/Trk) é encontrada em vários tumores onde eles podem acompanhar ou contribuir para a transformação maligna (STEPHAN et al, 2008; THIELE; LI; MCKEE, 2009; RICCI et al., 2001; XIONG et al., 2015; HUA et al., 2016).

A contribuição do sistema de sinalização via BDNF/TrkB na proliferação e sobrevivência de células tumorais têm sido demonstrado (HUANG; REICHARDT, 2001; LAM et al., 2011; PEARSE et al., 2005; THIELE; LI; MCKEE, 2009). Estudos prévios demonstram que TrkB frequentemente exhibe uma expressão acentuada em tumores altamente invasivos e é um regulador chave da malignidade do tumor

(ASSIMAKOPOULOU et al., 2007; HAAPASALO, A. et al., 1999; HAAPASALO, et al., 2002). Evidências crescentes mostram que a superexpressão de BDNF está presente numa série de tumores, incluindo tumores do SNC, e sua expressão também pode estar correlacionada com um pior prognóstico em vários tipos de cânceres que expressam TrkB (ARTICO et al., 2009; ASGHARZADEH et al., 2006; EDSJÖ et al., 2003).

Xiong e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento dos níveis de BDNF contribui para o desenvolvimento da malignidade em gliomas através do seu receptor primário, ao qual se liga com alta afinidade, TrkB. Adicionalmente, a contribuição de TrkB ,no desenvolvimento de astrocitoma e a possibilidade de se tornar um alvo terapêutico neste tipo de tumor, tem sido relatada (NI et al., 2016). Do mesmo modo que desempenha um papel-chave no controle da progressão e agressividade de glioblastoma (PINET et al., 2016). Por isso, esses resultados em conjunto, mesmo que preliminares, sugerem o envolvimento dessa neurotrofina e seu receptor na biologia dos tumores do SNC de alta malignidade, como o glioblastoma . Além disso, a associação observada entre BDNF e a proliferação e invasão de células tumorais *in vitro* fornece estrutura para novas estratégias terapêuticas que atuem na sinalização de BDNF/TrkB em glioblastoma (XIONG et al., 2013).

Considerando o envolvimento do receptor TrkB em GBM, foi demonstrado que o bloqueio seletivo deste receptor, utilizando uma pequena molécula inibidora conhecida como ANA-12, foi capaz de promover uma considerável diminuição na viabilidade celular em uma linhagem tumoral de GBM (artigo 1). Efeitos semelhantes foram descritos por Thomaz e colaboradores (2016) em um estudo envolvendo o bloqueio de TrkB em linhagens tumorais de neoplasia cerebral pediátrica. Dessa forma, o bloqueio das funções desse receptor pode conduzir a uma terapia alternativa para GBM. E baseado nisso, atualmente, já estão sendo utilizados inibidores de tirosina quinase em ensaios clínicos de fase II. Porém, mesmo com um aparente sucesso clínico inicial de moléculas, como LOXO-101(Larotrectinibe) e Entrectinibe ainda é necessário buscar alternativas que contornem os mecanismos de resistência que são desenvolvidos subsequentes ao uso desses compostos e assim, obter resultados clínicos mais favoráveis junto aos pacientes (LANGE; LO, 2018).

Além das alterações na expressão de TrkB, muito estudos têm descrito que o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está comumente mutado em GBM, levando a sua overexpressão e consequente ativação das suas vias de sinalização (FAN; WEISS, 2010; INABA et al., 2011; KARPEL-MASSLER et al., 2009; NARITA et al., 2002; TAYLOR; FURNARI; CAVENEE, 2012). A identificação das alterações de EGFR em GBM permitiu avanços importantes na confirmação de que o EGFR (em combinação com outras alterações genéticas) é capaz de desempenhar uma função importante na patogênese da doença. Além disso, GBMs são altamente resistentes ao tratamento com radiação e quimioterapia e a sinalização de EGFR aberrante contribui para esta resistência (HATANPAA et al., 2010).

Com isso, notavelmente, GBMs são altamente adequados para a terapia molecular, pois exibem um conjunto definido de alterações moleculares que levam a ativação desregulada de vias de sinalização que favorecem a progressão tumoral. Neste sentido, em relação às alterações moleculares, aquelas relacionadas à TrkB e EGFR devem ser ressaltadas, uma vez que o envolvimento simultâneo desses receptores com a patofisiologia do GBM já tem sido relatado. Os dados obtidos por Lawn e colaboradores (2015) demonstraram que a combinação de inibição de Trk com a inibição EGFR pode superar a resistência ao tratamento de erlotinib isoladamente em células cerebrais iniciadoras de tumor (BTICs), e sugerem uma comunicação entre esses receptores ao demonstrar que o tratamento com neurotrofina estimula a viabilidade de BTICs apesar do bloqueio EGFR. Os resultados apresentados ainda indicam que, o crescimento de BTIC, mediado pelas neurotrofinas, requer tanto as vias ERK como AKT.

