

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

Bruna Almeida dos Santos

**INIBIÇÃO DOS RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO DIMINUEM A
PROGRESSÃO TUMORAL DE
SARCOMA DE EWING *IN VITRO* E *IN VIVO***

Porto Alegre

2022

Bruna Almeida dos Santos

**INIBIÇÃO DOS RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO DIMINUEM A
PROGRESSÃO TUMORAL DE
SARCOMA DE EWING *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador(a): Prof. Dra. Caroline Brunetto de Farias

Porto Alegre

2022

Bruna Almeida dos Santos

**INIBIÇÃO DOS RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO DIMINUEM A
PROGRESSÃO TUMORAL DE
SARCOMA DE EWING *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Nadja Schröder - UFRGS

Lauro José Gregianin - UFRGS

Mariane da Cunha Jaeger – ICI-RS

Caroline Brunetto de Farias - UFRGS

AGRADECIMENTOS

À miha mãe, o principal motivo por eu ter chegado onde cheguei, por sempre estar ao meu lado e me apoiando, por todo o amor e dedicação.

À minha orientadora, Caroline, por ter apoiado a minha ideia desde o início e ter estado sempre presente em cada passo, pelo acolhimento e pelas palavras de sabedoria, pela empatia e carinho sempre.

À Natália, minha colega e amiga que me ajudou em diversos momentos e contribuiu de forma fundamental para a conclusão desse trabalho, por ter me ajudado sempre e quando mais precisei.

À Lívia, amiga e colega, que ao longo do caminho esteve sempre ao meu lado com palavras de apoio e motivação, sempre disposta a ajudar e fez parte desse trabalho em uma fase que mesmo quando nenhuma de nós sabia o que fazer, ela se dedicou e fez acontecer, uma amiga que levo pra vida.

À Mariane, minha “mentora” fora do papel, que sempre esteve presente para me socorrer nos momentos de dúvida ou dificuldades, por sempre mostrar que pra tudo tem uma solução e ser um exemplo diário.

Ao Rafael, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Câncer e Neurobiologia, pelas contribuições e incentivos.

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram ao longo do processo, seja com ideias e técnicas ou com apoio e acolhimento.

À minha família e amigos, às pessoas que acreditaram em mim e sempre me apoiaram.

Ao Instituto do Câncer Infantil por tornar possível a pesquisa em câncer infantil e me inspirar a acreditar sempre.

RESUMO

O sarcoma de Ewing (SE) é um tumor pediátrico, o segundo sarcoma ósseo mais comum em crianças e adolescentes. O tratamento do SE, na maioria das vezes, é a realização de quimioterapia sistêmica associada à cirurgia ou radioterapia, porém os tratamentos atuais tem se mostrado ineficientes, sendo necessária a busca por novas terapias e melhor entendimento a nível molecular do tumor. Deste modo, estudos recentes têm avaliado a presença de receptores de tropomiosina quinase (Trks) em diversos tumores e foi visto que pacientes com SE possuem os receptores de neurotrofinas TrkA, TrkB e TrkC. Os Trks são estudados como reguladores chave de todos os aspectos da neoplasia, incluindo proliferação, invasão, angiogênese e metástase, assim como o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) que tem sido amplamente estudado em SE como alvo terapêutico. Estudos *in vitro* do nosso grupo de pesquisa avaliaram que neurotrofinas e seus receptores são expressos em SE e a inibição dos receptores através do tratamento com K252a diminuiu a proliferação celular. . O presente estudo avaliou o papel da inibição combinada de antagonistas de Trks e IGF-1R *in vitro*, bem como a padronização de um modelo *in vivo* de SE. A avaliação *in vivo* foi realizada a partir da indução tumoral de linhagem celular de SE e o tratamento foi avaliado a partir do volume tumoral e análise histológica com a técnica de imunohistoquímica; *in vitro* o índice de combinação entre as drogas foi analisado através do método de ZIP (Zero Interaction Potency) e a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real de transcrição reversa foi realizada para verificar os níveis de RNA mensageiro. *In vivo* o tratamento demonstrou eficácia na redução da massa tumoral, semelhante aos resultados previamente encontrados *in vitro* e o tratamento combinado demonstrou maior potencial do que os tratamentos separados, apresentando sinergia e em concordância com diversos estudos pré-clínicos e clínicos com SE que concluem que tratamentos com mais de um agente são, de fato, mais promissores e eficazes.

