

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

MIRELA SEVERO GIL

**NEUROTROFINAS COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES E ALVOS  
TERAPÊUTICOS EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS**

Porto Alegre

Novembro de 2016

**MIRELA SEVERO GIL**

**NEUROTROFINAS COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES E ALVOS  
TERAPÊUTICOS EM LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

Novembro de 2016

## CIP - Catalogação na Publicação

Gil, Mirela Severo

Neurotrofinas como possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos em leucemias pediátricas. / Mirela Severo Gil. -- 2016.

54 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 2. Leucemias pediátricas. 3. Neurotrofinas. I. Roesler, Rafael, orient. II. Título.

## Agradecimentos

Ao professor Rafael pela orientação e pelo aprendizado transmitido no período do mestrado. À Caroline, pelos ensinamentos, pela confiança, pelas oportunidades, pelo apoio e pela compreensão nos momentos difíceis. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Aos pacientes do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por disponibilizarem as amostras para o estudo e à equipe do Serviço pela coleta do material e pelo auxílio na discussão dos dados clínicos dos pacientes.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Laboratório de Câncer e Neurobiologia. Em especial à Sophia, amiga de tantos anos, que me incentivou a fazer o mestrado no Laboratório e que me apresentou ao grupo. À Lívia, por todos os ensinamentos e ajuda nos experimentos, além da amizade e do carinho. À Júlia, que além de ser uma amiga maravilhosa e conselheira médica, foi essencial no desenvolvimento do artigo desse trabalho. E por fim, à Kelly e à Camila, pela amizade e carinho incondicionais comigo e com a minha família, pelo apoio nas horas difíceis, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados, pela ajuda nos experimentos e em todo desenvolvimento desse trabalho; obrigada gurias, sem vocês eu não teria conseguido.

À querida amiga Márcia Polese, com quem aprendi muito desde o estágio na graduação, e que sempre me escuta, aconselha e apoia.

Às amigas/irmãs Natália Vieira, Rafaela Rocha e Marcela Rocha, que me acompanham desde o primeiro ano de graduação. Muito obrigada pelo apoio emocional e por estarem sempre presentes apesar da distância.

Ao Vinicius, por estar ao meu lado em todos os momentos e por sempre me incentivar a buscar novas oportunidades e desafios.

Aos meus pais, pela paciência, pelo carinho, pela compreensão, por acreditarem em mim e sempre me incentivarem na busca por conhecimento. Obrigada pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos que contribuíram para que eu finalizasse mais essa etapa da minha formação. Amo vocês!

Muito obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

## Índice

Lista de abreviaturas.....	7
Lista de figuras.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
1.1. Câncer Infanto-juvenil.....	12
1.2. Leucemias agudas.....	14
1.3. Novos alvos moleculares.....	17
1.3.1. Neurotrofinas.....	17
1.3.2. Neurotrofinas e câncer.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Artigo.....	26
4. Considerações finais.....	33
5. Perspectivas.....	35
6. Referências bibliográficas.....	41
7. Anexos.....	50
7.1. Anexo1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	50

## Lista de abreviaturas

**LLA:** Leucemia linfóide aguda

**LMA:** Leucemia mielóide aguda

**SNC:** Sistema nervoso central

**BDNF:** *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)

**NGF:** *Neural Growth Factor* (Fator de Crescimento Neural)

**NT-3:** Neurotrofina3

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

**Trk:** *Tropomyosin related kinase* (receptor tropomiosina quinase)

**p75<sup>NTR</sup>:** Neurotrophin receptor p75 (receptor de neurotrofina p75)

**TrkA:** Tropomyosin receptor kinase A (receptor tropomiosina quinase A)

**TrkB:** Tropomyosin receptor kinase B (receptor tropomiosina quinase B)

**TrkC:** Tropomyosin receptor kinase C (receptor tropomiosina quinase C)

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinases (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos)

**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidilinositol-3-quinase)

**PLC- $\gamma$ :** Phospholipase C gamma (Fosfolipase C gama)

**PKC:** Proteinkinase C (Proteína quinase C)

## Lista de figuras

**Figura 1:** Distribuição global de câncer infantil.

**Figura 2:** Hematopoiese.

**Figura 3:** Ligação das neurotrofinas aos receptores.

**Figura 4:** Sinalização de neurotrofinas.



## Resumo

As leucemias correspondem a 30% dos tumores pediátricos, e constituem as neoplasias mais frequentes em indivíduos com menos de 15 anos. Apesar da elevada taxa de cura, frequentemente a ela está associada resistência à quimioterapia e efeitos colaterais tardios. Por isso, novas estratégias de tratamento, diagnóstico e prognóstico são necessárias. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seus receptores de quinase relacionados à tropomiosina (tropomyosin related kinase, ou Trk) estão envolvidos com muitos processos na medula óssea (MO). Entretanto, o papel do BDNF em leucemias agudas (LA) pediátricas ainda não é bem conhecido.

O objetivo desse estudo foi analisar os níveis de BDNF em amostras de MO ou sangue periférico (SP) de crianças com LA, e iniciar a caracterização dos efeitos de agonistas e antagonistas de neurotrofinas sobre culturas primárias de leucemias linfóides agudas em diferentes momentos terapêuticos.

Foram coletadas amostras de MO ou SP de crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda (LLA), crianças e adolescentes com leucemia mielóide aguda (LMA), e indivíduos saudáveis (IS) da mesma faixa etária. Para análise dos níveis séricos de BDNF utilizou-se kit de imuno-ensaio enzimático tipo sanduíche. Quando comparados aos IS os níveis de BDNF de pacientes com LA, ao diagnóstico, foram significativamente menores. Resultados similares foram observados nos pacientes durante indução, consolidação, diagnóstico e tratamento de recidiva. Da mesma forma, os níveis de BDNF foram inferiores em pacientes que receberam transfusão de plaquetas e, ao diagnóstico naqueles pacientes que foram a óbito. Para a caracterização dos efeitos de agonistas e antagonistas de neurotrofinas em cultura de células, amostras de pacientes ao momento do diagnóstico e no momento de indução do tratamento foram utilizadas. Os linfócitos foram extraídos e, após plaqueamento, as células foram tratadas com BDNF (Sigma, B3795), NGF (Sigma, SRP3015) e K252a (Sigma, 05288) por 72 horas. A viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão por azul de Tripán. Devido às dificuldades no cultivo das células, esses dados ainda estão em análise.

Palavras-chave: neurotrofinas, leucemias pediátricas, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

## Abstract

Leukemias account for 30% of pediatric tumors and are the most frequent cancers in people under 15 years. Despite the high cure rate, often it is associated with resistance to chemotherapy and late side effects. Therefore, new strategies for treatment, diagnosis and prognosis are necessary. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and their kinase receptor related tropomyosin (tropomyosin related kinase, and Trk) are involved in many processes in bone marrow (BM), however, the role of BDNF in acute leukemias (AL) pediatric it is not well known.

