

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

**Expressão de neurotrofinas e seus receptores em  
amostras de osteossarcoma primário**

**Bruno Pereira Antunes**

Porto Alegre, 2020

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

**Expressão de neurotrofinas e seus receptores  
em amostras de osteossarcoma primários**

**Bruno Pereira Antunes**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto  
Galia

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências  
Cirúrgicas, Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul.

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Antunes, Bruno Pereira  
Expressão de neurotrofinas e seus receptores em  
amostras de osteossarcoma primário / Bruno Pereira  
Antunes. -- 2020.  
62 f.  
Orientador: Carlos Roberto Galia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Osteossarcoma. 2. Neurotrofinas. 3. Fatores de  
Crescimento Neural. 4. Fator Neurotrófico Derivado do  
Encéfalo. I. Galia, Carlos Roberto, orient. II.  
Título.

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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Pereira Antunes

### **Expressão de neurotrofinas e seus receptores em amostras de osteossarcoma primários**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2020

**BANCA EXAMINADORA:**

Doutor Brasil Silva Neto – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

Nome e titulação do orientador

Instituição do orientador

Doutor Joel Lavinsky – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

Doutor Luis Fernando da Rosa Rivero – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

Doutor Ricardo Gehrke Becker – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

---

Nome e titulação do membro da banca

Instituição do membro da banca

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Dr. Prof. Carlos Roberto Galia, por sua disponibilidade e apoio durante toda a minha formação, e principalmente por seus conselhos e orientações, um grande exemplo para mim. Ao Dr. Ricardo Gehrke Becker, como co-autor do projeto, um colega, sócio e amigo que a ortopedia me proporcionou, a quem muito admiro e devo grande parte da minha formação. A todos que contribuíram para o artigo, principalmente Dr. Bruno Silveira Pavei, Dr. Luis Fernando da Rosa Rivero.

Agradeço ainda, ao Serviço de Ortopedia e Traumatologia e ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Aos pacientes que participaram desse estudo.

Finalmente, agradeço a minha família, meus pais (Zenaide Pereira Antunes e Rogério de Oliveira Antunes) que me proporcionaram todas as condições para chegar até aqui e ser quem eu sou.

## SUMÁRIO

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>      | 6  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>           | 7  |
| <b>RESUMO</b>                     | 8  |
| <b>ABSTRACT</b>                   | 10 |
| <b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> | 11 |
| <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>      | 13 |
| <b>HIPÓTESES</b>                  | 18 |
| <b>Nula</b>                       | 18 |
| <b>Alternativa</b>                | 18 |
| <b>OBJETIVOS</b>                  | 19 |
| <b>Principal</b>                  | 19 |
| <b>Secundários</b>                | 19 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                | 20 |
| <b>ARTIGO EM PORTUGUÊS</b>        | 24 |
| <b>Anexos</b>                     | 39 |
| <b>ARTIGO EM INGLÊS</b>           | 44 |
| <b>Anexos</b>                     | 60 |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>       | 64 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

1. OS = Osteossarcoma
2. TrK = Receptor tirosino-quinase
3. NGF = Fator de crescimento neural
4. BDNF = Fator neurotrófico derivado do cérebro
5. BOTG = Grupo Brasileiro para o Tratamento de Osteossarcoma
6. VEGF = fator de crescimento endotelial vascular
7. PGE = prostaglandinas
8. NT = neurotrofinas

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Expressão imuno-histoquímica de BDNF 100x (A) e NGF 400x (B) em células de osteossarcoma. Setas indicam células coradas (reação positiva).

**Figura 2.** Expressão de TrkA (A) e TrkB (B) em células de osteossarcoma (100x). Setas indicam células coradas.

## RESUMO

**Objetivo:** Determinar a expressão imuno-histoquímica de neurotrofinas e seus receptores tirosino-quinases (Trk) em pacientes com osteossarcoma (OS) e sua relação com desfechos clínicos.

**Métodos:** Biópsias de tumores primários de pacientes com OS tratados em uma única instituição consecutivamente entre 2002 e 2015 foram analisadas através da técnica de imuno-histoquímica para expressão de receptores Trk A e B (TrkA e TrkB), fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). De forma independente, dois patologistas classificaram os marcadores de imuno-histoquímica como negativos (ausência de expressão ou reação de intensidade fraca) ou positivos (reação de intensidade moderada ou forte com expressão focal ou difusa).

**Resultados:** Foram analisados dados de 19 pacientes (10 do sexo feminino e 9 do masculino) com mediana de idade de 12 anos (5-17,3 anos). Dos tumores, 83,3% estavam localizados em membros inferiores, e 63,2% dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico. A sobrevida global em 5 anos foi de 55,3%. BDNF foi positivo em 16 pacientes (84%), e NGF em 14 pacientes (73%). TrkA e TrkB apresentaram coloração positiva em 4 (21%) e 8 (42%) dos pacientes, respectivamente. A análise de sobrevida não demonstrou diferença significativa entre receptores Trk e neurotrofinas.

**Conclusões:** Amostras de OS primário expressam neurotrofinas e receptores Trk através de imuno-histoquímica. Estudos futuros podem auxiliar na identificação do papel das mesmas na patogênese do OS e determinar se há possível correlação prognóstica.

**Palavras-chave:** Osteossarcoma. Fator de Crescimento Neural. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro. Receptor TrkA. Receptor TrkB.

## **ABSTRACT**

**Objective:** To determine the expression of tyrosine kinase receptors (Trk) and neurotrophins (NT) in patients with OS and their relation with clinical outcomes.

**Methods:** Primary tumor biopsies from patients with OS consecutively treated at a single institution between 2002 and 2015 were analyzed by immunohistochemistry for the expression of Trk receptors A and B (TrkA and TrkB), nerve growth factor (NGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Two pathologists independently classified immunohistochemistry staining as negative (negative or weak focal) or positive (moderate focal/diffuse or strong focal/diffuse).

**Results:** We analyzed data from 19 patients (10 females) with median age of 12 years (5–17.3). Of the tumors, 83.3% were located in the lower extremities and 63.2% were metastatic at diagnosis. The 5-year overall survival was 55.3%. BDNF was positive in 16 patients (84%), and NGF was positive in 14 patients (73%). TrkA and TrkB had positive staining in 4 (21%) and 8 (42%) patients, respectively. There was no significant difference between neurotrophin and Trk receptors in the survival analysis.

**Conclusion:** OS primary tumor samples express neurotrophin and Trk receptors by immunohistochemistry. Future studies should explore their role in OS pathogenesis and determine their prognostic significance in larger cohorts.

**Keywords:** Osteosarcoma. Nerve Growth Factor. Brain-Derived Neurotrophic Factor. Receptor, TrKA. Receptor, TrKB.

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O osteossarcoma, apesar de raro na população, é considerado o tumor maligno primário do osso mais comum. Acomete principalmente adolescentes e adultos jovens. Até a década de 70, a sobrevida desses pacientes era menor de 20% em 5 anos. Com o início da quimioterapia e a evolução da oncologia, o tratamento para pacientes não metastáticos atingiu sobrevida de 70% em 5 anos. Entretanto, o prognóstico ainda segue reservado para pacientes metastáticos, com menos de 30% de sobreviventes em 5 anos. Além disso, a partir dos anos 2000, atingiu-se um platô no sucesso do tratamento para ambos os tipos de pacientes <sup>1-3</sup>.

Os fatores neurotróficos, especificamente neurotrofinas NGF e BDNF e seus receptores específicos TrkA e TrkB, são proteínas que desempenham papel fundamental na diferenciação, sobrevivência e regulação de células neurais do sistema nervoso central e periférico. Mais recentemente, percebeu-se que as neurotrofinas também exercem influência em outras linhagens celulares como osteoblastos e na regulação da neoformação óssea, consolidação de fraturas e remodelamento ósseo, assim como em processos patológicos como na tumorigênese <sup>4, 5</sup>.

O aumento da expressão de neurotrofinas e seus receptores foi associado a piora do prognóstico e do desfecho em pacientes com diversos tipos de câncer, entre eles tumor de Ewing, rabdomyosarcoma, condrossarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, colangiocarcinoma, carcinoma gástrico. <sup>6-14</sup>. A superexpressão gênica dessas proteínas foi associada a capacidade de proliferação, sobrevivência e invasão das células neoplásicas.

Sabe-se ainda muito pouco sobre a patogênese do osteossarcoma e seus mecanismos moleculares regulatórios. Evidências atuais sugerem a influência de diversas proteínas que atuam na proliferação e invasão celular, resistência à quimioterapia, potencial metastático e angiogênese.<sup>1, 3, 15</sup>. O desafio atual é identificar essas proteínas e suas cascatas de ativação, com o intuito de individualizar cada caso. Atuar, assim, de maneira personalizada com cada paciente, a partir da identificação da presença de mutações específicas do seu tumor, utilizando terapia-alvo. São poucos ainda os estudos associando NT a osteossarcoma, e são principalmente em animais e *in vitro*<sup>16, 17</sup>. Com as sucessivas evidências do papel dessas proteínas em diversos tumores, inclusive sarcomas ósseos e de partes moles, consideramos que também possam estar associadas com o desenvolvimento e agressividade do osteossarcoma. Havendo essa associação, essa seria uma área promissora para o desenvolvimento de novas terapias personalizadas e consequentemente, melhora do prognóstico desses pacientes.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O osteossarcoma é um tumor derivado de células mesenquimais e caracteriza-se por apresentar estroma de células fusiformes malignas, produtoras de osteóide ou osso imaturo. É o tumor maligno primário do osso mais comum<sup>2, 3</sup>. Pode acometer qualquer osso, porém ocorre principalmente na região metafisária de ossos longos, como fêmur distal, tíbia proximal e úmero proximal. Atinge preferencialmente a faixa etária da segunda década da vida e o sexo masculino. Seu pico de incidência coincide com o estirão da puberdade. Dividido pela Organização Mundial da Saúde em central e periférico, apresenta vários subtipos em cada grupo<sup>18</sup>, com amplo espectro de grau histológico e agressividade. Sendo assim, o prognóstico também é muito variável, e está associado a diversos fatores, como localização (pior em regiões proximais), tamanho (maiores de 5 cm), resposta a quimioterapia (<90% de necrose), subtipo (maior grau histológico), metástase no diagnóstico e variações genéticas<sup>2, 3</sup>.