Palavras-chaves: sarcoma de Ewing, receptores de tropomiosina quinase, receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1.

ABSTRACT

Ewing's sarcoma (ES) is a pediatric tumor, the second most common bone sarcoma in children and adolescents. The treatment of ES, in most cases, is systemic chemotherapy associated with surgery or radiotherapy, but current treatments have been shown to be inefficient, requiring the search for new therapies and a better understanding of the tumor molecular level. Thus, recent studies have evaluated the presence of tropomyosin kinase receptors (Trks) in several tumors and it has been seen that patients with ES have the neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC. Trks are studied as key regulators of all aspects of neoplasia, including proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis, as well as the insulin-like growth factor receptor type 1 (IGF1R) which has been extensively studied in ES as a therapeutic target. *In vitro* studies by our research group evaluated that neurotrophins and their receptors are expressed in ES and the inhibition of receptors through K252a treatment decreased cell proliferation. The present study evaluated the role of combined inhibition of Trks and IGF-1R antagonists *in vitro*, as well as the standardization of an *in vivo* model of ES. The *in vivo* evaluation was performed from the tumor induction of the ES cell line and the treatment was evaluated from the tumor volume and histological analysis with the immunohistochemistry technique; *in vitro* the combination index between the drugs was analyzed using the ZIP method (Zero Interaction Potency) and the real-time reverse transcription polymerase chain reaction technique was performed to verify the levels of messenger RNA. *In vivo*, the treatment demonstrated efficacy in reducing tumor mass, similar to the results previously found *in vitro* and the combined treatment showed greater potential than the separate treatments, showing synergy and in agreement with several pre-clinical and clinical studies with ES that conclude that treatments with more than one agent are, in fact, more promising and effective.

Key-words: Ewing's sarcoma, tropomyosin kinase receptors, insulin-like growth factor receptor type 1.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Câncer Infantojuvenil.....	8
1.2 Sarcoma de Ewing.....	9
1.3 Receptores de neurotrofinas.....	11
1.4 Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1	12
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivo específico.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Declaração ética	16
4.2 Cultura de células	16
4.3 Xenoenxerto derivado de linhagem celular (CDX).....	16
4.4 Tratamento.....	17
4.5 Imunohistoquímica.....	17
4.6 Viabilidade celular.....	18
4.7 Análise da interação entre drogas	18
4.8 Análise de expressão de mRNA	18
4.9 Estatística.....	19
5 RESULTADOS.....	20
5.1 Pan-inibidor de receptores de neurotrofinas reduz a progressão do volume tumoral	20
5.2 K252a não foi capaz de modular os Trks, IGF1R e PI3K a nível de proteína ..	21
5.3 A interação entre os inibidores de receptores de fatores de crescimento é sinérgica.....	23
5.4 Análise de interação entre drogas	23
5.5 K252a e NVP-ADW742 modulam a expressão de mRNA dos receptores de neurotrofinas <i>in vitro</i>	23
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Infantojuvenil

O câncer é uma das principais causas de morte em adultos e, embora o câncer pediátrico seja uma doença relativamente rara, em crianças e adolescentes entre 1 e 19 anos, atualmente, é considerada a principal causa de morte (INCA, 2022).