The aim of this study was to analyze the BDNF levels in BM samples or peripheral blood (PB) of children with AL, and start the characterization of the effects of agonists and antagonists on neurotrophin primary cultures of acute lymphoblastic leukemias in different therapeutic moments.

BM or PB samples were collected from children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia (ALL), children and adolescents with acute myeloid leukemia (AML), and healthy individuals (HI) of the same age. For analysis of serum levels of BDNF was used sandwich enzyme immunoassay kit. When compared to HI, BDNF levels in patients with AL at diagnosis were significantly lower. Similar results were observed in patients during induction, consolidation, diagnosis and treatment of relapse. Similarly, BDNF levels were lower in patients receiving platelet transfusion and at diagnosis in patients that died. To characterize the effects of agonists and antagonists for neurotrophin in cell culture, samples of patients at diagnosis and at the time of induction treatment were used. Lymphocytes were extracted and, after plating, cells were treated with BDNF (Sigma B3795), NGF (Sigma, SRP3015) and K252a (Sigma, 05288) for 72 hours. Viability was assessed by exclusion of trypan blue method. Due to difficulties in cell culture, these data are still under analysis.

Key-words: neurotrophin, childhood leukemia, brain derived neurotrophic factor (BDNF).

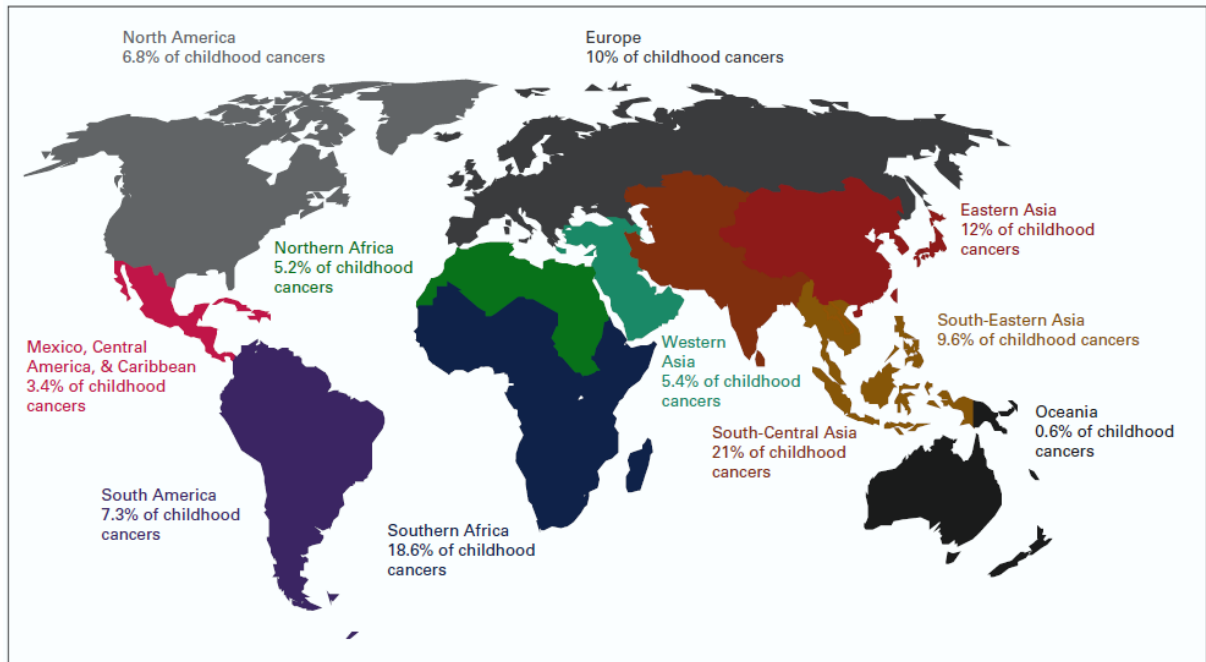
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer Infanto-juvenil

O câncer infanto-juvenil (zero a 19 anos) corresponde a cerca de 1% a 3% do total de tumores malignos e representa a segunda causa de morte em crianças, sendo a principal por doença (7% do total), tanto em países desenvolvidos, quanto no Brasil (INCA, 2016; KAATSCH, 2010). A incidência de câncer no mundo varia entre 30 e 300 novos casos por milhão, enquanto no Brasil são estimados 154 casos novos por milhão de habitantes. Dados de 2013 mostram uma incidência de 124 casos de câncer infantil para cada milhão de habitantes com idades entre zero e 14 anos, totalizando 5.984 casos anuais, destes 2.835 foram a óbito (INCA, 2016; Rodriguez-Galindo *et al.*, 2015). Cerca de 12.600 novos casos são previstos por ano para 2016 e 2017 no país, sendo as regiões Sudeste (48%) e Nordeste (21,8%) com maiores ocorrências, seguidas pelas regiões Sul (10,4%), Centro-Oeste (10%) e Norte (9,6%). No Rio Grande do Sul, estima-se 500 novos casos (INCA, 2016).

A incidência e os índices de sobrevivência variam de acordo com o diagnóstico e o estadiamento do câncer, alterações genéticas, idade, sexo e variações regionais (KAATSCH, 2010). Em média, nos países desenvolvidos, mais de 80% das crianças tratadas atingem a cura, entretanto a maioria das crianças diagnosticadas com câncer vive em países de baixa e média renda (Figura 1), com chances de cura de 50% ou menos. Nesse cenário, apenas de 15% a 37% das crianças têm acesso ao tratamento e diagnóstico em estágios iniciais da doença, o que diminui consideravelmente suas chances de cura (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2015; MBAH AFUNGCHWI *et al.*, 2016).

A origem do câncer infantil ainda não está bem esclarecida, entretanto alguns tipos tumorais podem ser originados por células embrionárias, como retinoblastoma, leucemia linfoblástica aguda e rabdomyosarcoma (MARSHALL *et al.*, 2014). Porém, ainda que se tenha a hipótese de que existem células tronco envolvidas com a gênese tumoral, o que acarretaria em um tumor de heterogeneidade praticamente ilimitada, a dificuldade em esclarecer suas origens, propriedades genômicas, fenotípicas e funcionais, têm gerado controvérsias (VALENT *et al.*, 2012).