Portanto, avaliamos os efeitos isolados e em combinação do bloqueio seletivo de TrkB e EGFR em linhagens celulares e em um modelo de xenoenxerto *in vivo* de glioblastoma (artigo 2). O tratamento isolado de ambos os inibidores, ANA-12 e AG 1478 foi capaz de promover uma significativa redução da viabilidade celular de maneira dose-dependente nas duas linhagens testadas, A172 e U87. Esses resultados corroboram com os estudos envolvendo o bloqueio de TrkB e EGFR que têm sido realizados e, não somente em GBM, mas em muitos outros tipos tumorais, uma vez que abordagens terapêuticas direcionadas à alvos moleculares constituem uma estratégia recorrente em oncologia pré-clínica e clínica. Como a quimioterapia

padronizada para GBM forneceu apenas um benefício modesto no desfecho clínico, a necessidade de estratégias com eficácia aprimorada levou ao desenvolvimento das terapias direcionadas atuais (LASSMAN, 2005; MA et al., 2015; MELLINGHOFF et al., 2005; NEHOFF et al., 2015; MORIWAKI et al., 2018).

Tecidos normais regulam e controlam adequadamente a proliferação celular, para assim assegurar a homeostase e a manutenção da arquitetura e fisiologia do tecido. Nas células tumorais, no entanto, devido à desregulação dos eventos de sinalização, o crescimento celular ocorre anormalmente (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esses eventos que se apresentam alterados, em estados tumorais, frequentemente estão relacionados à receptores de fatores de crescimento, aqui neste estudo representados por TrkB e EGFR. Os resultados obtidos reforçam as crescentes evidências sobre a importância dessas proteínas para a iniciação e progressão tumorais.

Porém, principalmente, a respeito da heterogeneidade do GBM, que o torna frequentemente resistente às monoterapias padrões, e a busca por melhores respostas terapêuticas, a terapia multimodal caracteriza-se como uma opção promissora para o tratamento dessa neoplasia. Por isso, investimos no bloqueio dual dos receptores, em ambas as linhagens tumorais. O resultado desse bloqueio foi uma diferença na susceptibilidade à combinação das drogas. Uma vez que a redução na viabilidade celular foi superior àquela observada quando os tratamentos foram utilizados isoladamente, somente na linhagem A172, sendo que essa redução significativa implica, segundo o CI (índice de combinação) calculado, em um efeito sinérgico entre ANA-12 e AG-1478 (CHOU; TALALAY, 1984).

Muitos são os estudos que sugerem um crosstalk entre os receptores TrkB e EGFR em estados patológicos, como o câncer (QIU et al., 2006; DE FARIAS et al., 2012; GÖTZ; SENDTNER, 2014). Nossos dados expandem a discussão, juntamente com relatos anteriores em outras malignidades, sobre a relação entre esses receptores, e é, provavelmente, até o momento, a análise mais abrangente em glioblastoma. A diferença, entre as linhagens tumorais, na resposta à combinação está de acordo com os dados observados clinicamente. Apesar de todos os avanços terapêuticos (incluindo terapias alvo) e cirúrgicos, o prognóstico para pacientes com gliomas malignos permanece devastador: a terapia atual é insuficiente com recidiva

quase universal. Para que a resposta terapêutica seja mais eficaz e abrangente, uma caracterização molecular mais criteriosa deve ser realizada. Através da implementação de testes clínicos minimamente invasivos que permitam não só a avaliação molecular desses pacientes como também o prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento. Como mencionado anteriormente, a heterogeneidade e plasticidade das células de glioblastoma intra e interpacientes são, provavelmente, os principais fatores do insucesso dos protocolos terapêuticos atuais. Estes avanços, podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, baseadas em um alvo molecular personalizado para cada paciente diagnosticado com GBM (TOUAT et al, 2017)

O câncer é uma doença multifatorial e seus mecanismos envolvem mudanças em múltiplas vias biológicas (BARRETO DOS SANTOS et al., 2018). Porém, incontestavelmente sua habilidade em sustentar uma proliferação de maneira indeterminada é uma das suas características mais importantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essa característica está relacionada a um conjunto de processos, muito bem organizados, que garantem que os sinais aberrantes vindo dos ligantes e seus receptores e vias associados, se perpetuem originando uma atividade aberrante do ciclo celular nas células tumorais (OTTO; SICINSKI, 2017).