A teoria de que o câncer é ocasionado pelo acúmulo de mutações ao longo da vida é bem estabelecida (SIEGEL *et al.*, 2022); porém, acredita-se que a maior parte das mutações que resultam o câncer surjam durante a ontogênese (DEGREGORI, 2013), no entanto, o câncer pediátrico de origem congênita representa de 1 a 2% dos casos (MONJE, 2018) e de origem hereditária de 5 a 10%, sendo a desregulação de proteínas a mais provável causa do câncer pediátrico. Portanto, identificar as vias e seus mecanismos de desregulação é um ponto importante como foco para o desenvolvimento de novas terapias (KATTNER *et al.*, 2019).

Embora a taxa de cura para o câncer infantojuvenil seja alta (INCA, 2022), a quantidade de terapias aprovadas são substancialmente menores em comparação com adultos, pois existem considerações quanto aos efeitos colaterais e especificações do tratamento que divergem (BARONE *et al.*, 2019). A longo prazo existem consequências advindas dos tratamentos utilizados, como a quimioterapia que em sua grande maioria causa danos ao ácido desoxirribonucleico ou a radioterapia que aumenta significativamente o risco de malignidades no futuro (DERBAL, 2017).

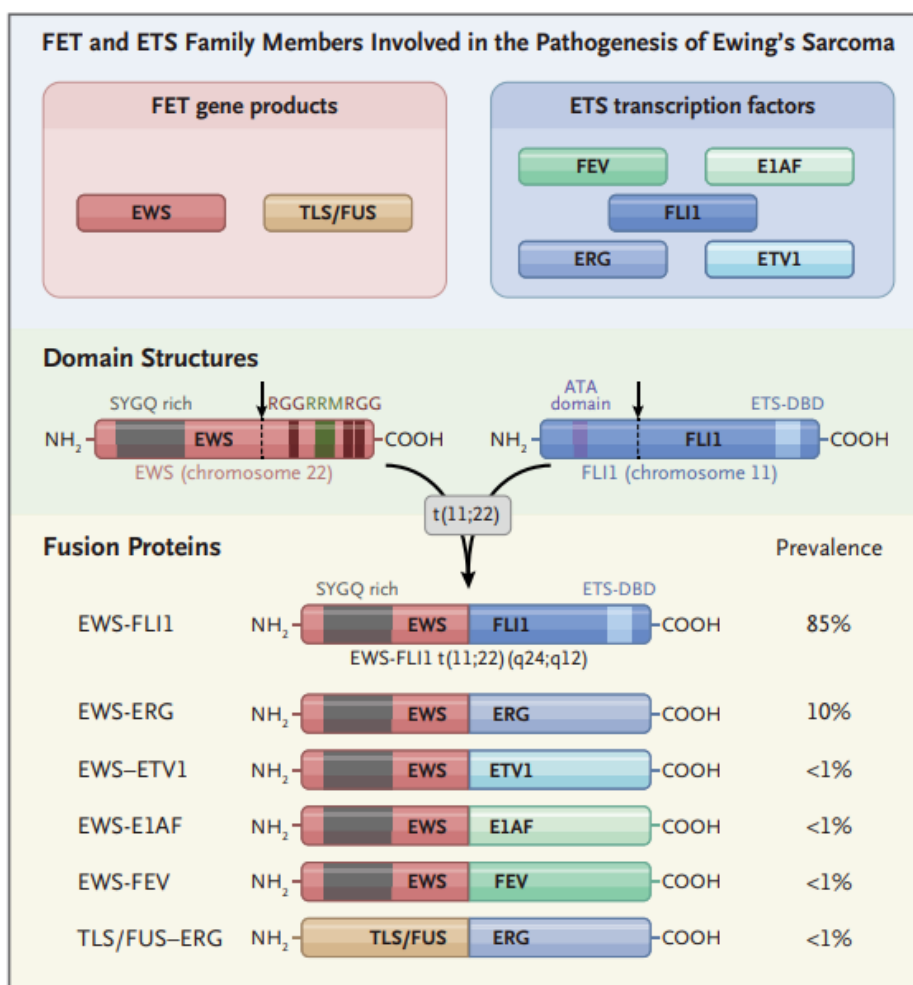
Além da taxa de cura, uma das maiores e mais urgentes preocupações é a morbidade desses pacientes, pois ao chegarem à fase adulta, muitas vezes desenvolvem malignidades secundárias, sendo um dos grandes desafios em relação à terapia anticâncer para pacientes pediátricos (CHOI; HELENOWSKI; HIJYA, 2014). Dessa forma, compreender o comportamento do tumor e seus mecanismos em relação aos tratamentos é de suma importância para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que reduzam danos futuros.