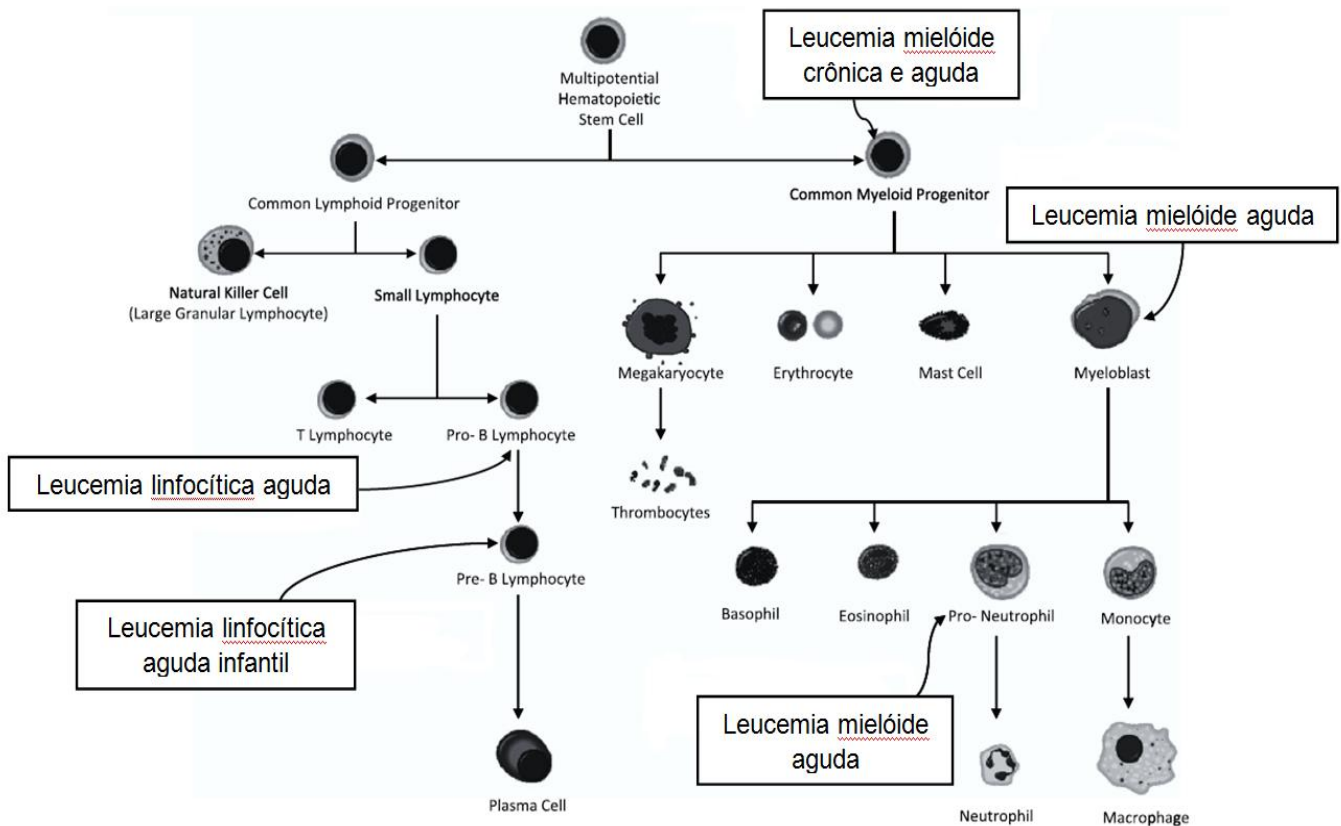


**Figura 1: Distribuição global de câncer infantil.** (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2015).

Embora com origem desconhecida, o câncer infantil possui altas taxas de cura, e essa característica pode estar relacionada à terapia antineoplásica utilizada. Composta por quimioterapia, radioterapia, cirurgia e transplante de células progenitoras hematopoiéticas, de maneira que estes podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com o objetivo de reduzir a toxicidade e preservar a qualidade de vida do paciente (ALCOSER & RODGERS, 2003). Porém, tornou-se importante avaliar as consequências e efeitos colaterais tardios causados pelo tratamento do câncer pediátrico bem como novas alternativas para diagnóstico e prognóstico em oncologia pediátrica (BROWNSTEIN, 2004).

## 1.2. Leucemias Agudas

As leucemias, caracterizadas pela proliferação desregulada de células precursoras sanguíneas de origem mielóide ou linfóide, podem ser agudas, quando possuem um baixo grau de diferenciação, ou crônicas, com alto grau de diferenciação (SMITH *et al.*, 2005). As leucemias agudas representam 30% das neoplasias pediátricas, sendo as mais frequentes em indivíduos com menos de 15 anos (RIES *et al.*, 1998; EDEN, 2010; WIEMELS, 2012).



**Figura 2: Hematopoiese.** As células do sangue são derivadas de progenitores multipotenciais. Alterações na sua formação podem levar ao desenvolvimento de leucemias (adaptado de WIEMELS, 2012).

A leucemia linfóide aguda (LLA) corresponde a aproximadamente três quartos de todos os casos de leucemias em crianças, com frequência cinco vezes maior que a leucemia mielóide aguda (LMA) nessa população (BELSON *et al.*, 2007). Cerca de 85% dos casos de LLA são de linhagem de células B, enquanto os 15% restantes

são de linhagem de células T (ZHAO *et al.*, 2013). A LLA possui uma incidência ligeiramente maior em meninos do que meninas, e um pico de casos que acomete crianças com idades entre 2 e 6 anos (RIES *et al.*, 1998; BELSON *et al.*, 2007; EDEN, 2010). Já a LMA possui um pico de incidência durante o primeiro ano de vida e reduz constantemente até os quatro anos de idade, mantendo-se assim por toda infância e sem apresentar diferenças entre gêneros (GURNEY, 1995; EDEN, 2010).

Nas últimas quatro décadas houve um aumento significativo nos índices de sobrevivência de crianças com câncer, sendo a LLA o tipo tumoral em que mais avanços diagnósticos foram realizados (SMITH, 2010). No início da década de 60 houve um aumento no número de sobreviventes a longo prazo devido, principalmente, ao início da utilização de combinações quimioterápicas. Além disso, foram introduzidas ao tratamento de LLA a quimioterapia intratecal e a radioterapia profilática no sistema nervoso central (SNC), visto que é muito comum as crianças terem recaídas da doença no SNC no período de remissão da medula óssea (PINKEL, 1971).

Quase 90% das crianças com LLA atingem a cura (PUI *et al.*, 2010), enquanto para LMA esse índice varia entre 60% e 70% dos pacientes (TASIAN *et al.*, 2014). Entretanto, aproximadamente 25% a 30% das crianças com LLA apresentam recidiva da doença (DEN BÔER *et al.*, 1999; PUI, 2000) e menos de 50% dos pacientes de alto risco apresentam sucesso terapêutico, mesmo quando utilizada uma terapia intensiva (ZAGO *et al.*, 2001). Pacientes diagnosticados com LMA apresentam dados parecidos, sendo que a recaída desse tipo de leucemia é responsável por mais da metade das mortes relacionadas a essa doença na infância (MOORE *et al.*, 2013). Mecanismos farmacocinéticos que reduzem o tempo ou níveis de exposição dos blastos leucêmicos aos fármacos citotóxicos, e a resistência celular a medicamentos são alguns fatores que podem explicar a falha no tratamento desses pacientes (PIETERS *et al.*, 1997).

A LLA é mais comum em meninos, e apesar dessa predominância, o prognóstico para as meninas é ligeiramente melhor. Uma das razões para isso é a ocorrência de recaída testicular nos meninos, apesar de que eles também aparentam ter maior risco de recaídas na medula óssea e no SNC, por razões ainda não compreendidas (PUI *et al.*, 1999; SHUSTER *et al.*, 1998). A medula óssea é o local mais comum de apresentar recidiva da doença, sendo o SNC e os testículos outros locais freqüentes (GAYNON, 2005; CHESSELS, 1998). Pacientes que

desenvolvem uma recidiva extramedular isolada apresentam melhor prognóstico do que aqueles que têm uma recidiva envolvendo a medula (EINSIEDEL *et al.*, 2005).