Historicamente, essa era uma doença de prognóstico muito reservado (menos de 20% de sobrevida em 5 anos). A partir dos anos 70, com o início da quimioterapia adjuvante, passou para 50% de sobrevida em 5 anos. Logo após, com a introdução da poliquimioterapia, desenvolvimento de novas drogas e a introdução do conceito de quimioterapia neoadjuvante, os pacientes com doença localizada passaram a sobreviver em média 70% em 5 anos. Essas novas táticas permitiram melhor controle sistêmico da doença (micrometástases), diminuição da lesão no sítio primário e melhor definição das margens. Isso também permitiu cirurgias mais preservadoras e diminuiu as taxas de amputação<sup>18-20</sup>. Por outro lado, a partir do final da década de 90,

mesmo com todos os avanços em pesquisa, principalmente na área da oncologia, as taxas de cura e sobrevida dessa doença atingiram um platô<sup>21-24</sup>. Além disso, para pacientes metastáticos, os desfechos oncológicos a longo prazo seguem sendo muito ruins e pouco mudou durante todos esses anos. No estudo multicêntrico realizado no Brasil pelo BOTG (*Brazilian Osteosarcoma Treatment Group*)<sup>3</sup>, verificou-se uma prevalência de 20% de metástase já no diagnóstico, acima do encontrado em estudos similares em outros países<sup>25-27</sup>. Esses dados poderiam sugerir relação com o atraso no diagnóstico e no início do tratamento, entretanto o intervalo de início dos sintomas até o diagnóstico não apresentou associação com metástase, tamanho da lesão e sobrevida nesses pacientes. Esses dados sugerem que o estágio da doença na apresentação depende mais do perfil biológico do tumor que da demora no diagnóstico. *Bacci et al* também sugeriu que a agressividade do tumor estivesse mais ligada ao seu perfil biológico, em estudo que associou metástases ao diagnóstico a menor tempo de sintomas antes do diagnóstico<sup>15</sup>. Ao contrário da evolução do tratamento de pacientes com doença localizada, o prognóstico do paciente metastático não melhorou muito ao longo das últimas décadas, mantendo-se em torno de 20 a 40% de sobrevida em 5 anos.<sup>28, 29</sup> Diversos estudos tentaram estratificar o risco e identificar os principais fatores prognósticos desses pacientes. *Kim et al*, identificou alguns fatores de risco preditores de pior prognóstico para sobrevida pós-metástase, e os benefícios de manejo mais agressivo nessas lesões. Ele refere que a não realização da metastasectomia é o principal fator de risco independente, seguido de recidiva local, metástase extra-pulmonar, baixa resposta histológica a quimioterapia neoadjuvante (menos de 90% de necrose tumoral).

Esse estudo ainda sugeriu que o perfil biológico do tumor inicial, tem um importante papel na resposta ao tratamento e prognóstico<sup>30</sup>.

Sabe-se ainda muito pouco sobre a patogênese do osteossarcoma e seus mecanismos moleculares regulatórios. Isso é imprescindível para a identificação de novas terapias-alvo e melhorar a eficácia do tratamento principalmente em pacientes com tumores mais agressivos e com maior potencial metastático. Há evidências que diversas proteínas têm um papel fundamental no desenvolvimento da doença, atuando na proliferação, invasão e sobrevivência das células.<sup>16</sup> A angiogênese, essencial no desenvolvimento do câncer e associada a maior agressividade e chance de metástase, é induzida por diversos fatores de crescimento, principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).<sup>1, 31</sup> Outras proteínas como prostaglandinas (PGE), potentes estimuladoras da neoformação óssea, induzem a expressão de VEGF em osteoblastos.<sup>32</sup> O TGF- $\beta$ , uma família de peptídeos que regula o crescimento, a diferenciação e a produção de matriz extracelular, agindo em osteoclastos e osteoblastos, foram identificados em células de osteossarcoma, apresentando maior expressão em tumores de alto grau, estando relacionado a maior agressividade e crescimento da lesão.<sup>33-35</sup>

As Neurotrofinas (NT), ou fatores neurotróficos, são uma família de proteínas que inclui NGF, BDNF, NT3 e NT4/5. Interagem com dois tipos de receptores de membrana: Trk (alta afinidade) e p75 (p75NT - baixa afinidade). Pertencem à família Trk: TrkA (específico do NGF), TrkB (BDNF), TrkC (NT3). O p75NT, é o receptor de membrana mais específico de TNF e citocinas e tem baixa afinidade de maneira semelhante com todas as neurotrofinas.<sup>36</sup> As NT estão relacionadas ao desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência dos

neurônios e regulação de diversas funções e reparo do sistema nervoso central e periférico no adulto. Entretanto, descobriu-se, em estudos *in vitro* e em animais, que elas também são expressas por outras células não neuronais, como osteoblastos, estimulando sua proliferação. Isso sugere fortemente que elas atuem tanto no remodelamento quanto na consolidação óssea de fraturas.<sup>4, 5</sup> Após isso, estudos em humanos, evidenciaram que BDNF e TrkB estariam envolvidos principalmente na formação de novos vasos e no processo osteogênico, sem ser identificados no osso maduro<sup>37</sup>. As NT contribuem ainda para a regulação do desenvolvimento cardíaco, neovascularização e na homeostasia do sistema imune<sup>38</sup>. Há ainda diversas evidências de que desempenham importante papel também em diversos tipos de tumores malignos, através da estimulação à proliferação celular, quimiorresistência, angiogênese, capacidade de invasão e potencial metastático. Em 1995, Matsumoto et al, relacionou a expressão de BDNF e TrkB a pior prognóstico no neuroblastoma, sendo associados a sobrevivência das células neoplásicas, diferenciação e capacidade de invasão<sup>9, 39</sup>. Entretanto, em outros estudos, o aumento da expressão de TrkA e TrkC, apresentou melhora do prognóstico.<sup>40, 41</sup> A expressão de TrkB também foi associada a maior agressividade em paciente com tumor de Wilms,<sup>10</sup> e melhor prognóstico em carcinoma medular de tireóide<sup>42</sup>. NGF e seus receptores foram associados a efeito anti-apoptótico em linhagens de rabdomyosarcoma humano *in vitro*.<sup>6</sup> Mais recentemente, foi identificado que o tratamento de linhagens de células de Sarcoma de Ewing com inibidores de Trk, diminuiu sua proliferação, e otimizou o uso de drogas citotóxicas já utilizadas na quimioterapia, mesmo em células quimiorresistentes<sup>14</sup>.

Até o presente estudo, pouco se sabe sobre o papel das NT na patogênese do osteossarcoma. Em artigo recente publicado e realizado em animais (osteossarcoma em cães) associaram TrkA e seu ligante NGF a osteossarcoma e provável atividade anti-apoptótica nas células tumorais<sup>17</sup>. Mais recentemente ainda, *Bianchi et al* identificaram a presença de NT e seus receptores em amostras não especificadas de osteossarcoma, sem associá-las a fatores prognósticos ou outras variáveis<sup>16</sup>. Essa é uma área extremamente promissora, e diversas evidências já demonstraram a importância do papel das NT na patogênese de diversos tumores malignos, e parece ser importante também no osteossarcoma. Por isso, é de extrema importância a tentativa de identificarmos possíveis novos alvos para terapias específicas e desenvolvimento de novas drogas, no futuro.

## **HIPÓTESES**

### **NULA**

Não há expressão de neurotrofinas (NGF e BDNF) e seus receptores específicos (TrkA e TrkB) em amostras de tumores de pacientes com osteossarcoma.

### **VERDADEIRA**

Há expressão de neurotrofinas (NGF e BDNF) e seus receptores específicos (TrkA e TrkB) em amostras de tumores de pacientes com osteossarcoma.

## **OBJETIVOS**

### **PRINCIPAL**

Analisar a expressão de neurotrofinas (NGF e BDNF) e seus receptores específicos (TrkA e TrkB) em amostras de tumores de pacientes com osteossarcoma.

### **SECUNDÁRIO**

Relacionar a expressão das neurotrofinas (NGF e BDNF) e seus receptores específicos (TrkA e TrkB) com variáveis epidemiológicas e de prognóstico nos pacientes com osteossarcoma.

## REFERÊNCIAS

1. Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Immunohistochemical expression of vegf and her-2 proteins in osteosarcoma biopsies. *Acta Ortop Bras.* 2013;21(4):233-8.
2. Petrilli AS, Brunetto AL, Cypriano Mdos S, Ferraro AA, Donato Macedo CR, Senerchia AA, et al. Fifteen Years' Experience of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG): A Contribution from an Emerging Country. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2013;2(4):145-52.
3. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1161-8.
4. Asaumi K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H, Takigawa M. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone.* 2000;26(6):625-33.
5. Grills BL, Schuijers JA. Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(4):415-9.
6. Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer.* 2001;37(13):1719-25.
7. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.* 2002;62(22):6756-63.
8. Lin CY, Wang SW, Chen YL, Chou WY, Lin TY, Chen WC, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by suppressing miR-624-3p in human chondrosarcoma cells. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e2964.
9. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995;55(8):1798-806.
10. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):689-96.