1.2 Sarcoma de Ewing

O sarcoma de Ewing (SE) foi descrito pela primeira vez em 1921 por James Ewing, que classificou como um sarcoma ósseo de células redondas, citoplasma hipercromático e núcleo pequeno com bordas bem definidas (JAMES EWING, 1921). O SE é um tumor pediátrico e agressivo, caracterizado pela translocação cromossômica entre o domínio regulador de transcrição do gene EWSR1 e o domínio de ligação de um membro da família ETS, sendo em 85% dos casos o FLI1 (FUHRMAN KIRK; DAVIS, ALLINSON, 1992; GRÜNEWALD *et al.*, 2018). Essa fusão gênica é considerada a principal responsável pela formação do tumor, visto que pode ser associada ao processo de oncogênese, uma vez que estudos apontam que a proteína formada a partir dessa fusão está relacionada ao desenvolvimento e manutenção do sarcoma de Ewing (ARVAND; DENNY, 2001).

Os principais sintomas são inespecíficos como dor, edema e disfunções circulatórias no local do aparecimento do tumor, assim como os exames bioquímicos e de imagem compatíveis com quadros inflamatórios (OZAKI, 2015). Estudos indicam que os marcadores CD117, CD56 e CD99 são importantes para o diagnóstico de SE. Além disso, o CD99, tem se mostrado relevante tanto para o diagnóstico quanto para o processo de tumorigênese. Porém, também é encontrado em outros sarcomas (KIM; PARK, 2016). Portanto, o diagnóstico diferencial é realizado por exclusão de outros tumores através de análise molecular, como a investigação de translocações cromossômicas específicas através da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Figura 1).

Figura 1 - Translocações cromossômicas do Sarcoma de Ewing



Fonte: Riggi et al, 2021.

No diagnóstico, a sobrevida global de 5 anos do SE é em torno de 75%, enquanto que para pacientes com a doença metastática cai para 30%, com exceção da metástase pulmonar isolada que é de aproximadamente 50% (GASPAR *et al.*, 2015). No caso do prognóstico de SE extraesquelético a sobrevida a longo prazo aumentou de menos de 10% para aproximadamente de 30% a 40% (CASALI *et al.*, 2018); porém, no caso de recidiva, a sobrevida a longo prazo é de 22% a 24% (RODRÍGUEZ-GALINDO *et al.*, 2008).

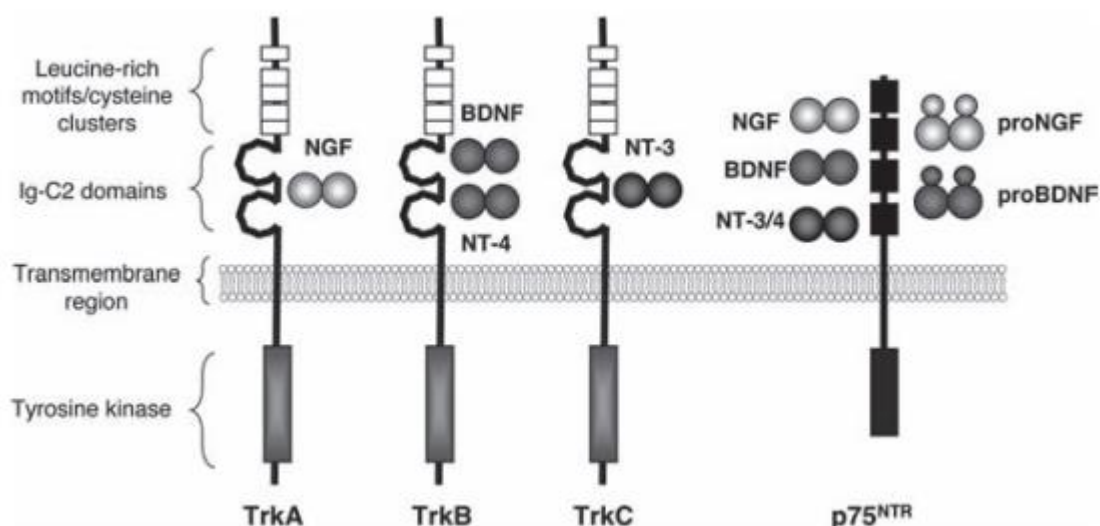
O tratamento do SE consiste em quimioterapia sistêmica associada à cirurgia ou radioterapia (TODOROVA, 2013) ; sendo o tratamento padrão atual a quimioterapia citotóxica com vincristina, adriamicina e ciclofosfamida, alternando com ifosfamida e etoposídeo. A cirurgia é usada para controle local, com radiação em pacientes