Em meados das décadas de 70 e 80 novas estratégias foram adotadas para que o número de sobreviventes de leucemias se mantivesse elevado e visando a redução de efeitos colaterais tardios, o que incluiu a incorporação de novos agentes quimioterápicos combinados com um atraso na fase de intensificação da quimioterapia, redução na intensidade e no tempo de duração dos tratamentos, assim como a busca por uma remissão no SNC sem a necessidade de radioterapia e, mais recentemente, o desenvolvimento de novas terapias, como a imunoterapia (ROBISON, 2011; TASIEN *et al.*, 2014). Para grande parte dos pacientes, a terapêutica preconizada consiste em quimioterapia, mas, em muitos casos, se faz necessário a associação com transplantes hematopoiéticos e radioterapia, sendo esses em menor número. Os esquemas terapêuticos atuais são geralmente constituídos por quatro componentes: indução, intensificação-consolidação, manutenção e prevenção da leucemia no sistema nervoso central (RADAELLI *et al.*, 2005). Alguns fatores prognósticos são utilizados na estratificação de risco dos pacientes, os mais comumente avaliados são idade, contagem de células brancas no sangue, anormalidades genéticas e resposta inicial à terapia de indução (ZHAO *et al.*, 2013; RUBNITZ *et al.*, 2012). No entanto, devido à heterogeneidade da leucemia na resposta terapêutica e ao subsequente risco de recaída, há uma clara necessidade do delineamento de biomarcadores de susceptibilidade para posterior otimização na terapia antineoplásica (MARSHALL *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2005).

Os avanços no tratamento de LLA evidenciaram a necessidade de investigar a morbidade e a mortalidade a longo-prazo associadas às novas terapias, visto que crianças que sobreviveram a uma leucemia têm maiores riscos de apresentar uma segunda neoplasia no futuro (ROBISON, 2011). Atualmente, já é considerada rara a ocorrência de uma recaída testicular ou em um local extramedular fora do SNC, entretanto, ainda há um alto risco de recaídas dentro do próprio SNC, que pode ser atribuída à terapia intratecal inadequada, durante a indução da remissão e pós-remissão, e a uma baixa intensidade na terapia sistemática (PUI, 2010). Além disso, crianças que já tiveram LLA apresentam maior risco de desenvolver doenças crônicas, incluindo déficit neurológico, alterações endócrinas, insuficiência cardíaca, obesidade, entre outras (ROBISON, 2011).



### 1.3. Novos alvos moleculares

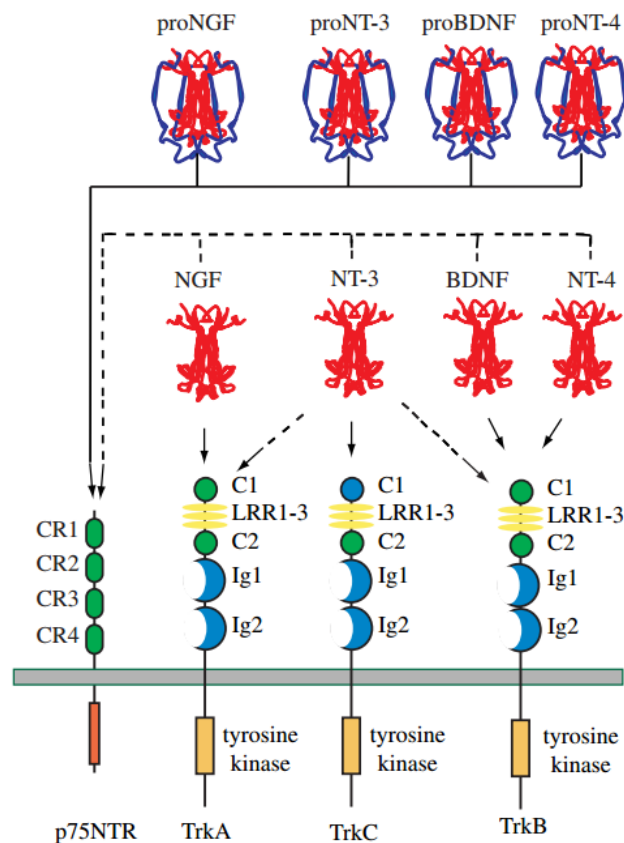
Avanços na compreensão da genética do câncer, na descoberta de biomarcadores e na incorporação de novos agentes alvo contribuem para melhores resultados para pacientes com câncer e na redução de toxicidade a curto e longo prazo (BERNSTEIN, 2011). A busca de terapias-alvo para o tratamento de leucemias pediátricas envolve a identificação e caracterização de novos agentes moduladores da sinalização como compostos antitumorais candidatos, e nesse aspecto as neurotrofinas desempenham papel fundamental.

#### 1.3.1. Neurotrofinas

As neurotrofinas, as quais incluem o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF), a neurotrofina 3 (NT-3), a neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e seus receptores, receptores de quinase relacionados a tropomiosina (*tropomyosin related kinase*, ou Trk) são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação, apoptose e plasticidade neuronal (KAPLAN & MILLER, 2000; HUANG & REICHARDT, 2001). Além disso, também estão envolvidas na diferenciação de linfócitos B, formação de vasos sanguíneos, inibição e diferenciação de músculo esquelético, migração de células de *Schwann*, liberação de histamina e no processo oncogênico (OTTEN *et al.*, 1989; NASSENSTEIN *et al.*, 2005; WAGNER *et al.*, 2005; MOUSAVI & JASMIN, 2006; ANTON *et al.*, 1994; ABUJAMRA *et al.*, 2006). BDNF promove crescimento e desenvolvimento fisiológico de linfócitos B, e esses quando ativados expressam BDNF, enquanto linfócitos T expressam p75<sup>NTR</sup> (receptor de neurotrofina p75) (HILLIS, 2014).