11. Yue XJ, Xu LB, Zhu MS, Zhang R, Liu C. Over-expression of nerve growth factor-beta in human cholangiocarcinoma QBC939 cells promote tumor progression. *PLoS One*. 2013;8(4):e62024.
12. Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, Takiguchi S, Yasuda T, Miyata H, et al. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*. 2008;75(1-2):17-26.
13. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(22):6462-6.
14. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860-80.
15. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Forni C, Zavatta M, Versari M, et al. High-grade osteosarcoma of the extremity: differences between localized and metastatic tumors at presentation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24(1):27-30.
16. Bianchi E, Artico M, Di Cristofano C, Leopizzi M, Taurone S, Pucci M, et al. Growth factors, their receptor expression and markers for proliferation of endothelial and neoplastic cells in human osteosarcoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):621-32.
17. Fan TM, Barger AM, Sprandel IT, Fredrickson RL. Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med*. 2008;22(5):1181-8.
18. Friebele JC, Peck J, Pan X, Abdel-Rasoul M, Mayerson JL. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2015;44(12):547-53.
19. Longhi A, Pasini E, Bertoni F, Pignotti E, Ferrari C, Bacci G. Twenty-year follow-up of osteosarcoma of the extremity treated with adjuvant chemotherapy. *J Chemother*. 2004;16(6):582-8.
20. Bacci G, Ferrari S, Lari S, Mercuri M, Donati D, Longhi A, et al. Osteosarcoma of the limb. Amputation or limb salvage in patients treated by neoadjuvant chemotherapy. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(1):88-92.
21. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, et al. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol*. 2000;18(24):4016-27.
22. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant

chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2006;106(5):1154-61.

23. Cohen IJ, Kaplinsky C, Katz K, Mor C, Goshen Y, Yaniv Y, et al. Improved results in osteogenic sarcoma 1973-79 vs. 1980-86: analysis of results from a single center. *Isr J Med Sci*. 1993;29(1):27-9.

24. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531-43.

25. Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleiner ES, Betcher D, Bernstein ML, et al. Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):2004-11.

26. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol*. 2003;21(10):2011-8.

27. Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol*. 2003;14(7):1126-34.

28. Marko TA, Diessner BJ, Spector LG. Prevalence of Metastasis at Diagnosis of Osteosarcoma: An International Comparison. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(6):1006-11.

29. Thompson RC, Jr., Cheng EY, Clohisy DR, Perentesis J, Manivel C, Le CT. Results of treatment for metastatic osteosarcoma with neoadjuvant chemotherapy and surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2002(397):240-7.

30. Kim W, Han I, Lee JS, Cho HS, Park JW, Kim HS. Postmetastasis survival in high-grade extremity osteosarcoma: A retrospective analysis of prognostic factors in 126 patients. *J Surg Oncol*. 2018;117(6):1223-31.

31. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):572-7.

32. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2490-6.

33. Hattersley G, Chambers TJ. Effects of transforming growth factor beta 1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J Bone Miner Res.* 1991;6(2):165-72.
34. Kloen P, Jennings CL, Gebhardt MC, Springfield DS, Mankin HJ. Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors, TGF-beta 1 and TGF-beta 2 production and autocrine growth control in osteosarcoma cells. *Int J Cancer.* 1994;58(3):440-5.
35. Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, et al. Expression of transforming growth factor beta isoforms in osteosarcoma variants: association of TGF beta 1 with high-grade osteosarcomas. *J Pathol.* 1998;185(3):284-9.
36. Ibanez CF. Neurotrophic factors: from structure-function studies to designing effective therapeutics. *Trends Biotechnol.* 1995;13(6):217-27.
37. Kilian O, Hartmann S, Dongowski N, Karnati S, Baumgart-Vogt E, Hartel FV, et al. BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing. *Ann Anat.* 2014;196(5):286-95.
38. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1473):1545-64.
39. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994;14(1):759-67.
40. Svensson T, Ryden M, Schilling FH, Dominici C, Sehgal R, Ibanez CF, et al. Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1997;33(12):2058-63.
41. Ryden M, Sehgal R, Dominici C, Schilling FH, Ibanez CF, Kogner P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumour stage and good prognosis. *Br J Cancer.* 1996;74(5):773-9.
42. McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(8):4540-5.

## **Expressão de neurotrofinas e de seus receptores no osteossarcoma primário.**

### **Expression of neurotrophins and their receptors in primary osteosarcoma.**

Bruno Pereira Antunes<sup>1,2</sup>; Ricardo Gehrke Becker<sup>1-3</sup>; André Tesainer Brunetto<sup>3</sup>; Bruno Silveira Pavei<sup>1</sup>; Caroline Brunetto de-Farias<sup>3</sup>; Luís Fernando da Rosa Rivero<sup>4</sup>; Julie Francine Cerutti Santos<sup>3</sup>; Bruna Medeiros de-Oliveira<sup>3</sup>; Lauro José Gregianin<sup>3,5</sup>; Rafael Roesler<sup>3,6,7</sup>; Algemir Lunardi Brunetto<sup>3</sup>; Fernando Pagnussato<sup>8</sup>; Carlos Roberto Galia<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Hospital Moinhos de Vento, Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto do Câncer Infantil (ICI), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>6</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Câncer e Neurobiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>7</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Farmacologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>8</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Banco de Multitecidos, Porto Alegre, RS, Brasil.

## RESUMO

**Objetivo:** determinar a expressão de neurotrofinas e seus receptores tirosinoquinases em pacientes com osteossarcoma (OS) e sua correlação com desfechos clínicos.

**Métodos:** biópsias de tumores primários de pacientes com OS tratados em uma única instituição, consecutivamente, entre 2002 e 2015, foram analisados através de imuno-histoquímica para expressão de receptores de tirosina quinase A e B (TrKA e TrKB), fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). De forma independente, dois patologistas classificaram os marcadores de imuno-histoquímica como negativos (negativos e focais fracos) ou positivos (moderado focal/difuso ou forte focal/difuso).

**Resultados:** Foram analisados dados de 19 pacientes (10 do sexo feminino e 9 do masculino) com mediana de idade de 12 anos (5 a 17,3 anos). Dos tumores, 83,3% estavam localizados em membros inferiores e 63,2% dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico. A sobrevida global em cinco anos foi de 55,3%. BDNF foi positivo em 16 pacientes (84%) e NGF em 14 pacientes (73%). TrKA e TrKB apresentaram coloração positiva em quatro (21%) e oito (42%) pacientes, respectivamente. A análise de sobrevida não demonstrou diferença significativa entre receptores TrK e neurotrofinas.

**Conclusão:** amostras de OS primário expressam neurotrofinas e receptores TrK através de imuno-histoquímica. Estudos futuros podem auxiliar na identificação do papel das mesmas na patogênese do OS e determinar se há possível correlação prognóstica.

**Descritores:** Osteossarcoma. Fatores de Crescimento Neural. Fator

## INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno encontrado preferencialmente em indivíduos entre dez e 25 anos de idade. Ao diagnóstico, até 30% dos pacientes apresentam metástases, o que é considerado o principal fator relacionado ao prognóstico. O desenvolvimento de quimioterapia em altas doses aumentou a sobrevida consideravelmente. No entanto, desde o início dos anos 2000, esta opção terapêutica atingiu seu platô. De modo geral, não houve progresso significativo quanto ao tratamento do OS durante este período<sup>1-6</sup>. Conseqüentemente, a procura por terapias baseadas no perfil molecular do tumor tem crescido consideravelmente<sup>7</sup>.

Neurotrofinas e seus receptores de tirosina quinase (Trk) são responsáveis pela modulação sináptica do sistema nervoso central. Estudos recentes têm demonstrado em amostras de sarcomas, a expressão do receptor TrkA e do seu ligante, fator de crescimento nervoso (NGF), que tem sido usado como um potencial marcador de prognóstico e tratamento. O aumento da expressão de NGF pode eventualmente estar associado com o estágio tumoral e risco de metástases em certas neoplasias. A sinalização de TrkA tem também sido descrita como promotora de atividade mitótica e antiapoptótica em osteoblastos de diferentes linhagens celulares<sup>8-10</sup>.

O receptor de Trk B (TrkB) apresenta afinidade pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O aumento da expressão do BDNF tem demonstrado estar intimamente relacionado à viabilidade tumoral, migração e invasão de tecidos saudáveis em diversas malignidades. Amostras de

leiomiossarcoma uterino humano tem demonstrado expressão de BDNF e TrkB, e o aumento da expressão de TrkB e de seus ligantes nesta neoplasia mesenquimal tem sido associados com resistência a múltiplos agentes quimioterápicos. O aumento da expressão de TrkB e seus ligantes também tem sido associado a desfechos clínicos desfavoráveis em alguns tumores de origem neuroectodérmica<sup>11-18</sup>.

OS é um tumor ósseo de origem mesenquimal que pode compartilhar algumas características comuns a outros sarcomas e tumores que metastatizam para os ossos. Estudos correlacionando OS com TrkA, TrkB e neurotrofinas (NGF e BDNF) são raros<sup>7</sup> e ainda não incluem seres humanos. No presente estudo, analisamos a expressão de TrkA, TrkB e seus ligantes (NGF e BDNF) em amostras de tumores de pacientes com OS.

## **MÉTODOS**

### **Pacientes e amostras histológicas**

O estudo foi aprovado e registrado pelo conselho de revisão institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através do Escritório de Pesquisa e Pós-Graduação (IRB no 00000921) com o número de referência 15-0499.

Os participantes elegíveis foram todos os pacientes com OS tratados em uma única instituição de acordo com as diretrizes do Grupo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma (BOTG) e do Grupo Latino-Americano de Tratamento de Osteossarcoma (GLATO) em dois protocolos de tratamento consecutivos (BOTG V, GCBTO 2006) entre 2002 e 2015. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido previamente à sua inclusão nos protocolos BOTG V e GCBTO de 2006<sup>3,19</sup>.

Pacientes sem tratamento prévio, metastáticos ou não, que tiveram suas biópsias analisadas no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foram incluídos no estudo. Detalhes dos regimes quimioterápicos foram publicados anteriormente<sup>3,19</sup>. Os critérios de exclusão foram presença de material insuficiente para a realização dos testes imuno-histoquímicos e não ser incluído no protocolo de tratamento citado.