selecionados, mas os pacientes com SE requerem uma abordagem multimodal (DONALDSON, 2004), pois embora o SE seja um tumor radiosensível, a radioterapia sozinha resulta em uma taxa de recorrência de 30 a 35% (DUBOIS *et al.*, 2015). Sendo assim, utiliza-se a quimioterapia em combinação ao tratamento local para aumentar a taxa de sobrevida de 5 anos em torno de 70% (LE DELEY *et al.*, 2014). Entretanto, a quimioterapia combinada não tem sido suficiente em casos de doença metastática ou recorrente, que apresenta uma taxa de sobrevida inferior a 25%, demonstrando a necessidade de novas abordagens terapêuticas (SUBBIAH *et al.*, 2009).

1.3 Receptores de neurotrofinas

As neurotrofinas possuem duas classes de receptores, as tirosinas quinases (Trks) e o p75NTR. Os receptores de neurotrofinas de tirosina quinase são divididos em três receptores: TrkA, TrkB e TrkC, os quais possuem ligantes seletivos, diferente do receptor p75NTR que não possui afinidade específica (Figura 2). Os Trks são considerados os principais receptores de neurotrofinas e regulam diversas funções na sobrevivência e proliferação neuronal (REICHARDT, 2006).

Figura 2 - Neurotrofinas e seus receptores



Fonte: Arévalo et al, 2006.

A hipótese de que todas as células estão comprometidas com a morte a menos que um fator de sobrevivência impeça (JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997) pode ser

provado pelos Trks, pois têm grande papel no desenvolvimento tumoral.

Os receptores TrkA e TrkB são de grande relevância no processo oncológico, uma vez que quando se encontram altamente expressos, estimulam o crescimento de diversos tumores. O receptor TrkC, na presença do seu ligante, NT-3, é considerado um promotor tumoral (MELDOLESI, 2018). Após a ligação com as neurotrofinas, os receptores Trks ativam duas vias de sobrevivência celular que bloqueiam as vias intrínseca e extrínseca para a apoptose, PI3K/AKT e MAPK (SEGAL; GREENBERG, 1996) e na ausência de ligantes, levam a célula a apoptose; concluindo que os Trks podem exercer um papel de mecanismo central importante na progressão do câncer (ICHIM; TAUSZIG-DELAMASURE; MEHLEN, 2012).

1.4 Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

O receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) é um receptor transmembrana expresso em diversos tipos celulares, que faz parte da família de receptores de tirosina quinase (ADAMS *et al.*, 2000) e está envolvido em mecanismos de resistência a quimioterápicos (GAROFALO *et al.*, 2012). Sugere-se que seu potencial de resistência está relacionado a uma via de regulação do ciclo celular que através da fosforilação do ligante IRS-1, ativa a cascata de sinalização PI3K/Akt/mTOR promovendo a sobrevivência de células resistentes (JACKSON; WHITE; YEE, 1998).