Baseado nisso, frequentemente, quimioterápicos atualmente em uso no tratamento do câncer ou ainda sob investigação têm seus mecanismos de ação direcionados ao ciclo celular. Neste estudo, nós investigamos as possíveis modificações no ciclo celular, em linhagens tumorais de GBM, induzidas pelos tratamentos isolados ou em combinação dos inibidores ANA-12 e AG 1478. E, novamente as linhagens apresentaram perfis diferentes de resposta aos tratamentos. A combinação, na linhagem A172, provocou um acúmulo de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> enquanto que diminuiu o número de células na fase S. Coincidentemente, esses resultados estão de acordo com aqueles observados nos tratamentos isolados com AG 1478 e ANA-12, respectivamente. O ciclo celular, considerando sua importância para a homeostase tecidual, é um processo altamente regulado em função dos muitos pontos de controle ( termo em inglês checkpoints). Esses pontos de controle são mecanismos celulares que protegem a integridade do genoma durante a progressão do ciclo celular (CHAO et al., 2017). Dessa forma, sugerimos que os danos induzidos pelo tratamento, na molécula de DNA, ativam um



G1/S *checkpoint* e essa ativação vem acompanhada de uma parada do ciclo celular. Esse bloqueio ocorre devido às condições adversas em que as células estão inseridas e, assim, um atraso é necessário para reparar lesões no DNA antes de retomar a proliferação (PAULOVICH; TOCZYSKI; HARTWELL, 1997; WILLIS ; RHIND, 2009; FINN; LOWNDES; GRENON, 2012; WANG et al., 2015; SHALTIEL et al., 2015).

Diferentemente do ocorrido com as células A172, na linhagem U87 o tratamento combinado com os inibidores foi capaz de induzir somente o aparecimento de um, ainda que pequeno, acúmulo de células na fase sub-G1. Além disso, esse efeito não foi observado nas células após o tratamento isolado com ANA-12 ou AG 1478. Possivelmente, na linhagem tumoral U87 o tratamento induziu o aparecimento de uma população apoptótica. A relação entre apoptose e a distribuição do ciclo correspondente, caracterizada pela fragmentação do DNA e assim, aumento de células em sub-G1 já é aceita pela comunidade científica e tem sido demonstrada (CHOI et al., 2003; ALVAREZ-SALA et al., 2018; WANG et al., 2018). Mesmo com efeitos pouco pronunciados e que devem ser melhor investigados, em ambas as linhagens, o entendimento da dinâmica da progressão do ciclo celular pode ser essencial na busca por compreender o modo pelo qual novas alternativas terapêuticas para GBM exercem seus efeitos.

Sinais do ambiente extracelular são transduzidos por receptores transmembrana que por sua vez iniciam uma resposta biológica, que em se tratando de um ambiente tumoral, pode ser caracterizada, principalmente, como proliferação descontrolada, estímulo a angiogênese, evasão à apoptose, ativação de invasão e metástases (SEVER; BRUGGE, 2015). Os inúmeros eventos que são conduzidos intracelularmente ocorrem devido a ativação de vias de sinalização. Essas vias têm se tornado potencialmente útil na busca por terapias mais eficazes, não apenas para GBM, mas em muitos outros tipos tumorais. Além de estarem comumente alteradas, também podem ser moduladas e por isso, alvos atrativos durante o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento de GBM (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015).

A via Ras/MAPK/ERK está entre as vias que desempenham um papel fundamental na iniciação e manutenção tumorais em GBM (PEARSON; REGAD, 2017). Em nossos resultados, os tratamentos isolados foram capazes de provocar

uma redução na fosforilação de ERK em ambas as linhagens. Mas, por outro lado, o bloqueio combinado dos receptores TrkB e EGFR, resultou em uma diminuição mais acentuada, nos níveis de ERK fosforilada, apenas na linhagem A172. De fato, uma maior compreensão dos mecanismos biológicos comprometidos com a oncogênese em GBM contribuirá para o desenvolvimento de terapias direcionadas que podem melhorar o desfecho clínico dos pacientes. Kohsaka e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação de ERK está envolvida com um aumento na tumorigenicidade em glioblastoma. No trabalho publicado por Li e colaboradores (2018) a enzima histona desacetilase 1 (HDAC1) promove a proliferação e invasão de células de glioblastoma ativando também a via de sinalização ERK *in vitro* e *in vivo*. Por isso, a via da ERK tem sido detalhada, sob diferentes aspectos, e está no foco dos estudos que envolvem GBM.