Todos os pacientes incluídos tiveram suas biópsias analisadas por imuno-histoquímica para os seguintes marcadores tumorais: BDNF, NGF, TrkA e TrkB.

Informações médicas e cirúrgicas foram extraídas dos registros médicos dos pacientes. O grau de necrose tumoral foi graduado de acordo com a classificação Huvos-Ayala<sup>20</sup>.

### **Imuno-histoquímica**

Todas as amostras foram fixadas em formalina e embabidas em parafina, cortadas em lâminas de 4- $\mu$ m de espessura, incubadas e re-hidratadas em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em um forno de micro-ondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas em peróxido de hidrogênio, e os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com soro normal. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, com uma diluição de 1:50, por 12 horas a 4°C, depois foram imunomarcadas com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e coradas com tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB Kit, Dako). Os anticorpos primários foram anti- NGF policlonal de coelho (sc-33603; Biotecnologia Santa Cruz), anti-BDNF (sc-20981, Biotecnologia Santa Cruz), TrkB policlonal de camundongo (sc-377218, Biotecnologia Santa Cruz) e anti-

TrkA policlonal de cabra (sc-20539, Santa Cruz Biotechnology).

As lâminas foram avaliadas independentemente por dois especialistas em patologia cirúrgica e imuno-histoquímica para a expressão de NGF, BDNF, TrkB e TrkA. Em caso de discordância entre os patologistas, as lâminas eram revisadas em conjunto até o consenso ser alcançado. A coloração imuno-histoquímica foi pontuada de acordo com a intensidade em uma escala de 0 a 3, onde 0 indica ausência de coloração (negativa); 1, coloração fraca; 2, coloração moderada; e 3, coloração forte. Com relação à porcentagem de células imuno positivas, 1 indicava menos de 10% das células coradas (focal) e 2 indicava mais de 10% das células coradas (difusas). Os pacientes foram divididos em dois grupos: negativo (ausência de expressão ou reação de intensidade fraca) e positivo (reação de intensidade moderada ou forte com expressão focal ou difusa).

### **Estatística**

As variáveis foram expressas em frequências absolutas e relativas, com exceção da idade, expressa em média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student para idade e pelo teste exato de Fisher para todas as outras variáveis. O teste log-rank foi utilizado para comparar as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença, estimadas pelo método de Kaplan-Meier. Um  $P=0,05$  foi considerado significativo. Os dados foram analisados no SPSS versão 18.0 e no Epi Info.

## **RESULTADOS**

### **Características e marcadores dos pacientes**

De um total de 28 pacientes tratados por OS nesse serviço, foram

excluídos quatro por amostra insuficiente ou indisponível para realização do estudo imuno-histoquímico e cinco que não entraram no protocolo do BOTG V e GCBTO 2006 (por escolha do oncologista, do paciente ou condições clínicas que impossibilitassem realizar o tratamento). Os pacientes que apresentaram má resposta à quimioterapia e necessitaram trocar a linha de tratamento durante o estudo não foram descartados. Analisamos, portanto, os dados de 19 pacientes (9 homens e 10 mulheres; com uma média de idade de 12 anos) de uma única instituição que foram incluídos nos estudos BOTG V e GCBTO 2006. As características da amostra foram salientadas na tabela 1.

A mediana de idade foi de 12 anos (variação de 5 a 17,3 anos) e o tempo médio de acompanhamento foi de 2,7 anos (amplitude de variação de 0,6 a 14 anos). Quinze tumores (78,9%) localizavam-se nas extremidades inferiores, dois (10,5%) nas extremidades superiores, um (5,3%) na pelve e um (5,3%) não teve registro de localização. Doze (63,2%) pacientes eram metastáticos e sete (36,8%) tinham tumor localizado. O principal sítio metastático foi o pulmão (83%), seguido por ossos (17%). A resposta à quimioterapia foi ruim em cinco pacientes, boa em seis e não registrada em oito pacientes. Quatro (21,1%) pacientes apresentaram progressão de doença, sendo dois locais e duas recorrências sistêmicas. Dos 19 pacientes, 17 foram operados, dos quais nove (52,9%) submetidos a procedimentos que permitiram a conservação do membro e oito (47,1%) à amputação.

O BDNF foi considerado positivo em 16 (84,2%) pacientes, enquanto o NGF foi positivo em 14 (73,7%) (Figura 1). Por outro lado, TrkA e TrkB foram mais frequentemente negativos do que positivos, apresentando quatro (21%) e oito (42%) casos de coloração positiva, respectivamente, dentre os 19

pacientes (Figura 2). Houve diferença significativa entre os marcadores positivos e negativos da amostra ( $P < 0,001$ ) (Tabela 2).

### **Análise global**

A sobrevida global em cinco anos para todos os 19 pacientes foi de 55,3%. A sobrevida acumulada em cinco anos foi de 40% para doença metastática e 60% para doença localizada (Relação de risco [RR]=2,04;  $P=0,39$ ). Apesar de não significativa, a sobrevida acumulada em cinco anos foi de apenas 25% (hazard ratio [HR]=3,02) para pacientes com recidiva da doença, sendo de 72,5% para pacientes sem recidiva ( $P=0,17$ ).

### **Análise imuno-histoquímica**

A sobrevida cumulativa de cinco anos foi maior nos pacientes que apresentaram coloração positiva para BDNF e NGF do que para aqueles com coloração negativa (61,3 vs. 33,3%; 66,7 vs. 33,3, respectivamente). A relação de risco (RR) para pacientes com coloração positiva para BDNF e NGF foi de 0,51 (intervalo de confiança de 95% [IC 95%]: 0,09-2,8), 0,69 (IC 95%: 0,13-3,81), respectivamente. No entanto, a sobrevida foi maior em pacientes com coloração negativa para TrkA e TrkB do que para aqueles com coloração positiva (58,2 versus 37,5%; 56,3 versus 54,7%, respectivamente). Não houve diferença significativa entre neurotrofina e receptores Trk na análise de sobrevivência. A RR para pacientes com coloração positiva para TrkA e TrkB foi de 3,48 (IC 95%: 0,62 a 19,70) e 1,84 (IC 95%: 0,37 a 9,20), respectivamente. Tanto o receptor TrkA quanto as características de recorrência foram submetidos à análise ajustada ao risco, pois o valor de P foi menor que 20%; entretanto, nenhum deles apresentou diferenças estatisticamente significantes associadas ao risco de morte (Tabela 3).

Apesar da conhecida afinidade entre TrkA e NGF, os tumores coraram positivamente para ambos os marcadores apenas em três (15,7%) casos, e negativos para ambos os marcadores em quatro (21%). Com relação à ligação TrkB-BDNF, os tumores coraram positivamente para ambos os marcadores em oito (42,1%) casos e negativos para ambos os marcadores em três (15,7%). As combinações entre ligação positiva de TrkA-NGF, ligação negativa de TrkA-NGF, ligação positiva de TrkB-BDNF e ligação negativa de TrkB-BDNF não foram significativamente associadas à sobrevivência.

## **DISCUSSÃO**

Este é o primeiro estudo a avaliar a expressão de neurotrofinas e seus receptores Trk em OS primários em humanos. Nós encontramos coloração positiva por imuno-histoquímica para BDNF, NGF, TrkA e TrkB em 19 amostras de tumores de pacientes com OS tratados em uma única instituição dentro dos ensaios BOTG V e GCBTO 2006 conduzidos por Petrilli et al.<sup>3,19</sup>. Além disso, o grupo analisado apresentou características semelhantes às relatadas nos estudos BOTG V e GCBTO 2006, com alta prevalência de metástase e taxa de sobrevida de aproximadamente 55%<sup>19</sup>. As taxas de sobrevida em relação à presença de metástases, recidiva e sexo (masculino), seguiram o padrão e valores aproximados aos já constatados em outros estudos, apesar de não se mostrarem estatisticamente significativos (provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra)<sup>3,19</sup>. Da mesma forma, a expressão dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica não foi significativamente associada à sobrevida, presença de metástases, recorrência ou resposta à quimioterapia. Porém houve tendência de associação entre sobrevida, recidiva e presença de

TrkA positivo ( $p < 0.20$ ).

Embora a ligação TrkA-NGF esteja frequentemente presente no reparo e proliferação do tecido ósseo, estudos que investigam essas proteínas em células de OS são raros. Um estudo em células caninas de OS demonstrou que o bloqueio in vitro da ligação TrkA-NGF pode induzir apoptose e inibir a proliferação celular. Além disso, os receptores TrkA foram identificados em tumores primários e metástases pulmonares<sup>7</sup>. Encontramos coloração positiva para TrkA em 21% dos casos e para o seu ligante NGF em 73%. Nosso estudo sugere uma menor sobrevida com expressão positiva de TrkA quando comparada a expressão negativa (37% versus 58% em cinco anos, respectivamente). Ao analisar as amostras de NGF, observou-se maior sobrevida em pacientes sem expressão de NGF (66% versus 33% aos cinco anos, respectivamente). Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, talvez devido ao tamanho da amostra, a ligação de TrkA-NGF pode ter um papel potencial no prognóstico de OS.

A sinalização do TrkB, através do seu ligante BDNF, tem sido relacionada ao prognóstico de certas malignidades. No neuroblastoma, a presença de BDNF e TrkB demonstrou maior resistência à quimioterapia e agressividade do tumor local. Da mesma forma, em casos de leiomiossarcoma uterino, ensaios in vitro indicam que a sinalização endógena da via TrkB está associada ao crescimento do tumor. Consequentemente, o TrkB e o BDNF foram investigados em maior detalhe devido à sua possível relevância como alvos para a terapia antineoplásica<sup>17,18,21-28</sup>.