Fortes evidências sugerem que o IGF1R está envolvido no crescimento e sobrevivência de tumores no geral (BUCK; MULVIHILL, 2011), e também está envolvido na sarcomagênese, regulando o crescimento, proliferação, sobrevivência e transformação celular (POLLAK, 2008).

Dados pré-clínicos comprovam que a inibição de IGF1R em combinação com quimioterápicos utilizados na clínica, aumenta a capacidade terapêutica desses agentes, (BUCK *et al.*, 2008; LEROITH; ROBERTS, 2003; NAHTA *et al.*, 2005). Inibidores seletivos de IGF1R, tais como figitumumab e cixutumumabe, demonstraram boa tolerância quanto à sua toxicidade em ensaios clínicos (JUERGENS *et al.*, 2011;

MALEMPATI *et al.*, 2012; OLMOS *et al.*, 2010). Porém, a conclusão terapêutica é que a atividade é limitada como agente único (PAPPO *et al.*, 2011)

Estudos sugerem que a inibição de um único agente, por exemplo a inibição apenas de IGF1R, pode não oferecer efeitos clinicamente significativos, sugerindo que combinações entre mais de um agente terapêutico possa ser promissor (CHANDHANAYINGYONG *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Dado que o sarcoma de Ewing (SE) é o segundo tumor ósseo mais comum em pacientes pediátricos, o melhor entendimento da biologia desse tumor se torna necessário. Visto que experimentos *in vitro* apontam uma correlação entre a ativação de receptores de tirosina quinase e a taxa de crescimento de linhagens de SE, o estudo *in vivo* do efeito da inibição dos receptores Trks torna-se relevante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar um modelo *in vivo* de sarcoma de Ewing para caracterizar o efeito da inibição de receptores de neurotrofinas (Trks) bem como avaliar o efeito do tratamento combinado da inibição de receptores Trks e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1R) *in vitro*.

3.2 Objetivo específico

- a) Estabelecer um modelo de sarcoma de Ewing *in vivo*, induzida pela linhagem celular SK-ES-1 ;
- b) Verificar os efeitos do tratamento com o fármaco K252a nos tumores, através de parâmetros histopatológicos e medição de volume de massa tumoral;
- c) Avaliar os efeitos do tratamento sobre os níveis de expressão de TrKA, TrkB, TrkC, Phospho-TrkA, Phospho-TrkB, Phospho-TrkC, IGF-1R, Phospho-IGF1, PI3K e Phospho-PI3K por imunohistoquímica;
- d) Analisar a inibição combinada dos receptores de neurotrofinas (inibidor K252a) e IGF-1R (inibidor NVP-ADW742) *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