As neurotrofinas são inicialmente sintetizadas como proteínas precursoras, as pró-neurotrofinas, que são processadas intracelularmente, para então serem secretadas em uma forma mais madura e biologicamente ativa (MOWLA *et al.*, 2001). Os receptores específicos biologicamente ativos para as neurotrofinas são TrkA, no qual liga-se o NGF, TrkB, em que se liga o BDNF e a NT-4/5 e o TrkC, ligante da NT-3 (BOTHWELL, 1991). As neurotrofinas ligam-se seletivamente aos receptores Trk, e de forma não seletiva ao receptor p75<sup>NTR</sup>, pertencente à família dos receptores do fator de necrose tumoral, que pode agir formando um complexo

com os receptores Trk para formar sítios de ligação de alta afinidade às neurotrofinas, participando na estimulação dos processos de crescimento (ESPOSITO *et al.*, 2001; LONGO & MASSA, 2013). Além disso, p75<sup>NTR</sup> possui alta afinidade de ligação com pró-neurotrofinas e induz apoptose interagindo com sortilina, um terceiro receptor recentemente descrito (COHEN-CORY *et al.*, 2010; HILLIS, 2015). Dessa maneira, tanto neurotrofinas, quanto pró-neurotrofinas podem utilizar receptores distintos para mediar diferentes ações neuronais (LEE *et al.*, 2001). Frequentemente, os receptores Trk e p75<sup>NTR</sup> estão expressos na mesma célula, coordenando e modulando as respostas neuronais às neurotrofinas (KAPLAN & MILLER, 2000). Diferentes órgãos são responsáveis por sintetizar neurotrofinas, sendo que Trks são importantes durante o desenvolvimento normal dos rins, da próstata, de linfócitos B, de células precursoras derivadas do endotélio na medula óssea, além de influenciarem a diferenciação do coração, dos músculos e dos ovários (THIELE, 2009). Além disso, células tronco embrionárias expressam TrkB e TrkC, e sua sobrevivência e clonabilidade é em grande parte dependente da expressão dos seus respectivos ligantes no meio (GREENE & KAPLAN, 1995).



**Figura 3: Ligação das neurotrofinas aos receptores.** As neurotrofinas ligam-se aos receptores Trk de maneira específica, e possuem uma ligação não seletiva ao receptor p75<sup>NTR</sup> (REICHARDT, 2006).

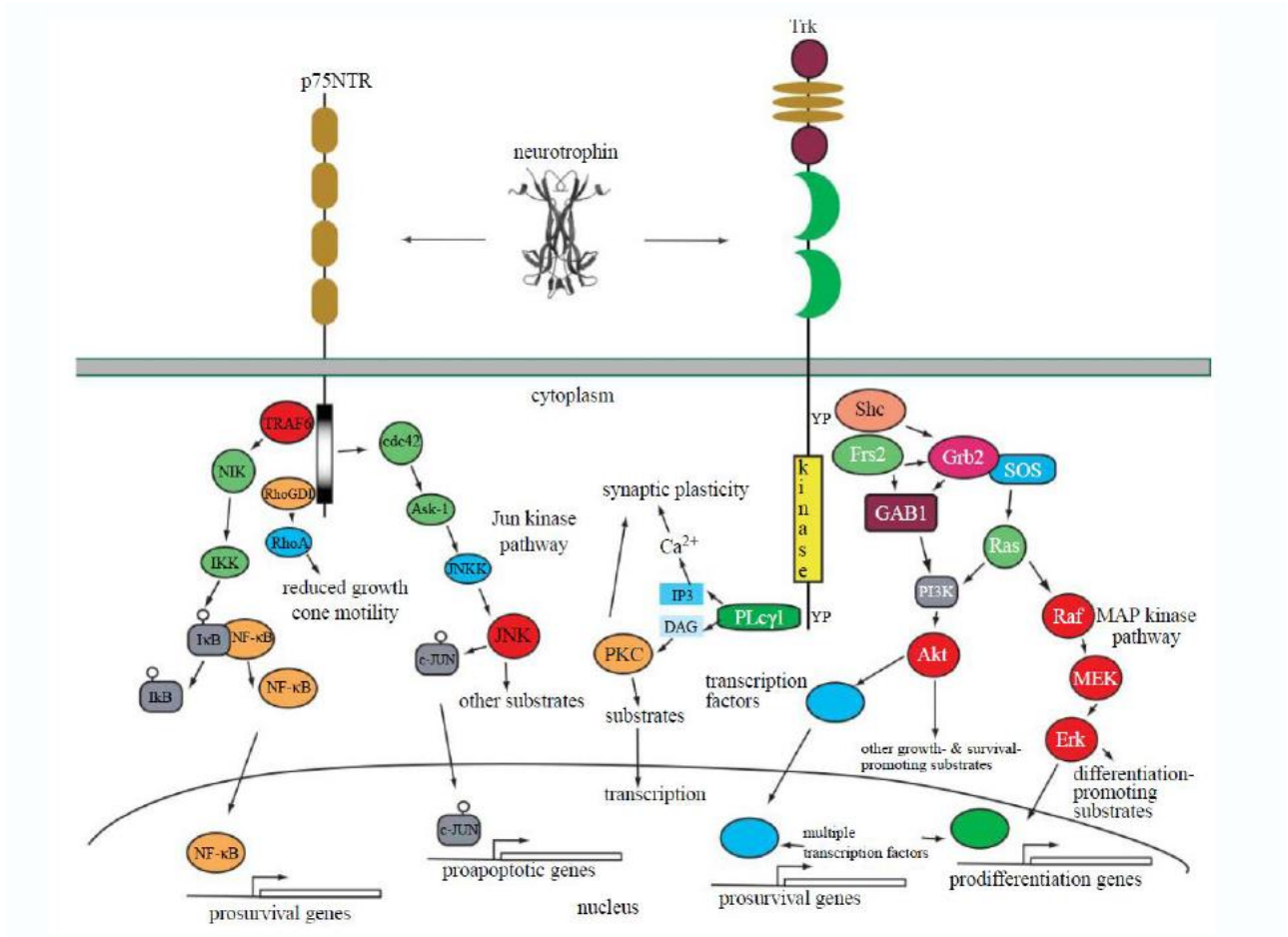
A sinalização celular através dos receptores Trk ocorre pela fosforilação de resíduos citoplasmáticos de tirosina no domínio intracelular, de modo que a ligação de neurotrofinas aos receptores Trk leva ao recrutamento de proteínas que interagem com os resíduos de fosfotirosina nos domínios citoplasmáticos (DESMET & PEPEER, 2006). Essas interações levam à ativação de diferentes vias de sinalização, incluindo de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), fosfolipase C gama (PLC- $\gamma$ ) e proteína quinase C (PKC), resultando assim, na expressão do gene, sobrevivência neuronal e crescimento de neuritos (KAPLAN & MILLER, 2000; HUANG & REICHARDT, 2001). Devido ao papel desempenhado por essas vias de sinalização no contexto de proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, a ativação, principalmente de TrkB pode afetar esses processos celulares. A ativação da sinalização de MAPK mediada por TrkB promove a diferenciação de células progenitoras corticais em neurônios, enquanto a ativação de PLC- $\gamma$ , PKC e PI3K aumenta a sobrevivência de neurônios da camada granular do cerebelo em cultivos celulares (ZIRRGIEBEL *et al.*, 1995; BARNABE-HEIDER, 2003). Em fibroblastos, a ativação de PLC- $\gamma$  e MAPK por TrkB leva a um aumento na proliferação e sobrevivência celular, já uma ativação de PI3K contribui para a resistência a anoikis (apoptose induzida pela falta de aderência à matriz extracelular) de células epiteliais (MCCARTY & FEINSTEIN, 1999; DOUMA *et al.*, 2004).