No presente estudo, TrkB e BDNF foram expressos em 42% e 84% das amostras de OS, respectivamente. Entre os pacientes positivos para TrkB,

80% tiveram uma baixa taxa de necrose e 25% apresentaram recidiva do tumor. Entre os pacientes negativos para TrkB, apenas 16% tiveram uma baixa taxa de necrose e 18% apresentaram recorrência do OS. Os pacientes positivos para TrkB tendem a mostrar menor sobrevida do que os pacientes com coloração negativa, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $P=0,44$ ). Por outro lado, os pacientes com células que expressam BDNF apresentaram maior taxa de necrose, apresentaram menor frequência de metástases e maior sobrevida do que aqueles com coloração negativa ( $P=0,42$ ). Mais estudos são necessários para investigar se o BDNF-TrkB desempenha um papel na patogênese do OS.

Os dados na literatura sobre a expressão dos receptores de neurotrofina e Trk são muito limitados e, até onde sabemos, somos os primeiros a relatar a expressão desses receptores em amostras de OS em humanos. Nossos achados mostraram uma prevalência considerável desses marcadores. Acreditamos que estudos com amostras maiores e estudos moleculares associados, bem como, a estratificação de pacientes por critérios de morbidade, possam contribuir para um melhor uso desses marcadores em pacientes com OS.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Instituto do Câncer Infantil (ICI-RS), ao Fundo de Pesquisa e Promoção de Eventos (FIPE/HCPA) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo apoio contínuo

## **REFERÊNCIAS**

1. Sarman H, Bayram R, Benek SB. Anticancer drugs with

chemotherapeutic interactions with thymoquinone in osteosarcoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(7):1263-70.

2. Robl B, Botter SM, Pellegrini G, Neklyudova O, Fuchs B. Evaluation of intraarterial and intravenous cisplatin chemotherapy in the treatment of metastatic osteosarcoma using an orthotopic xenograft mouse model. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):1-14.

3. Petrilli AS, de Camargo B, Odone Filho V, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1161-8.

4. Liu MH, Cui YH, Guo QN, Zhou Y. Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1431-40.

5. Ram Kumar RM, Boro A, Fuchs B. Involvement and clinical aspects of MicroRNA in osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):877.

6. Ding L, Congwei L, Bei Q, Tao Y, Ruiguo W, Heze Y, et al. mTOR: an attractive therapeutic target for osteosarcoma? *Oncotarget.* 2016;7(31):50805-13.

7. Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Immunohistochemical expression of vegf and her-2 proteins in osteosarcoma biopsies. *Acta Ortop Bras.* 2013;21(4):233-8.

8. Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, et al. NGF- induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget.* 2015;6(12):9807-19.

9. Yue XJ, Xu LB, Zhu MS, Zhang R, Liu C. Over-expression of nerve

growth factor- $\beta$  in human cholangiocarcinoma QBC939 cells promote tumor progression. *PLoS One*. 2013;8(4):e62024.

10. Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*. 2001;37(13):1719-25.

11. Cameron HL, Foster WG. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. *PLoS One*. 2009;4(1):e4303.

12. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(2):149-57.

13. Pinski J, Weeraratna A, Uzgare AR, Arnold JT, Denmeade SR, Isaacs JT. Trk receptor inhibition induces apoptosis of proliferating but not quiescent human osteoblasts. *Cancer Res*. 2002;62(4):986-9.

14. Jin W, Yun C, Kim HS, Kim SJ. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res*. 2007;67(20):9869-77.

15. Martens LK, Kirschner KM, Warnecke C, Scholz H. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14379-88.

16. Lin CY, Chen HJ, Li TM, Fong YC, Liu SC, Chen PC, et al.  $\beta$ 5 integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma. *PLoS One*. 2013;8(7):e67990.

17. Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y. Inhibition of uterine sarcoma cell growth through suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling. *PLoS One*. 2012;7(7):e41049.

18. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860-80.
19. Petrilli AS, Brunetto AL, Cypriano Mdos S, Ferraro AA, Donato Macedo CR, Senerchia AA, et al. Fifteen Years' Experience of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG): A Contribution from an Emerging Country. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2013;2(4):145-52.
20. Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
21. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):689-96.
22. Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, Takiguchi S, Yasuda T, Miyata H, et al. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*. 2008;75(1-2):17-26.
23. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(7-8):755-9.
24. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(22):6462-6.
25. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 2002;62(22):6756-63.

26. Li Z, Jaboin J, Dennis PA, Thiele CJ. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.* 2005;65(6):2070-5.

27. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain- derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995;55(8):1798-806.

28. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994;14(1):759-67.

**Recebido em:** 21/12/2018

**Aceito para publicação em:** 05/02/2019

**Conflito de interesse:** nenhum.

**Fonte de financiamento:** Bruno Pereira Antunes, Ricardo Gehrke Becker e Carlos Roberto Galia foram apoiados pelo Fundo de Pesquisa e Promoção de Eventos (FIPE/HCPA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (outorga no 15-0499).

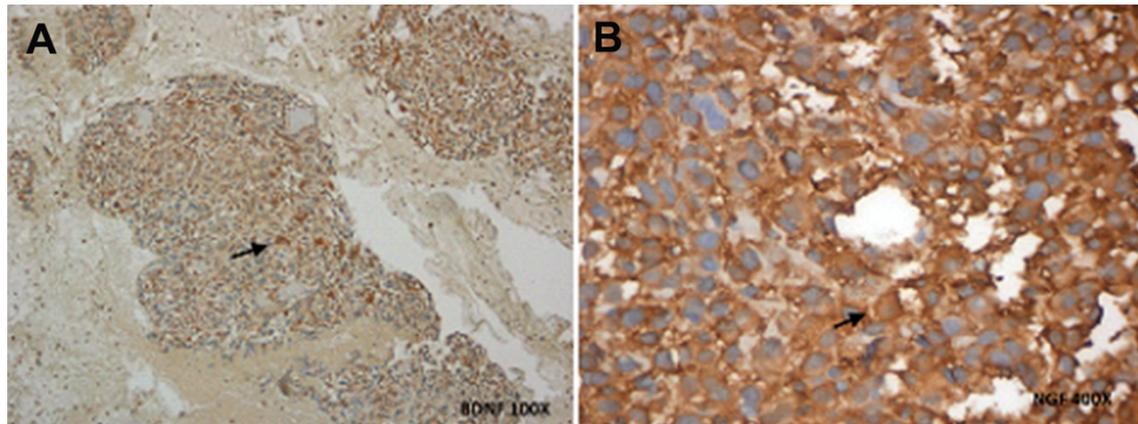
**Endereço para correspondência:**

Ricardo Gehrke Becker - e-mail: [rbecker@hcpa.edu.br](mailto:rbecker@hcpa.edu.br)

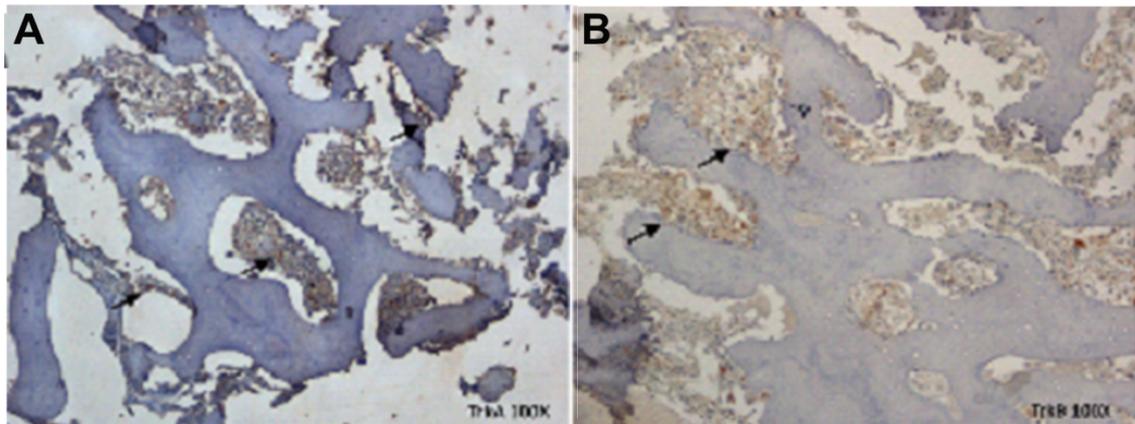
## ANEXOS

### FIGURAS

**Figura 1.** Expressão de BDNF 100x (A) e NGF 400x (B) em células de osteossarcoma. Setas indicam células coradas.



**Figura 2.** Expressão de TrkA (A) e TrkB (B) em células de osteossarcoma (100x). Setas indicam células coradas.



## TABELAS

**Tabela 1.** *Características da amostra.*

| <b>Variáveis</b>                              | <b>N = 19</b>              |
|---|----------------------------|
| Idade (anos), média ( $\pm$ DP) [mín. – máx.] | 12,0 ( $\pm$ 3,6) [5–17,3] |
| Sexo, N (%)                                   |                            |
| Masculino                                     | 9 (47,4)                   |
| Feminino                                      | 10 (52,6)                  |
| Metástase, N (%)                              |                            |
| Não   | 12 (63,2)                  |
| Sim   | 7 (36,8)                   |
| Huvos-Ayala, N (%)                            |                            |
| < 90%   | 5/11 (45,5)                |
| $\geq$ 90%                                    | 6/11 (54,5)                |
| Recidiva, N (%)                               |                            |
| Não   | 15 (78,9)                  |
| Sim   | 4 (21,1)                   |