A padronização de um modelo *in vivo* possibilitou avaliar melhor o tratamento utilizado *in vitro* e oportuniza estudos futuros para melhor compreensão do sarcoma de Ewing e seus mecanismos tumorais. A inibição dos Trks com K252a diminuiu a progressão do volume tumoral, em concordância com estudos anteriores, apoiando a ideia de que os receptores de neurotrofinas têm papel importante na tumorigênese e são um alvo terapêutico promissor. A inibição combinada de Trks já havia apresentado eficácia significativamente maior em relação a terapia única, assim como inibidores seletivos de IGF1R têm exibido o mesmo resultado; *in vitro*, a inibição combinada de Trks e IGF1R resultou em uma resposta sinérgica e mais eficiente; confirmando que uma investigação molecular mais detalhada sobre a via dos receptores de neurotrofinas e vias relacionadas pode trazer resultados promissores a caminho de estratégias terapêuticas futuras. Portanto, os resultados encontrados apoiam a ideia de uma pesquisa *in vivo*, com o modelo padronizado neste estudo, da inibição combinada entre K252a e NVP-ADW742 e uma análise mais detalhada dos mecanismos das vias em comum em resposta ao tratamento para melhor compreensão da resposta terapêutica e futuras abordagens clínicas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, T. E. *et al.* Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 1050–1093, 2000.
- ARVAND, A.; DENNY, C. T. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. **Oncogene**, [s. l.], v. 20, n. 40 REV. ISS. 4, p. 5747–5754, 2001.
- BARONE, A. *et al.* Cancer drugs approved for use in children: Impact of legislative initiatives and future opportunities. **Pediatric Blood and Cancer**, [s. l.], v. 66, n. 8, p. 1–6, 2019.
- BUCK, E. *et al.* Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 20, p. 8322–8332, 2008.
- BUCK, E.; MULVIHILL, M. Small molecule inhibitors of the IGF-1R/IR axis for the treatment of cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 605–621, 2011.
- CASALI, P. G. *et al.* Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 29, n. August, p. iv79–iv95, 2018.
- CHANDHANAYINGYONG, C. *et al.* MAPK/ERK signaling in osteosarcomas, Ewing sarcomas and chondrosarcomas: Therapeutic implications and future directions. **Sarcoma**, [s. l.], v. 2012, 2012.
- CHOI, D. K.; HELENOWSKI, I.; HIJIYA, N. Secondary malignancies in pediatric cancer survivors: Perspectives and review of the literature. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 135, n. 8, p. 1764–1773, 2014.
- DEGREGORI, J. Challenging the axiom: Does the occurrence of oncogenic mutations truly limit cancer development with age. **Oncogene**, [s. l.], v. 32, n. 15, p. 1869–1875, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.281>.
- DERBAL, Y. Perspective on the dynamics of cancer. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–18, 2017.
- DONALDSON, S. S. Ewing Sarcoma: Radiation Dose and Target Volume. **Pediatric Blood and Cancer**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 471–476, 2004.
- DUBOIS, S. G. *et al.* Comparative evaluation of local control strategies in localized Ewing sarcoma of bone: a report from the Children's Oncology Group. **Cancer**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 467–475, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25251206/>.
- FUHRMAN KIRK; DAVIS, ALLINSON, J. M. ²»ÉøÍ,ĐÔµÄ © 19 9 2 Nature Publishing Group. **Nature**, [s. l.], v. 359, p. 710–713, 1992. Disponível em: <file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/p21/xiong1993.pdf>.

GAROFALO, C. *et al.* Identification of common and distinctive mechanisms of resistance to different anti-IGF-IR agents in Ewing's sarcoma. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 1603–1616, 2012.

GASPAR, N. *et al.* Ewing sarcoma: Current management and future approaches through collaboration. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 33, n. 27, p. 3036–3046, 2015.

GRÜNEWALD, T. G. P. *et al.* Ewing sarcoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2018.

HADUONG, J. H. *et al.* Sarcomas. **Pediatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 179–200, 2015.

HAJDU, S. I. A note from history: The enigma of Ewing's sarcoma. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 108–110, 2006.

HOSALKAR, H. S.; DORMANS, J. P. Limb Sparing Surgery for Pediatric Musculoskeletal Tumors. **Pediatric Blood and Cancer**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 295–310, 2004.

ICHIM, G.; TAUSZIG-DELAMASURE, S.; MEHLEN, P. Neurotrophins and cell death. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 318, n. 11, p. 1221–1228, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.03.006>.

JACKSON, J. G.; WHITE, M. F.; YEE, D. Insulin receptor substrate-1 is the predominant signaling molecule activated by insulin-like growth factor-I, insulin, and interleukin-4 in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 16, p. 9994–10003, 1998.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 347–354, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400818735>.

JAMES EWING, M. D. Diffuse Endothelioma of Bone. **Proc NY Path Soc**, [s. l.], 1921.

JUERGENS, H. *et al.* Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 34, p. 4534–4540, 2011.

KATTNER, P. *et al.* Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. **Cancer and Metastasis Reviews**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 673–682, 2019.

KIM, S. K.; PARK, Y. K. Ewing sarcoma: A chronicle of molecular pathogenesis. **Human Pathology**, [s. l.], v. 55, p. 91–100, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.05.008>.