Os níveis de c-Myc também se mostraram gradativamente reduzidos nas células A172, enquanto que nas U87 a redução foi, aparentemente, observada somente após o tratamento com AG 1478. Os processos de regulação do crescimento e metabolismo celular estão intimamente relacionados. O c-Myc é um fator de transcrição que atua como “regulador mestre” controlando muitos aspectos de ambos os processos. O c-Myc está criticamente envolvido na regulação de muitos transdutores de sinal que promovem a proliferação celular (FREIE; EISENMAN, 2008). Além disso, índices positivos de c-MYC são encontrados em amostras de pacientes diagnosticados com glioma, e tendem a aumentar de acordo com a progressão maligna da doença, evidenciando assim sua contribuição na patofisiologia do GBM (FARIA et al., 2006). Com isso, nossos resultados iniciais sustentam a ideia de que a inibição combinada da sinalização de TrkB e EGFR em GBM parece mediar seus efeitos através da desregulação dos níveis de c-Myc.

Como já mencionado anteriormente, a melhor compreensão das vias moleculares que conduzem à malignidade no glioblastoma levou ao desenvolvimento de vários biomarcadores e alvos terapêuticos. Porém, pouco tem se evoluído a respeito da relevância desses fatores moleculares *in vivo*. Utilizando um modelo murino de glioblastoma as células da linhagem tumoral U87 foram previamente tratadas *in vitro* e administradas, por via subcutânea, 24h após o tratamento dos inibidores isolados ou em combinação. Os efeitos mais prolongados dos tratamentos puderam ser observados 15 e 31 dias após a inoculação das

células. É possível sugerir que dados a seguir como: o bloqueio de EGFR, por diferentes classes de inibidores, ter atividade antitumoral sinérgica em glioblastoma (JOHNS et al., 2003); ou ainda, o bloqueio combinado de diferentes vias de sinalização reduziu significativamente o crescimento tumoral quando em comparação com um único inibidor (ZHAO et al., 2016) foram mais favoráveis, mesmo considerando que utilizam diferentes inibidores direcionados à diferentes alvos, possuem em comum um protocolo farmacoterapêutico baseado na administração por via parenteral das drogas e com repetidas doses.

Ainda que pouco evidente a administração combinada dos inibidores de TrkB e EGFR parece ser uma promessa entre as alternativas para o tratamento do glioblastoma. Deve ser melhor compreendida, a partir de estudos pré-clínicos e clínicos que, em conjunto, contemplem a complexidade da doença e assim, garantir um prognóstico mais favorável para os pacientes.

## **6. CONCLUSÃO**

A principal causa da mortalidade entre os pacientes diagnosticados com GBM é devida sua alta heterogeneidade, que, infelizmente, acaba por não ser contemplada pelas terapias convencionais padronizadas para a doença. Esforços que têm sido direcionados para uma melhor compreensão da patogênese em GBM são essenciais para o desenvolvimento de terapias eficientes que fornecerão perspectivas e, conseqüentemente, uma extensão na sobrevida dos pacientes.

Vários estudos envolvendo RTKs revelaram uma diversidade nos mecanismos de ativação pelos seus ligantes em muitos ambientes patológicos, entre eles o câncer. À medida que nossa compreensão, desses detalhes, se torna cada vez mais sofisticada, fornece um contexto importante para combater terapêuticamente efeitos de alterações patogênicas em RTK no câncer e mais especificamente, em GBM.

Neste trabalho, buscamos compreender como a ativação de TrkB e EGFR e conseqüentemente, as vias de sinalização associadas, são traduzidas em respostas pelas células tumorais de GBM. O resultado do bloqueio seletivo desses receptores foi eficaz em reduzir a viabilidade celular das linhagens celulares testadas e esse bloqueio resultou, ainda, em efeito sinérgico quando as funções dos receptores

foram inibidas concomitantemente. Efeitos semelhantes também foram observados no modelo animal de GBM utilizado. Após a administração subcutânea das células U87, previamente tratadas, houve redução do volume tumoral em todos os grupos de tratamento.

Os efeitos na viabilidade tanto *in vitro* como *in vivo* e as alterações apresentadas na progressão do ciclo celular parecem ser mediados pela sinalização relacionada à ERK e, sua comunicação posterior com o fator de transcrição c-Myc.