*N = número da amostra; DP= desvio padrão.*

**Tabela 2.** *Dados sobre os marcadores imuno-histoquímicos*

| <b>Variáveis</b>        | <b>N = 19</b> |
|-------------------------|---------------|
| <hr/>                   |               |
| BDNF, N (%)             |               |
| Negativo e focal fraco  | 3 (15,8)      |
| Positivo, fraco e forte | 16 (84,2)     |
| NGF, N (%)              |               |
| Negativo e focal fraco  | 5 (26,3)      |
| Positivo, fraco e forte | 14 (73,7)     |
| TrkA, N (%)             |               |
| Negativo e focal fraco  | 15 (78,9)     |
| Positivo, fraco e forte | 4 (21,1)      |
| TrkB, N (%)             |               |
| Negativo e focal fraco  | 11 (57,9)     |
| Positivo, fraco e forte | 8 (42,1)      |

*Houve uma diferença significativa na positividade entre os marcadores ( $P < 0,001$ ).*

*N = número da amostra; BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; NGF = fator de crescimento nervoso; TrkA = receptor de tirosina quinase A; TrkB = receptor de tirosina quinase B.*

**Tabela 3. Análise univariada**

| Variáveis               | Morte  |                  |       |
|-------------------------|--------|------------------|-------|
|                         | 5 anos | RR (IC 95%)      | P     |
| Todos os pacientes (N)  | 55,3%  | -                | -     |
| Idade (anos)            | -      | 0,98 (0,74–1,30) | 0,889 |
| Sexo                    |        |                  |       |
| Masculino               | 30,0%  | 1,45 (0,29–7,24) | 0,648 |
| Feminino                | 68,6%  | 1,00             |       |
| Metástase               |        |                  |       |
| Não                     | 66,0%  | 1,00             |       |
| Sim                     | 40,0%  | 2,04 (0,40-105)  | 0,392 |
| Huvos-Ayala             |        |                  |       |
| < 90%                   | 40,0%  | *                | 0,427 |
| ≥ 90%                   | 75,0%  | 1,00             |       |
| Recidiva                |        |                  |       |
| Não                     | 72,2%  | 1,00             |       |
| Sim                     | 25,0%  | 3,02 (0,60–15,1) | 0,178 |
| BDNF                    |        |                  |       |
| Negativo e focal fraco  | 33,3%  | 1,00             |       |
| Positivo, fraco e forte | 61,3%  | 0,51 (0,09–2,80) | 0,436 |
| NGF                     |        |                  |       |
| Negativo e focal fraco  | 33,3%  | 1,00             |       |
| Positivo, fraco e forte | 66,7%  | 0,69 (0,13–3,81) | 0,669 |
| TrkA                    |        |                  |       |
| Negativo e focal fraco  | 58,2%  | 1,00             |       |

|                         |       |                   |       |
|-------------------------|-------|-------------------|-------|
| Positivo, fraco e forte | 37,5% | 3,48 (0,62–19,70) | 0,158 |
| TrkB                    |       |                   |       |
| Negativo e focal fraco  | 56,3% | 1,00              |       |
| Positivo, fraco e forte | 54,7% | 1,84 (0,37–9,20)  | 0,457 |

---

*\* O risco não pôde ser estimado devido ao pequeno tamanho da amostra.*

*N = número da amostra; BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; RR = relação de risco; IC 95%= intervalo de confiança de 95%; NGF = fator de crescimento nervoso; TrkA = receptor de tirosina quinase A; TrkB = receptor de tirosina quinase B.*

## **Expression of neurotrophins and their receptors in primary osteosarcoma.**

### **Expressão de neurotrofinas e de seus receptores no osteossarcoma primário.**

Bruno Pereira Antunes<sup>1,2</sup>; Ricardo Gehrke Becker<sup>1-3</sup>; André Tesainer Brunetto<sup>3</sup>; Bruno Silveira Pavei<sup>1</sup>; Caroline Brunetto de-Farias<sup>3</sup>; Luís Fernando da Rosa Rivero<sup>4</sup>; Julie Francine Cerutti Santos<sup>3</sup>; Bruna Medeiros de-Oliveira<sup>3</sup>; Lauro José Gregianin<sup>3,5</sup>; Rafael Roesler<sup>3,6,7</sup>; Algemir Lunardi Brunetto<sup>3</sup>; Fernando Pagnussato<sup>8</sup>; Carlos Roberto Galia<sup>1,2</sup>.

1. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Orthopedics and Traumatology Service, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Hospital Moinhos de Vento, Orthopedics and Traumatology Service, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Instituto do Câncer Infantil (ICI), Porto Alegre, RS, Brazil.

4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Pathology Service, Porto Alegre, RS, Brazil.

5. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Porto Alegre, RS, Brazil.

6. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Center for Experimental Research, Laboratory of Cancer and Neurobiology, Porto Alegre, RS, Brazil.

7. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Department of Pharmacology, Porto Alegre, RS, Brazil.

8. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Multi-tissue Bank, Porto Alegre, RS, Brazil.

## ABSTRACT

**Objective:** to determine the expression of neurotrophins and their tyrosine-kinase receptors in patients with osteosarcoma (OS) and their correlation with clinical outcomes. **Methods:** we applied immunohistochemistry to biopsy specimens of patients consecutively treated for primary OS at a single institution between 2002 and 2015, analyzing them for expression receptors of tyrosine kinase A and B (TrKA and TrKB), neural growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). Independently, two pathologists classified the immunohistochemical markers as negative (negative or weak focal) or positive (moderate focal/diffuse or strong focal/diffuse). **Results:** we analyzed data from 19 patients (10 females and 9 males), with median age of 12 years (5 to 17.3). Tumors' location were 83.3% in the lower limbs, and 63.2% of patients had metastases at diagnosis. Five-year overall survival was 55.3%. BDNF was positive in 16 patients (84%) and NGF in 14 (73%). TrKA and TrKB presented positive staining in four (21%) and eight (42%) patients, respectively. Survival analysis showed no significant difference between TrK receptors and neurotrophins. **Conclusion:** primary OS samples express neurotrophins and TrK receptors by immunohistochemistry. Future studies should explore their role in OS pathogenesis and determine their prognostic significance in larger cohorts.

**Keywords:** Osteosarcoma. Nerve Growth Factors. Brain-Derived Neurotrophic Factor. Receptor, trkA. Receptor, trkB.

## INTRODUCTION

Osteosarcoma (OS) is a malignant bone tumor found preferentially in individuals between ten and 25 years old. At diagnosis, up to 30% of patients have metastases, considered the main prognostic factor. The development of chemotherapy at high doses increased survival considerably. However, since the early 2000s, this therapeutic option has reached its plateau. Overall, there was no significant progress in OS treatment during this period<sup>1-6</sup>. Consequently, the search for therapies based on the molecular profile of the tumor has grown considerably<sup>7</sup>.

Neurotrophins and their tyrosine kinase receptors (Trk) are responsible for synaptic modulation of the central nervous system. Recent studies with sarcoma samples have demonstrated the expression of the TrkA receptor and its ligand, nerve growth factor (NGF), seen as a potential marker of prognosis and treatment. Increased NGF expression may possibly be associated with the tumor stage and risk of metastases in certain neoplasms. TrkA signaling has also been described as a promoter of mitotic and anti- apoptotic activity in osteoblasts of different cell lines<sup>8-10</sup>.

The Trk B receptor (TrkB) has affinity for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Increased BDNF expression is closely related to tumor viability, migration and invasion of healthy tissues in various malignancies. Different samples of human uterine leiomyosarcoma have demonstrated expression of BDNF and TrkB, and increased expression of TrkB and its ligands in this mesenchymal neoplasm has been associated with resistance to multiple chemotherapeutic agents. Increased expression of TrkB and its ligands has

also been associated with unfavorable clinical outcomes in some tumors of neuroectodermal origin<sup>11-18</sup>.

OS is a bone tumor of mesenchymal origin that may share some features with other sarcomas and tumors that metastasize to the bones. Studies correlating OS with TrkA, TrkB and neurotrophins (NGF and BDNF) are rare<sup>7</sup> and not include humans. In the present study, we analyzed the expression of TrkA, TrkB and its ligands (NGF and BDNF) in OS tumor samples from.

## **METHODS**

### **Patients and histological samples**

The study was approved and registered by the institutional review board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre through the Office of Research and Graduate Studies (IRB no 00000921) under reference number 15-0499.

The eligible participants were all OS patients treated in a single institution in accordance with the Guidelines of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG) and the Latin American Osteosarcoma Treatment Group (GLATO) in two consecutive treatment protocols (BOTG V, GCBTO 2006), between 2002 and 2015. All patients signed an informed consent form prior to their inclusion in the 2006 BOTG V and GCBTO protocols<sup>3,19</sup>.

We included patients without previous treatment, whether metastatic or not, who had their biopsies analyzed in the Department of Pathology of Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Details of the chemotherapeutic regimens were previously published<sup>3,19</sup>. Exclusion criteria were insufficient material for

immunohistochemical tests and not undergoing the aforementioned treatment protocol.

All included patients had their biopsies submitted to immunohistochemistry for the following tumor markers: BDNF, NGF, TrkA and TrkB. We extracted clinical and surgical information from the patients' medical records. We graded tumor necrosis according to the Huvos-Ayala classification<sup>20</sup>.

### **Immunohistochemistry**

All samples were formalin-fixed, paraffin-embedded, cut into 4- $\mu$ m thick slices, incubated and rehydrated in alcohol. Antigen retrieval was performed in a microwave oven. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of the slides in hydrogen peroxide, and non-specific binding sites were blocked with normal serum. The slides were incubated with the primary antibody at a dilution of 1:50 for 12 hours at 4°C, then immunoblotted with the streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB, Dako) and grown with diaminobenzidine tetrachloride (DAB Kit, Dako). The primary antibodies were rabbit polyclonal anti-NGF (sc-33603; Biotechnology Santa Cruz), anti-BDNF (sc-20981, Biotechnology Santa Cruz), mouse polyclonal TrkB (sc-377218, Biotechnology Santa Cruz) and goat polyclonal anti-TrkA (sc-20539, Biotechnology Santa Cruz).