KOVAR, H. *et al.* The first European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 2 MAY, n. May, p. 1–11, 2012.

LE DELEY, M. C. *et al.* Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: Results of the randomized noninferiority

Euro-EWING99-R1 trial. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 32, n. 23, p. 2440–2448, 2014.

LEROITH, D.; ROBERTS, C. T. The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 195, n. 2, p. 127–137, 2003.

MALEMPATI, S. *et al.* Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 256–262, 2012.

MELDOLESI, J. Neurotrophin trk receptors: New targets for cancer therapy. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, [s. l.], v. 174, p. 67–79, 2018.

MONJE, M. Open questions: Why are babies rarely born with cancer?. **BMC Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 4–5, 2018.

NAHTA, R. *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 23, p. 11118–11128, 2005.

OLMOS, D. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 129–135, 2010.

OZAKI, T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. **Journal of Orthopaedic Science**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 250–263, 2015.

PAPPO, A. S. *et al.* R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: Results of a phase II Sarcoma Alliance for research through Collaboration study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 34, p. 4541–4547, 2011.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 915–928, 2008.

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.

RODRÍGUEZ-GALINDO, C. *et al.* Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 814–820, 2008.

SEGAL, R. A.; GREENBERG, M. E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 19, p. 463–489, 1996.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022.

STAHL, M. *et al.* Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing

sarcoma. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 549–553, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.23040>.

SUBBIAH, V. *et al.* Ewing's sarcoma: Standard and experimental treatment options. **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 1–2, p. 126–140, 2009.

AUBERT, L. *et al.* NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 9807–9819, 2015.

BONNIE L. LYONS, D. L. G. L. D. S. N. G. F. I. V. H. Human Cancer Growth and Therapy In NOD/SCID/IL2R γ null (NSG) Mice. **Cold Spring Harb Protoc**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 694–708, 2014.

HEINEN, T. E. *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.

JUERGENS, H. *et al.* Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 34, p. 4534–4540, 2011.

KAWAMURA, K. *et al.* Suppression of choriocarcinoma invasion and metastasis following blockade of BDNF/TrkB signaling. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 849–861, 2013.

MALEMPATI, S. *et al.* Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 256–262, 2012.

MAZOUFFRE, C. *et al.* Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 2610–2622, 2017.

OLMOS, D. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the anti-IGF-1R antibody figitumumab (CP-751,871) in patients with sarcoma and Ewing's sarcoma: a phase 1 expansion cohort study. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 129–135, 2010.

PAPPO, A. S. *et al.* R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: Results of a phase II Sarcoma Alliance for research through Collaboration study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 34, p. 4541–4547, 2011.

ZHENG, S. *et al.* SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.01.004>.

ANTUNES, B. P. *et al.* Expression of neurotrophins and their receptors in primary osteosarcoma. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, [s. l.], v. 46, n. 2, p.

1–9, 2019.

HONDERMARCK, H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 357–365, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610112000433>.

SCOTT, N. *et al.* Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 189–192, 2004.

TAN, W. C. C. *et al.* Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. **Cancer Communications**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 135–153, 2020.

TODOROVA, R. Ewing's Sarcoma Cancer Stem Cell Targeted Therapy. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 46–62, 2013.

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2019/0638

Título: Sarcoma de Ewing e neurotrofinas: padronização de um modelo in vivo

Pesquisador Responsável: RAFAEL ROESLER

Equipe de Pesquisa:

RAFAEL PEREIRA DOS SANTOS

MARIANE DA CUNHA JAEGER

NATÁLIA HOGETOP FREIRE

CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

Data de Aprovação: 19/02/2020

Data de Término: 01/12/2021

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
CAMUNDONGO ISOGÊNICO	M/4 Semana(s)	28	18/02/2020	Projeto
CAMUNDONGO ISOGÊNICO	M/4 Semana(s)	6	18/02/2020	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ASHTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação

11/03/2020 14:56:08

eterno.hcpa.edu.br/perquisas/publicacao/assinaturas/Arquivos/eterno/2020/03/11/03112