Assim, os dados apresentados nesse trabalho estimulam a continuidade dos estudos que buscam compreender o papel de TrkB e EGFR em neoplasias tão agressivas e complexas quanto o glioblastoma. E, além disso, continuem avaliando o potencial da inibição dual dos receptores no desenvolvimento de uma terapia alternativa para GBM e fornecer, aos pacientes, um prognóstico mais favorável no futuro.

## 7. PERSPECTIVAS

- Administração parenteral (i.p.) de ANA-12 e AG 1478, isolados ou em combinação, em um modelo ortotópico de GBM (U87). Esses resultados devem ser incluídos ao artigo 2 e serão obtidos em colaboração com os seguintes pesquisadores, da *University of Central Lancashire- Preston, Lancashire, Reino Unido*:

Dr. Lisa Shaw

*Senior lecturer in pharmacology*

*School of Pharmacy and Biomedical Sciences*

Dr. Chris Smith

*Senior lecturer in pharmacology*

*School of Pharmacy and Biomedical Sciences*

Dr. Victorio Bambini-Junior

*Lecturer in bioscience*

*School of Pharmacy and Biomedical Sciences*

Victoria Anne Metcalfe

*Licensed research assistant*

*School of Pharmacy and Biomedical Sciences*

- Finalização do artigo 2 e posterior submissão para publicação em periódico científico.

## 8. REFERÊNCIAS

ABUJAMRA, Ana L. et al. Leukemia virus long terminal repeat activates NFκB pathway by a TLR3-dependent mechanism. **Virology**, [s. l.], v. 345, n. 2, p. 390–403, 2006.

ADAMSON, Cory; BABU. Rindopepimut: an evidence-based review of its therapeutic potential in the treatment of EGFRvIII-positive glioblastoma. **Core Evidence**, [s. l.], p. 93, 2012.

AGNIHOTRI, Sameer et al. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 25–41, 2013.

AL-NEDAWI, K. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 10, p. 3794–3799, 2009.

ALVAREZ-SALA, Andrea et al. Apoptotic effect of a phytosterol-ingredient and its main phytosterol (β-sitosterol) in human cancer cell lines. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s. l.], p. 1–12, 2018.

AN, Zhenyi et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. **Oncogene**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1561–1575, 2018.

ARTEAGA, Carlos L.; ENGELMAN, Jeffrey A. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 282–303, 2014.

ARTICO, Marco et al. Immunohistochemical profile of neurotrophins in human cranial dura mater and meningiomas. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 1373–1380, 2009.

ASGHARZADEH, Shahab et al. Prognostic Significance of Gene Expression Profiles of Metastatic Neuroblastomas Lacking MYCN Gene Amplification. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 98, n. 17, p. 1193–1203, 2006.

ASSIMAKOPOULOU, Martha et al. Neurotrophin receptors expression and JNK pathway activation in human astrocytomas. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2007.

BARNABÉ-HEIDER, Fanie; MILLER, Freda D. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 5149–5160, 2003.

BRENNAN, Cameron W. et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013.

BRIDGES, A. J. The rationale and strategy used to develop a series of highly potent, irreversible, inhibitors of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 825–843, 1999.

BRUNETTO DE FARIAS, Caroline et al. BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. **Oncology**, [s. l.], v. 79, n. 5–6, p. 430–439, 2010.

CAZORLA, Maxime et al. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 121, n. 5, p. 1846–1857, 2011.

CHAO, Hui Xiao et al. DNA Damage Checkpoint Dynamics Drive Cell Cycle Phase Transitions. [s. l.], 2017.

CHAO, Moses V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 299–309, 2003.

CHOI, Yung Hyun et al. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1657–1662, 2003.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, [s. l.], v. 22, p. 27–55, 1984.

CHOY, Cecilia et al. Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2017.

CIARDIELLO, Fortunato; TORTORA, Giampaolo. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 358, n. 11, p. 1160–1174, 2008.

COHEN-CORY, Susana et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], p. NA-NA, 2010.

DAVIS, Mary. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. S2–S8, 2016.

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

DEL VECCHIO, C. A. et al. EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. **Oncogene**, [s. l.], v. 32, n. 21, p. 2670–2681, 2013.

DESCAMPS, S. et al. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 27, p. 16659–16662, 1998.

DESMET, C. J.; PEEPER, D. S. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 7–8, p. 755–759, 2006.

EDSJÖ, Anders et al. Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 813–823, 2003.

ELLER, Jorge L. et al. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1005-1013-1014, 2002.

ELLIS, A. G. et al. Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 1422–1434, 2006.

EMLET, David R. et al. Targeting a glioblastoma cancer stem-cell population defined by EGF receptor variant III. **Cancer Research**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 1238–1249, 2014.