Two specialists in surgical pathology and immunohistochemistry independently evaluated the slides for the expression of NGF, BDNF, TrkB and TrkA. In case of disagreement among the pathologists, they reviewed the slides together until reaching consensus. They scored the immunohistochemical

staining according to the intensity on a scale of 0 to 3, where 0 indicates absence of staining (negative); 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining. Regarding the percentage of immunoreactive cells, 1 indicated less than 10% of stained cells (focal) and 2 indicated more than 10% of stained (diffuse) cells. We divided the patients into two groups: negative and focal weak (negative); moderate focal/diffuse and strong focal/diffuse (positive).

### **Statistics**

We expressed the variables in absolute and relative frequencies, with the exception of age, expressed as mean and standard deviation. We evaluated differences between groups concerning age with the Student's t test, and used the Fisher's exact test for all other variables. We used the log-rank test to compare the overall survival and disease-free survival curves, estimated by the Kaplan-Meier method. We considered  $P=0.05$  as significant. We analyzed the data with SPSS, version 18.0, and Epi Info.

## **RESULTS**

### **Patients' characteristics and markers**

Out of 28 patients treated for OS in the service, we excluded four due to insufficient or unavailable sample to perform the immunohistochemical study, and five that did not undergo the BOTG V and GCBTO 2006 protocol (by choice of the oncologist, of the patient, or due to clinical conditions that prevented the treatment). We did not exclude patients who presented poor response to chemotherapy and required treatment change during the study. We therefore

analyzed data from 19 patients (9 male and 10 female, with mean age 12 years), from a single institution, who underwent the BOTG V and GCBTO 2006 protocols. The characteristics of the sample were highlighted in table 1.

The median age was 12 years (range 5 to 17.3), and the mean follow-up time, 2.7 years (range 0.6 to 14). Fifteen tumors (78.9%) were located in the lower extremities, two (10.5%) in the upper ones, one (5.3%) in the pelvis and one (5.3 %) had no record of location. Twelve (63.2%) patients were metastatic and seven (36.8%) had localized tumor. The main metastatic site were the lungs (83%), followed by bones (17%). The response to chemotherapy was poor in five patients, good in six and not recorded in eight patients. Four (21.1%) patients presented disease progression, with two local and two systemic recurrences. Of the 19 patients, 17 were operated on, of whom nine (52.9%) underwent procedures that allowed preservation of the limb, and eight (47.1%), amputation.

BDNF was positive in 16 (84.2%) patients, while NGF was positive in 14 (73.7%) (Figure 1). On the other hand, TrkA and TrkB were more often negative than positive, presenting four (21%) and eight (42%) cases of positive staining, respectively, (Figure 2). There was a significant difference between the positive and negative markers of the sample ( $P < 0.001$ ) (Table 2).

### **Global analysis**

Overall five-year survival was 55.3%. The five-year survival rate was 40% for metastatic disease and 60 % for localized disease (Relative Risk

[RR]=2.04, P=0.39). Although not significant, the five-year survival rate was only 25% (hazard ratio [HR]=3.02) for patients with disease recurrence, being 72.5% for patients without relapse (P=0.17).

### **Immunohistochemical analysis**

Five-year cumulative survival was greater in patients who presented positive staining for BDNF and NGF than for those with negative staining (61.3 vs. 33.3%, 66.7 vs. 33.3, respectively). The RR for patients with positive staining for BDNF and NGF was 0.51 (95% CI: 0.09-2.8), 0.69 (95% CI: 0.13-3.81), respectively. However, survival was higher in patients with negative staining for TrkA and TrkB than in those with positive staining (58.2 vs. 37.5%; 56.3% vs. 54.7, respectively). There was no significant difference between neurotrophin and Trk receptors in the survival analysis. The RR for patients with positive staining for TrkA and TrkB was 3.48 (95% CI: 0.62-19.70) and 1.84 (95% CI: 0.37-9.20), respectively. We submitted both the TrkA receptor and the recurrence characteristics to risk-adjusted analysis, since the P-value was lower than 20%; however, none of them presented statistically significant differences associated with the risk of death (Table 3).

Despite the known affinity between TrkA and NGF, tumors stained positively for both markers only in three (15.7%) cases, and negative for both markers in four (21%). Regarding the TrkB-BDNF relation, tumors stained positively for both markers in eight (42.1%) cases and negative for both in three (15.7%). Combinations of TrkA-NGF-positive, TrkA-NGF negative, TrkB-BDNF-positive and TrkB-BDNF-negative were not significantly associated with survival.

## DISCUSSION

This is the first study evaluating the expression of neurotrophins and their Trk receptors in primary OS tumors in humans. We found positive staining by immunohistochemistry for BDNF, NGF, TrkA and TrkB in samples from 19 OS patients treated at a single institution within the BOTG V and GCBTO 2006 trials conducted by Petrilli et al.<sup>3,19</sup>. In addition, the studied group presented characteristics similar to those reported in the BOTG V and GCBTO 2006 studies, with a high prevalence of metastasis and a survival rate of approximately 55%<sup>19</sup>. Survival rates for metastases, recurrence, and gender (male) followed the pattern and approximate values found in other studies, although they were not statistically significant (probably due to the small sample size)<sup>3,19</sup>. Likewise, the expression of the markers evaluated by immunohistochemistry was not significantly associated with survival, presence of metastases, recurrence or response to chemotherapy. However, there was a trend of association between survival, recurrence and presence of positive TrkA ( $P < 0.20$ ).

Although a TrkA-NGF relation is frequently present in the repair and proliferation of bone tissue, studies investigating these proteins in OS cells are rare. A study in canine OS cells has shown that in vitro blocking of TrkA-NGF binding can induce apoptosis and inhibit cell proliferation. In addition, TrkA receptors were identified in primary tumors and in pulmonary metastases<sup>7</sup>. We found positive staining for TrkA in 21% of cases and for its NGF ligand in 73%. Our study suggests a lower survival with the positive expression of TrkA when

compared with its negative expression (37% vs. 58% in five years, respectively). When analyzing the NGF samples, we observed greater survival in patients without its expression (66% versus 33% at five years, respectively). Although the results are not statistically significant, perhaps due to sample size, the TrkA-NGF binding may play a potential role in OS prognosis.

Signaling of TrkB, through its ligand BDNF, has been linked to the prognosis of certain malignancies. In neuroblastoma, the presence of BDNF and TrkB demonstrated greater resistance to chemotherapy and aggressiveness of the local tumor. Similarly, in cases of uterine leiomyosarcoma, in vitro assays indicate that endogenous signaling of the TrkB pathway is associated with tumor growth. Consequently, TrkB and BDNF were investigated in greater detail because of their potential relevance as targets for antineoplastic therapy<sup>17,18,21-28</sup>.

In the present study, TrkB and BDNF were present in 42% and 84% of the OS samples, respectively. Among TrkB-positive patients, 80% had a low necrosis rate and 25% had tumor recurrence. Among TrkB-negative patients, only 16% had a low necrosis rate and 18% had OS recurrence. Patients positive for TrkB tended to show lower survival than patients with negative staining, although the difference was not statistically significant ( $P=0.44$ ). On the other hand, patients with BDNF-expressing cells had a higher necrosis rate, a lower frequency of metastases and a higher survival rate than those with negative staining ( $P=0.42$ ). Further studies are needed to investigate whether BDNF-TrkB play a role in the pathogenesis of OS.

Data in the literature on the expression of neurotrophin and Trk receptors are very limited and, to the best of our knowledge, we are the first to report the expression of these receptors on human OS samples. Our findings showed a considerable prevalence of these markers. We believe that studies with larger samples and associated molecular essays, as well as the stratification of patients by morbidity criteria, may contribute to a better use of these markers in patients with OS.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to the Instituto de Câncer Infantil (ICI-RS), the Research and Event Promotion Fund (FIPE/HCPA) and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for their ongoing support.

### **REFERENCES**

1. Sarman H, Bayram R, Benek SB. Anticancer drugs with chemotherapeutic interactions with thymoquinone in osteosarcoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(7):1263-70.
2. Robl B, Botter SM, Pellegrini G, Neklyudova O, Fuchs B. Evaluation of intraarterial and intravenous cisplatin chemotherapy in the treatment of metastatic osteosarcoma using an orthotopic xenograft mouse model. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):1-14.

3. Petrilli AS, de Camargo B, Odone Filho V, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol*. 2006;24(7):1161-8.
4. Liu MH, Cui YH, Guo QN, Zhou Y. Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients. *Am J Cancer Res*. 2016;6(6):1431-40.
5. Ram Kumar RM, Boro A, Fuchs B. Involvement and clinical aspects of MicroRNA in osteosarcoma. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):877.
6. Ding L, Congwei L, Bei Q, Tao Y, Ruiguo W, Heze Y, et al. mTOR: an attractive therapeutic target for osteosarcoma? *Oncotarget*. 2016;7(31):50805-13.
7. Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Immunohistochemical expression of vegf and her-2 proteins in osteosarcoma biopsies. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(4):233-8.
8. Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, et al. NGF- induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget*. 2015;6(12):9807-19.
9. Yue XJ, Xu LB, Zhu MS, Zhang R, Liu C. Over-expression of nerve growth factor- $\beta$  in human cholangiocarcinoma QBC939 cells promote tumor progression. *PLoS One*. 2013;8(4):e62024.

10. Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*. 2001;37(13):1719-25.
11. Cameron HL, Foster WG. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. *PLoS One*. 2009;4(1):e4303.
12. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(2):149-57.
13. Pinski J, Weeraratna A, Uzgare AR, Arnold JT, Denmeade SR, Isaacs JT. Trk receptor inhibition induces apoptosis of proliferating but not quiescent human osteoblasts. *Cancer Res*. 2002;62(4):986-9.
14. Jin W, Yun C, Kim HS, Kim SJ. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res*. 2007;67(20):9869-77.
15. Martens LK, Kirschner KM, Warnecke C, Scholz H. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem*. 2007;282(19):14379-88.
16. Lin CY, Chen HJ, Li TM, Fong YC, Liu SC, Chen PC, et al.  $\beta$ 5 integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma. *PLoS One*. 2013;8(7):e67990.
17. Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y. Inhibition of uterine sarcoma cell growth through suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling. *PLoS One*. 2012;7(7):e41049.

18. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(23):34860-80.

19. Petrilli AS, Brunetto AL, Cypriano Mdos S, Ferraro AA, Donato Macedo CR, Senerchia AA, et al. Fifteen Years' Experience of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG): A Contribution from an Emerging Country. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2013;2(4):145-52.

20. Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.

21. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):689-96.

22. Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, Takiguchi S, Yasuda T, Miyata H, et al. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*. 2008;75(1-2):17-26.

23. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(7-8):755-9.

24. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(22):6462-6.

25. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-

induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res.* 2002;62(22):6756-63.

26. Li Z, Jaboin J, Dennis PA, Thiele CJ. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res.* 2005;65(6):2070-5.

27. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1995;55(8):1798-806.

28. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994;14(1):759-67.

**Received in:** 12/21/2018

**Accepted for publication:** 02/05/2019

**Conflict of interest:** none.

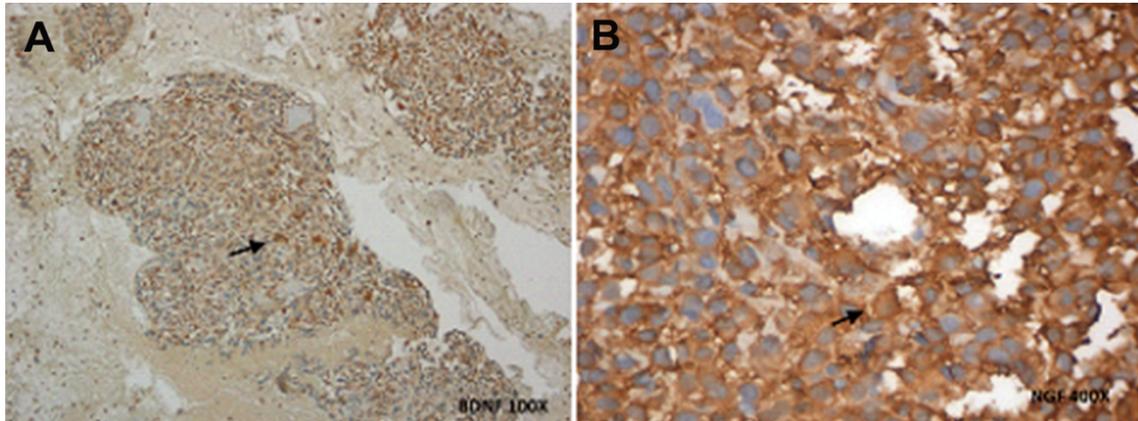
**Source of funding:** Bruno Pereira Antunes, Ricardo Gehrke Becker and Carlos Roberto Galia were supported by the Research and Event Promotion Fund (FIPE/HCPA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant no 15-0499).

**Mailing address:**

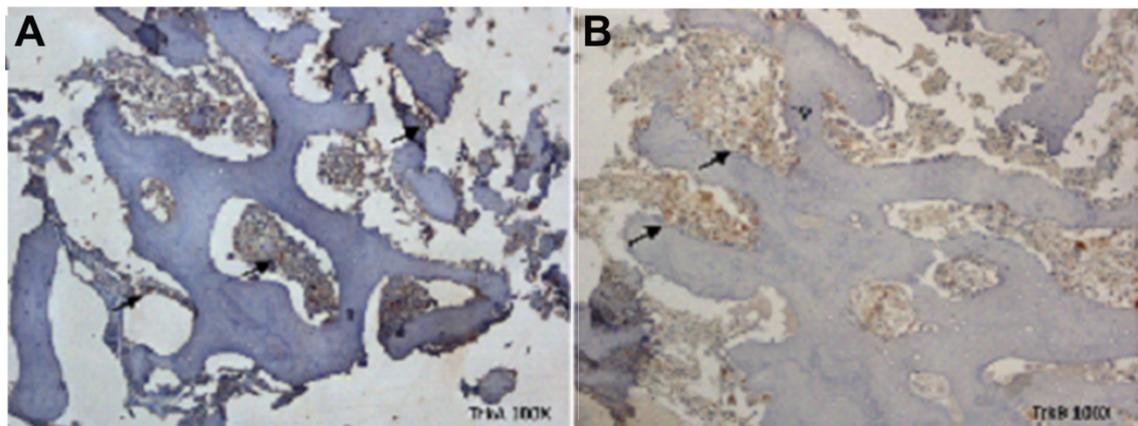
Ricardo Gehrke Becker - E-mail: [rbecker@hcpa.edu.br](mailto:rbecker@hcpa.edu.br)

## FIGURES

**Figure 1.** Expression of BDNF (A, 100x) and NGF (B, 400x) in osteosarcoma cells. Arrows indicate stained cells.



**Figure 2.** Expression of TrkA (A) and TrkB (B) in osteosarcoma cells (100x). Arrows indicate stained cells.



## TABLES

**Table 1.** Characteristics of the sample.

| <b>Variables</b>                       | <b><i>n</i> = 19</b>    |
|--|-------------------------|
| Age (years), mean $\pm$ SD [min – max] | 12.0 $\pm$ 3.6 [5–17.3] |
| Sex, <i>n</i> (%)                      |                         |
| Male                                   | 9 (47.4)                |
| Female                                 | 10 (52.6)               |
| Metastasis, <i>n</i> (%)               |                         |
| No                                     | 12 (63.2)               |
| Yes                                    | 7 (36.8)                |
| Huvos-Ayala, <i>n</i> (%)              |                         |
| < 90%                                  | 5/11 (45.5)             |
| $\geq$ 90%                             | 6/11 (54.5)             |
| Recurrence, <i>n</i> (%)               |                         |
| No                                     | 15 (78.9)               |
| Yes                                    | 4 (21.1)                |

Source: author database.

\*SD= standard deviation.

**Table 2.** *Data on immunohistochemical markers.*

| <b>Variables</b>          | <b>n = 19</b> |
|---------------------------|---------------|
| <hr/>                     |               |
| BDNF, <i>n</i> (%)        |               |
| Negative and weak focal   | 3 (15.8)      |
| Positive, weak and strong | 16 (84.2)     |
| NGF, <i>n</i> (%)         |               |
| Negative and weak focal   | 5 (26.3)      |
| Positive, weak and strong | 14 (73.7)     |
| TrkA, <i>n</i> (%)        |               |
| Negative and weak focal   | 15 (78.9)     |
| Positive, weak and strong | 4 (21.1)      |
| TrkB, <i>n</i> (%)        |               |
| Negative and weak focal   | 11 (57.9)     |
| Positive, weak and strong | 8 (42.1)      |

---

Source: author database.

\*BDNF= brain-derived neurotrophic factor; \*\*NGF= nerve growth factor;  
\*\*\*TrkA= tyrosine kinase A receptor; \*\*\*\*TrkB= tyrosine kinase B receptor.  
There was a significant difference in positivity between the markers (P<0.001).

**Table 3. Univariate analysis.**

| Variables                 | Death   |                  |         |
|---------------------------|---------|------------------|---------|
|                           | 5 years | HR (95%CI)       | p value |
| All patients (n)          | 55.3%   | -                | -       |
| Age (years)               | -       | 0.98 (0.74–1.30) | 0.889   |
| Sex                       |         |                  |         |
| Male                      | 30.0%   | 1.45 (0.29–7.24) | 0.648   |
| Female                    | 68.6%   | 1.00             |         |
| Metastasis                |         |                  |         |
| No                        | 66.0%   | 1.00             |         |
| Yes                       | 40.0%   | 2.04 (0.40-105)  | 0.392   |
| Huvos-Ayala               |         |                  |         |
| < 90%                     | 40.0%   | *                | 0.427   |
| ≥ 90%                     | 75.0%   | 1.00             |         |
| Recurrence                |         |                  |         |
| No                        | 72.2%   | 1.00             |         |
| Yes                       | 25.0%   | 3.02 (0.60–15.1) | 0.178   |
| BDNF                      |         |                  |         |
| Negative and weak focal   | 33.3%   | 1.00             |         |
| Positive, weak and strong | 61.3%   | 0.51 (0.09–2.80) | 0.436   |
| NGF                       |         |                  |         |
| Negative and weak focal   | 33.3%   | 1.00             |         |
| Positive, weak and strong | 66.7%   | 0.69 (0.13–3.81) | 0.669   |
| TrkA                      |         |                  |         |
| Negative and weak focal   | 58.2%   | 1.00             |         |

|                           |       |                   |       |
|---------------------------|-------|-------------------|-------|
| Positive, weak and strong | 37.5% | 3.48 (0.62–19.70) | 0.158 |
| TrkB                      |       |                   |       |
| Negative and weak focal   | 56.3% | 1.00              |       |
| Positive, weak and strong | 54.7% | 1.84 (0.37–9.20)  | 0.457 |

---

Source: author database.

\*RR= relative risk; \*\*95%CI= 95% confidence interval; \*\*\*BDNF= brain-derived neurotrophic factor; \*\*\*\*NGF= nerve growth factor; #TrkA= tyrosine kinase A receptor; ##TrkB= tyrosine kinase B receptor. ¥The risk could not be estimated due to the small sample size.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esse estudo foi o primeiro a relacionar a presença de neurotrofinas e seus receptores em amostras de osteossarcoma. A área da biologia molecular e da oncologia personalizada é extremamente promissora. Portanto é de extrema relevância identificar novos marcadores que poderão ser relacionados a pior prognóstico e permitir o desenvolvimento de tratamentos específicos. As neurotrofinas e seus receptores parecem desempenhar papel importante na patogênese do osteossarcoma. Maiores estudos nessa área são necessários para identificarmos esse importante alvo no tratamento.