A ativação das vias de transdução de sinal é influenciada pela concentração e pelo tipo de neurotrofina expressa no local, pela co-expressão de variantes Trk, receptor p75<sup>NTR</sup> e receptores auxiliares, e pela ativação de receptores acoplados à proteína G (THIELE, 2009). As funções dos receptores de neurotrofinas podem variar do desenvolvimento do sistema nervoso para a regulação da sobrevivência neuronal à regeneração de neurônios lesados. Sendo assim, tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou Trk quanto uma sinalização desregulada via Trk podem levar à tumorigênese (LI *et al.*, 2009). Enquanto a sinalização associada aos

receptores Trk envolve sinais positivos, como sobrevivência e crescimento neuronal, o receptor p75<sup>NTR</sup> transmite sinais positivos e negativos. Dessa forma, a transmissão de sinal desses dois receptores pode ser sobreposta ou oposta. No entanto, o mecanismo utilizado por esses receptores para aprimorar ou suprimir as ações um do outro ainda permanece desconhecido (LI *et al.*, 2009; KAPLAN & MILLER, 2000).

Nas últimas décadas têm-se estudado a importância do papel das neurotrofinas durante a hematopoiese normal e no desenvolvimento de doenças hematológicas malignas. As neurotrofinas são secretadas por diversas células do sistema imune, sendo capazes de atuar de uma maneira autócrina ou parácrina em linfócitos B (HILLIS, 2015). O BDNF de células do estroma da medula óssea promove a maturação de células pré-B através da sinalização por TrkB (SCHUMANN, 2005). Além disso, as neurotrofinas estão envolvidas na proliferação celular através do seu efeito anti-apoptótico, de modo que o BDNF pode reduzir a apoptose em linhagens maduras de células B durante a privação de soro (D'ONOFRIO, 2000). Nessas mesmas linhagens celulares, também já foi descrito que pró-BDNF induz apoptose *in vivo* (FAUCHAIS *et al.*, 2008).

O BDNF sanguíneo pode originar-se em partes pela produção cerebral e posterior liberação através da barreira hemato-encefálica ou então a partir da síntese em diferentes populações de células periféricas, tais como células endoteliais vasculares e células do músculo liso, em adição aos leucócitos (PAN *et al.* 1998, NAKAHASHI *et al.* 2000).



**Figura 4: Sinalização de neurotrofinas.** (REICHARDT, 2006).

### 1.3.2. Neurotrofinas e Câncer

Neurotrofinas iniciam sinais mitogênicos que facilitam o crescimento tumoral, desempenhando um papel importante na progressão do câncer, estando envolvidas na regulação da angiogênese e prevenindo apoptose, facilitando assim a propagação de células tumorais levando à metástase (SINGER *et al.*, 1999; ASTOLFI *et al.*, 2001; EGGERT *et al.*, 2000; MENTER *et al.*, 1994). Além disso, neurotrofinas podem aumentar ou suprimir o crescimento tumoral dependendo do tipo do tumor a que se relacionam (KRÜTTGEN *et al.*, 2006).

Níveis elevados de neurotrofinas e/ou seus receptores, suficientes para estimular a migração, a diferenciação e a proliferação celular, foram observados em tumores do sistema nervoso, fornecendo mecanismos de resistência ao tratamento quimioterápico e contribuindo para formação de metástases (WADHWA *et al.*, 2003).

Membros da família Trk foram encontrados em vários tipos celulares não neurais e também podem desempenhar um importante papel na iniciação, progressão e metástase de tumores, como neuroblastoma, carcinoma medular de tireóide e câncer de mama (LI *et al.*, 2009). Muitos estudos têm demonstrado a expressão de neurotrofinas em diversos tumores pediátricos, como por exemplo, em tumores do sistema nervoso central e periférico, retinoblastomas e tumores renais (SCHMIDT *et al.*, 2010, de FARIAS *et al.*, 2011; EGGERT *et al.*, 2001).

Os receptores Trk têm sido associados como fatores de prognóstico em tumores (LI *et al.*, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de oncogênese mediada por alterações na sinalização de Trk. Em contraste ao papel de TrkB em câncer, p75<sup>NTR</sup> parece ter funções tanto promotoras quanto supressoras de tumor, dependendo do tipo de câncer (TANAKA, 2014). Li e colaboradores (2009) também mostraram que os receptores Trk e seus respectivos ligantes também são expressos em diferentes estágios da hematopoiese, promovendo a proliferação e sobrevivência de linfócitos e monócitos/macrófagos. Além disso, tem sido proposto que as NT possam contribuir para o desenvolvimento de malignidades de células B linfóides (HILLIS *et al.*, 2015).

Muitos tumores pediátricos, como por exemplo, neuroblastomas, meduloblastomas e gliomas expressam neurotrofinas e/ou seus receptores, estimulando a proliferação e migração celular, contribuindo à metástase, e tornando as células resistentes à quimioterapia (FENG *et al.*, 2001; MIDDLEMAS *et al.*, 1999; WADHWA *et al.*, 2003; WASHIYAMA *et al.*, 1996). Além disso, observa-se que a ativação de Trk age em sinergismo com outras vias de sinalização (QIU *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que o antagonista de Trks diminui a tumorigenicidade das células tratadas, além de induzir apoptose (PEREZ-PINERA *et al.*, 2007), e níveis séricos de BDNF correlacionam-se positivamente com a agressividade do tumor (YANG *et al.*, 2006).

Em linhagens celulares de retinoblastoma, também foi analisada a expressão de neurotrofinas e seus receptores, onde o antagonista de Trks, K252a, foi capaz de inibir a proliferação e diferenciação celular (STEPHAN *et al.*, 2008). Além disso, em tumores de Wilms, a expressão de neurotrofinas e seus receptores foi constatada e associada a um pior prognóstico quando comparada a tumores com menor expressão do receptor. E ainda, que a sobrevida em cinco anos livre de recidiva foi

de 100% *versus* 65% entre tumores que expressavam baixa *versus* alta concentração de TrkB (EGGERT *et al.*, 2001).

Outro estudo demonstrou que é bem provável que a expressão diferencial de receptores Trk e a ativação do seu respectivo sinal de transdução afetam diretamente o comportamento biológico das células, o que leva a diferenciação, sobrevivência e/ou proliferação. Tumores com TrkB funcional, por exemplo, podem ser particularmente agressivos porque TrkB fornece uma vantagem de crescimento e pode protegê-los da quimioterapia (LI *et al.*, 2009).

A sinalização BDNF/TrkB está associada com progressão tumoral metástase e resposta à quimioterapia em diversos tipos de câncer (TANAKA, 2014). Chiaretti e colaboradores (2004) encontraram níveis elevados de BDNF em amostras de fluido cérebro-espinhal de pacientes com astrocitomas de baixo grau e ependimomas, porém a expressão no tecido tumoral apresentava-se inalterada quando comparada com dados de pacientes sem doença neoplásica. Além disso, foi demonstrado pelo nosso grupo, que linhagens celulares de meduloblastoma humanas tiveram a viabilidade celular inibida após o tratamento com BDNF recombinante humano (SCHMIDT *et al.*, 2010). Em neuroblastomas, muitos estudos têm demonstrado que a co-expressão de BDNF e TrkB está relacionada a um prognóstico desfavorável e à resistência à quimioterapia nos pacientes acometidos por esse tumor (HO *et al.*, 2002).