ESTIMATIVA 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FAN, Qi-Wen; WEISS, William A. Targeting the RTK-PI3K-mTOR Axis in Malignant Glioma: Overcoming Resistance. In: ROMMEL, Christian; VANHAESEBROECK, Bart; VOGT, Peter K. (Eds.). **Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 347p. 279–296.

FARIA, Mário H. G. et al. Expression of Ki-67, Topoisomerase II $\alpha$  and c-MYC in astrocytic tumors: Correlation with the histopathological grade and proliferative status. **Neuropathology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 519–527, 2006.

FERGUSON, Kathryn M. Structure-Based View of Epidermal Growth Factor Receptor Regulation. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 353–373, 2008.

FINN, Karen; LOWNDES, Noel Francis; GRENON, Muriel. Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 9, p. 1447–1473, 2012.

FREIE, Brian W.; EISENMAN, Robert N. Ratcheting Myc. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 425–426, 2008.

FRIEDMAN, W. J. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 17, p. 6340–6346, 2000.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, [s. l.], v. 21, n. 21, p. 2683–2710, 2007.

FURNARI, Frank B. et al. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 302–310, 2015.

GOMEZ, Daniel Richard et al. Integrative proteomic and transcriptomic analysis provides evidence for TrkB (NTRK2) as a therapeutic target in combination with tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 18, 2018.

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

HAAPASALO, Annakaisa et al. Expression of the naturally occurring truncated trkB neurotrophin receptor induces outgrowth of filopodia and processes in neuroblastoma cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1285–1296, 1999.

HAAPASALO, Annakaisa et al. Regulation of TRKB Surface Expression by Brain-derived Neurotrophic Factor and Truncated TRKB Isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 45, p. 43160–43167, 2002.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HATANPAA, Kimmo J. et al. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 675–684, 2010.

HEINEN, Tiago Elias et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 23, 2016.

HUA, Zhongyan et al. PI3K and MAPK pathways mediate the BDNF/TrkB-increased metastasis in neuroblastoma. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 16227–16236, 2016.

HUA, Zhongyan et al. P53/PUMA are potential targets that mediate the protection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)/TrkB from etoposide-induced cell death in neuroblastoma (NB). **Apoptosis**, [s. l.], v. 23, n. 7–8, p. 408–419, 2018.

HUANG, Eric J.; REICHARDT, Louis F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 677–736, 2001.

HUANG, P. H. et al. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 31, p. 12867–12872, 2007.



HYNES, Nancy E.; LANE, Heidi A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 341–354, 2005.

IBÁÑEZ, Carlos F. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 284–286, 2002.

INABA, Nobuharu et al. Down-regulation of EGFR prolonged cell growth of glioma but did not increase the sensitivity to temozolomide. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 3253–3257, 2011.

JHANWAR-UNIYAL, Meena et al. Glioblastoma: Molecular Pathways, Stem Cells and Therapeutic Targets. **Cancers**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 538–555, 2015.

JOHNS, Terrance G. et al. Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 26, p. 15871–15876, 2003.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 381–391, 2000.

KARPEL-MASSLER, G. et al. Therapeutic Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor in High-Grade Gliomas: Where Do We Stand? **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1000–1012, 2009.

KASHYAP, Mahendra Pratap et al. Drug Targets in Neurotrophin Signaling in the Central and Peripheral Nervous System. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 6939–6955, 2018.

KHASRAW, Mustafa; LASSMAN, Andrew B. Advances in the Treatment of Malignant Gliomas. **Current Oncology Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 26–33, 2010.

KIMURA, Shinichi et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB is associated with poor prognosis and a malignant phenotype in small cell lung cancer. **Lung Cancer**, [s. l.], v. 120, p. 98–107, 2018.

KOHSAKA, Shinji et al. Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 960–970, 2014.

KRÜTTGEN, Alex; SCHNEIDER, Imke; WEIS, Joachim. The Dark Side of the NGF Family: Neurotrophins in Neoplasias. **Brain Pathology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 304–310, 2006.

KUMTHEKAR, Priya U. et al. A review of management strategies of malignant gliomas in the elderly population. **American Journal of Cancer Research**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 436–444, 2014.

LAM, C. T. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Promotes Tumorigenesis via Induction of Neovascularization: Implication in Hepatocellular Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 3123–3133, 2011.

LANGE, Allison; LO, Hui-Wen. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 105, 2018.

LASSMAN, A. B. Molecular Study of Malignant Gliomas Treated with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: Tissue Analysis from North American Brain Tumor Consortium Trials 01-03 and 00-01. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 21, p. 7841–7850, 2005.

LAWN, Samuel et al. Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-initiating Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 6, p. 3814–3824, 2015.

LEI, W.; MAYOTTE, J. E.; LEVITT, M. L. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 1A, p. 221–228, 1999.

LI, Shun et al. Histone deacetylase 1 promotes glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. **Brain Research**, [s. l.], v. 1692, p. 154–162, 2018.

LIANG, Wenhua et al. Network Meta-Analysis of Erlotinib, Gefitinib, Afatinib and Icotinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring EGFR Mutations. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e85245, 2014.

LYNN SNIDERHAN. **Neurotrophin Signaling Through Trk Receptors: Role in Neuronal and Cancer Cell Survival**. 2008. Doctor of Philosophy - University of Rochester, Rochester, NY, 2008.

MA, Hong et al. Icotinib hydrochloride enhances the effect of radiotherapy by affecting DNA repair in colorectal cancer cells. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1161–1170, 2015.

MARTINELLI, E. et al. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. **Clinical & Experimental Immunology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 1–9, 2009.

MARTIN-ZANCA, D. et al. Molecular characterization of the human trk oncogene. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, [s. l.], v. 51 Pt 2, p. 983–992, 1986.

MATSUMOTO, K. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 1798–1806, 1995.

MEEKER, Rick; WILLIAMS, Kimberly. Dynamic Nature of the p75 Neurotrophin Receptor in Response to Injury and Disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 615–628, 2014.

MELLINGHOFF, Ingo K. et al. Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 353, n. 19, p. 2012–2024, 2005.

MOLLOY, Niamh; READ, Danielle; GORMAN, Adrienne. Nerve Growth Factor in Cancer Cell Death and Survival. **Cancers**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 510–530, 2011.

MORIWAKI, Kazumasa et al. TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 38, 2018. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/25396>>. Acesso em: 21 set. 2018.

NAGANE, M. et al. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 10, p. 5724–5729, 1998.

NAKADA, Mitsutoshi et al. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. **Cancers**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 3242–3278, 2011.

NAKAGAWARA, A. et al. Clinical significance of expression of neurotrophic factors and their receptors in neuroblastoma. **Progress in Clinical and Biological Research**, [s. l.], v. 385, p. 155–161, 1994.

NARITA, Yoshitaka et al. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. **Cancer Research**, [s. l.], v. 62, n. 22, p. 6764–6769, 2002.

NEHOFF, Hayley et al. A combination of tyrosine kinase inhibitors, crizotinib and dasatinib for the treatment of glioblastoma multiforme. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 35, 2015.

NI, Jing et al. Tyrosine receptor kinase B is a drug target in astrocytomas. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 22–30, 2017.

OELMANN, E. et al. Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. **Cancer Research**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 2212–2219, 1995.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 170, n. 5, p. 1445–1453, 2007.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 16, n. suppl 4, p. iv1-iv63, 2014.

OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

PARTIK, G. et al. Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrosine kinase inhibitors A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 125, n. 7, p. 379–388, 1999.

PAULOVICH, A. G.; TOCZYSKI, D. P.; HARTWELL, L. H. When checkpoints fail. **Cell**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 315–321, 1997.

PEARSE, R. N. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. **Blood**, [s. l.], v. 105, n. 11, p. 4429–4436, 2005.

- PEARSON, Joshua R. D.; REGAD, Tarik. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 2, p. 17040, 2017.
- PEREZ-PINERA, P. et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 295, n. 1–2, p. 19–26, 2007.
- PERRY, Arie; WESSELING, Pieter. Histologic classification of gliomas. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] : Elsevier, 2016. v. 134p. 71–95.
- PERRY, James et al. Novel Therapies in Glioblastoma. **Neurology Research International**, [s. l.], v. 2012, p. 1–14, 2012.
- PINET, Sandra et al. TrkB-containing exosomes promote the transfer of glioblastoma aggressiveness to YKL-40-inactivated glioblastoma cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 31, 2016.
- PUEHRINGER, Dirk et al. EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 407–415, 2013.
- QIU, Lihua et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 1003–1011, 2006.
- REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.
- RICCI, Alberto et al. Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Human Lung Cancer. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 439–446, 2001. a.
- RICCI, Alberto et al. Neurotrophins and Neurotrophin Receptors in Human Lung Cancer. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 439–446, 2001. b.
- ROESLER, Rafael et al. Current and emerging molecular targets in glioma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1735–1751, 2010.
- SAMPSON, John H. et al. Immunologic Escape After Prolonged Progression-Free Survival With Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Peptide Vaccination in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 31, p. 4722–4729, 2010.
- SARIOLA, H. et al. Neurotrophins and ciliary neurotrophic factor: their biology and pathology. **Annals of Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 355–363, 1994.
- SCHUSTER, J. et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 854–861, 2015.