Li e colaboradores (2009) demonstraram a expressão aumentada de três tipos de receptores Trks em pacientes adultos diagnosticados com leucemia aguda recidivada e nos casos de segunda neoplasia. Neste mesmo estudo também foi observada a co-expressão de BDNF e TrkB em mais de 50% dos casos, e os pesquisadores sugerem que essa co-expressão possa ser um fator fundamental no desenvolvimento da doença. Além disso, o estudo também demonstrou que a co-expressão de TrkB/BDNF está associada com pior prognóstico em pacientes adultos com leucemia aguda e pode induzir leucemia em modelo murino.

Outro estudo em camundongos demonstrou redução significativa de linfócitos B no sangue, baço e medula óssea de animais com deficiência de BDNF, e um aumento de linfócitos B após a aplicação de BDNF, sugerindo um papel importante de BDNF no desenvolvimento de linfócitos B (SCHUHMANN *et al.*, 2005). Corroborando esses dados, Maroder e colegas (1996) haviam sugerido que o BDNF

poderia atuar como um fator de sobrevivência para células precursoras do timo, e estaria envolvido no processo de diferenciação de timócitos.

As neurotrofinas constituem parte de mecanismos pró-sobrevivência de células tumorigênicas. Linhagens celulares de linfoma de Burkitt apresentaram alteração na apoptose e na quimiossensibilidade quando submetidas à supressão de BDNF(XIA, 2014). BDNF também se apresentou como um fator protetor para apoptose e para a ação de agentes quimioterápicos em linhagens de mieloma múltiplo (FAUCHAIS *et al.*, 2008; PEARSE, 2005). Além disso, a inibição de Trk pode induzir apoptose em células B ativadas de linfoma difuso de grandes células B, visto que há uma correlação entre as expressões de TrkB, p75<sup>NTR</sup> e BDNF nessa doença, pode-se inferir a formação de um eixo pró-sobrevivência (SNIDERHAN, 2009). BDNF também parece exercer um efeito anti-apoptótico através da via da sortilina em linhagens de células B (FAUCHAIS *et al.*, 2008).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Examinar, em leucemias pediátricas, o possível papel de BDNF plasmático como biomarcador e possível alvo terapêutico em leucemias pediátricas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar os níveis de BDNF em amostras de sangue periférico e medula óssea de leucemias linfóides e mielóides agudas pediátricas obtidas ao diagnóstico (D0) e em diferentes momentos do tratamento;

- Correlacionar os níveis de BDNF com características clínicas dos pacientes;

- Caracterizar os efeitos de agonistas e antagonistas de neurotrofinas sobre a viabilidade celular de culturas de linhagens de leucemias e de culturas primárias de leucemias agudas pediátricas ao diagnóstico e no momento de indução do tratamento;

- Caracterizar o efeito de antagonistas de neurotrofinas e inibidores de vias de sinalização na viabilidade de culturas de linhagens de leucemias e de culturas primárias de leucemias agudas pediátricas ao diagnóstico e no momento de indução do tratamento.

### 3. ARTIGO

**Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia.**

Situação: Publicado

Revista: Cancer Biomarkers

Ano: 2016

Volume: 17

Páginas: 347-352

# Low brain-derived neurotrophic factor levels are associated with active disease and poor prognosis in childhood acute leukemia

Júlia Plentz Portich<sup>a,b,1</sup>, Mirela Severo Gil<sup>a,b,1</sup>, Rafael Pereira dos Santos<sup>a,b,c</sup>, Bruno Kilpp Goulart<sup>d</sup>, Maria Beatriz Cardoso Ferreira<sup>b</sup>, Jiseh Fagundes Loss<sup>e</sup>, Lauro José Gregianin<sup>e,f</sup>, Algemir Lunardi Brunetto<sup>c</sup>, André Tesainer Brunetto<sup>c</sup>, Rafael Roesler<sup>a,b</sup> and Caroline Brunetto de Farias<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup>*Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>c</sup>*Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>d</sup>*Medical Laboratory, Parque Belém Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>e</sup>*Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>f</sup>*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

## Abstract

**BACKGROUND:** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, tropomyosin-related receptor kinase B (TrkB) are involved in the maturation of B lymphocytes in the bone marrow (BM), promote cell differentiation in B-cell malignancies, and are associated with poor prognosis in adults with acute leukemia (AL). However, the role of BDNF in pediatric AL remains poorly understood.

**OBJECTIVE:** We carried out a cohort observational study to evaluate BDNF levels in BM or peripheral blood (PB) samples from children with AL.

**METHODS:** BM or PB samples were collected from 57 children and adolescents with acute lymphoid leukemia (ALL), 14 children and adolescents with acute myeloid leukemia (AML), and 44 healthy individuals (HI) of the same age range.

**RESULTS:** BDNF levels at diagnosis in AL patients were significantly lower when compared to HI. Samples from patients in complete remission from disease had higher levels of BDNF compared to those obtained from patients with malignant cells. Moreover, BDNF levels at diagnosis in patients who died were significantly lower compared to those found in survivors.

**CONCLUSIONS:** These findings provide the first evidence for a possible role of BDNF as a marker of active disease and poor prognosis in pediatric AL.

Keywords: Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin, acute lymphoid leukemia, acute myeloid leukemia

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Caroline Brunetto de Farias, Children's Cancer Institute and Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33597616; Fax: +55 51 33598012; E-mail: labpesquisa@icl-rs.org.br, carolbfarias@gmail.com.

## 1. Background

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the neurotrophin (NT) family of molecules that acts by binding to the tropomyosin-related receptor kinase B (TrkB) and pan-NT p75 (p75<sup>NTR</sup>) types of cell surface receptors [1]. Signaling mediated by

Table 1

Gender and age in healthy individuals (HI,  $n = 44$ ) and patients with acute myeloid leukemia (AML,  $n = 14$ ) or acute lymphoid leukemia (ALL,  $n = 57$ ; 115 children in total)

Characteristic	HI	AML	ALL	Total
Gender	$n = 44$ (%)	$n = 14$ (%)	$n = 57$ (%)	$n = 115$ (%)
Male <sup>a</sup>	20 (45.5)	12 (85.7)	42 (73.6%)	74 (64.3%)
Age <sup>b</sup> (years <sup>c</sup> )	11.13 ± 6.64 (0.02–19.00)	9.57 ± 7.3 (0.48–23.21)	8.62 ± 4.86 (0.97–19.74)	9.77 ± 5.98 (0.02–23.21)

<sup>a</sup> $p = 0.003$ , Chi-Square Test. <sup>b</sup> $p = 0.143$ , One-way ANOVA. <sup>c</sup>Mean ± SD (minimum and maximum values).