SCLABAS, Guido M. et al. Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 2 Pt 1, p. 440–449, 2005.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal Transduction in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, 2015.

SHALTIEL, I. A. et al. The same, only different - DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 607–620, 2015.

SHERGALIS, Andrea et al. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 412–445, 2018.

SHIRAHATA, Mitsuaki et al. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. **Cancer Science**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 165–172, 2009.

SIGISMUND, Sara; AVANZATO, Daniele; LANZETTI, Letizia. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 3–20, 2018.

SINGH, Bhuminder; COFFEY, Robert J. Trafficking of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands in Polarized Epithelial Cells. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 275–300, 2014.

SINKEVICIUS, K. W. et al. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 28, p. 10299–10304, 2014.

SKAPER, Stephen D. The Neurotrophin Family of Neurotrophic Factors: An Overview. In: SKAPER, Stephen D. (Ed.). **Neurotrophic Factors**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 846p. 1–12.

SKOG, Johan et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2008.

SMITH, Colin; IRONSIDE, James W. Diagnosis and pathogenesis of gliomas. **Current Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 180–192, 2007.

SOEDA, Akio et al. Epidermal Growth Factor Plays a Crucial Role in Mitogenic Regulation of Human Brain Tumor Stem Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 16, p. 10958–10966, 2008.

STEPHAN, Harald et al. Neurotrophin receptor expression in human primary retinoblastomas and retinoblastoma cell lines. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 218–222, 2008.

TAYLOR, T. E.; FURNARI, F. B.; CAVENEE, W. K. Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 197–209, 2012.

- THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1985–1996, 2014.
- THIELE, C. J.; LI, Z.; MCKEE, A. E. On Trk--The TrkB Signal Transduction Pathway Is an Increasingly Important Target in Cancer Biology. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 15, n. 19, p. 5962–5967, 2009.
- THOMAZ, Amanda et al. BDNF/TrkB Signaling as a Potential Novel Target in Pediatric Brain Tumors: Anticancer Activity of Selective TrkB Inhibition in Medulloblastoma Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 326–333, 2016.
- TOUAT, M. et al. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1457–1472, 2017.
- VIVANCO, Igor et al. Differential Sensitivity of Glioma- versus Lung Cancer–Specific EGFR Mutations to EGFR Kinase Inhibitors. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 458–471, 2012.
- WANG, Chunhua et al. Polysaccharide peptide isolated from grass-cultured *Ganoderma lucidum* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the human U251 glioma cell line. **Oncology Letters**, [s. l.], 2018.
- WANG, Haiyong et al. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 334, n. 2, p. 350–358, 2015.
- WEERARATNA, A. T. et al. Rational basis for Trk inhibition therapy for prostate cancer. **The Prostate**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 140–148, 2000.
- WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant Gliomas in Adults. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 359, n. 5, p. 492–507, 2008.
- WIEDUWILT, M. J.; MOASSER, M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 10, p. 1566–1584, 2008.
- WILLIS, Nicholas; RHIND, Nicholas. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. **Cell Division**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 13, 2009.
- WITSCH, Esther; SELA, Michael; YARDEN, Yosef. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. **Physiology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 85–101, 2010.
- XIONG, Jing et al. Mature BDNF promotes the growth of glioma cells in vitro. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 2719–2724, 2013.
- XIONG, Jing et al. Mature brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB are upregulated in human glioma tissues. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 223–227, 2015.
- YARDEN, Yosef; SLIWKOWSKI, Mark X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 127–137, 2001.

YOON, S. O. et al. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 3273–3281, 1998.

YU, Yingjiao et al. Overexpression of TrkB promotes the progression of colon cancer. **APMIS**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 188–195, 2010.

YUAN, Yuan; YE, Hai-Qiong; REN, Qian-Chuan. Proliferative role of BDNF/TrkB signaling is associated with anoikis resistance in cervical cancer. **Oncology Reports**, [s. l.], 2018.

ZHANG, Yong et al. Overexpression of Tyrosine Kinase B Protein as a Predictor for Distant Metastases and Prognosis in Gastric Carcinoma. **Oncology**, [s. l.], v. 75, n. 1–2, p. 17–26, 2008.

ZHAO, Hua-Fu et al. PI3K p110 $\beta$  isoform synergizes with JNK in the regulation of glioblastoma cell proliferation and migration through Akt and FAK inhibition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 35, n. 1, 2016.