BDNF/TrkB plays a well-established role in neuronal development and plasticity [2], but recently it has also been associated with tumor progression, metastasis, and response to chemotherapy in several cancer types [1,3,4]. BDNF promotes cell proliferation, differentiation and survival in B-cell malignancies [5]. Co-expression of BDNF/TrkB in malignant cells is associated with poor prognosis in adult patients with acute leukemia (AL) [6]. However, the role of BDNF in pediatric AL remains poorly understood. We examined BDNF levels in the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of children with AL and their possible relationship with clinical characteristics.

## 2. Methods

### 2.1. Patients and BDNF measurement

We carried out a cohort observational study between August 2009 and February 2015. The convenience sample consisted of patients with ages ranging from 0 to 18 years, admitted to the Pediatric Oncology Service at the UFRGS Clinical Hospital (HCPA/UFRGS, Porto Alegre, Brazil), with diagnosis of acute myeloid leukemia (AML) or acute lymphoid leukemia (ALL), regardless of treatment phase. Healthy children and adolescents aged 0–18 years who performed routine blood count tests from an outpatient clinic composed the control group (healthy individuals, HI). Informed consent was obtained for all individuals. The study was approved by the Research Ethics Committee (project #08511/130023). Demographic variables were retrieved from medical records (Tables 1 and 2). In controls, PB was collected in a single moment. Samples from patients with leukemia were obtained at diagnosis and/or during different treatment stages and follow-up, depending on the availability. To measure BDNF levels, four ml of BM or PB were collected, and an enzyme immunoassay sandwich kit was used (*Chemicon International, ChemiKine, USA, CYT306*), following the manufacturer's instructions.

### 2.2. Statistics

Statistical analysis was performed using SPSS Software 18.0 and GraphPad Prism Software 6.0. Data were expressed as absolute frequency, percentage, mean ± SD or medians and 25/75 percentiles. Normality analysis was performed using Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Mann-Whitney *U* tests were used for nonparametric comparisons between two groups. Comparisons among more than two groups were carried out with one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis tests for parametric and nonparametric data respectively. Chi-square tests were used to analyze associations between variables, and Kaplan-Meier analysis was performed to evaluate survival;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

A total of 217 samples were collected from 115 children. One hundred and fourteen BM samples and 59 PB samples were obtained from 71 patients with AL. PB was obtained from 44 HI. Fifty-seven patients (80%) had ALL, being 11 (20%) from T-lineage, 42 (73%) from B-lineage and 4 (7%) from other origins. Fourteen patients (20%) had AML.

Seventy-four (64.3%) subjects were male, being 20 (45.5%) in the HI group, 12 (85.7%) in the AML group and 42 (73.6%) in the ALL group. The mean age at inclusion was  $9.77 \pm 5.98$  years (minimum: 0.02 years; maximum: 23.21 years). There was a statistically significant gender difference among groups ( $p < 0.05$ ), but no difference in age ( $p = 0.14$ ) (Table 1).

PB samples from HI were compared with BM or PB from leukemia patients. In each analysis, either a BM sample or a PB sample from each single patient was used (preferentially BM, if available). BDNF values from PB and BM samples from the same patient at the same treatment phase were similar (10 PB samples and 10 BM samples from 10 patients at the same treatment stage were analyzed;  $p = 0.90$ ; Mann-Whitney *U*

Table 2  
 Characteristics of patients with acute myeloid leukemia (AML,  $n = 14$ ), or acute lymphoid leukemia (ALL,  $n = 57$ ; 71 children in total)

Characteristic	Total	AML	ALL	<i>p</i> value
Follow-up length (years) <sup>a</sup>	3.67 (0.76/4.16)	1.21 (0.67/4.45)	3.77 (0.83/4.07)	0.91 <sup>b</sup>
Death	16 (22.5%)	06 (42.8%)	10 (17.5%)	0.0001 <sup>c</sup>
Recurrence	19 (26.7%)	04 (28.5%)	15 (26.3%)	0.86 <sup>c</sup>
Risk <sup>#</sup>				0.0001 <sup>c</sup>
High	45 (63.4%)	11 (78.6%)	34 (59.6%)	
Intermediary	03 (4.2%)	0 (0%)	03 (05.3%)	
Low	23 (32.4%)	03 (21.4%)	20 (35.1%)	
Bone marrow transplantation	10 (14.1%)	04 (28%)	06 (10.5%)	0.08 <sup>c</sup>
Leucocytes <sup>a,d</sup>	4450 (2205/20915)	3755 (1300/21832,5)	4450 (2645/18525)	0.58 <sup>b</sup>
Platelets <sup>a,d</sup>	97525 (32750/171000)	53000 (21000/151925)	103500 (36000/174000)	0.26 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Median (interquartile range); <sup>b</sup>Mann-Whitney test; <sup>c</sup>Chi-square test; <sup>d</sup>At patient's inclusion on the trial

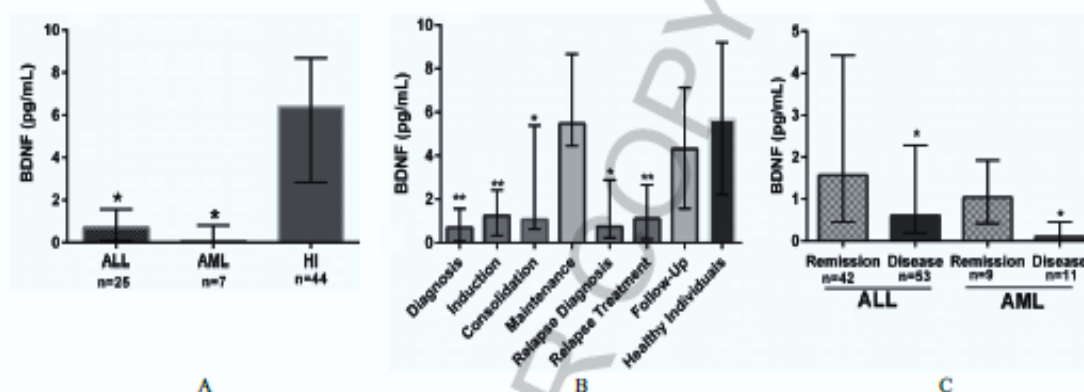


Fig. 1. BDNF levels are reduced in active phases of the disease in patients with pediatric leukemia (A) Median (interquartile range) of BDNF level (pg/mL) in BM samples at diagnosis from patients with ALL or AML, and in PB samples from HI; \* Significant difference compared to HI ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney *U* Test). (B) Median (interquartile range) of BDNF level (pg/mL) in BM or PB samples from patients with ALL at different disease and treatment stages, compared to the level in PB samples from HI. Diagnosis:  $n = 25$ ; induction:  $n = 24$ ; consolidation:  $n = 8$ ; maintenance:  $n = 9$ ; relapse:  $n = 8$ ; treatment after relapse:  $n = 9$ ; follow-up:  $n = 13$ ; \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , significant difference compared to HI, Mann-Whitney *U* Test. (C) Median (interquartile range) of BDNF level (pg/mL) in PB or BM samples from patients with ALL ( $n = 95$ ) or AML ( $n = 20$ ). Samples were classified as in complete remission of the disease (remission) or positive for malignant cells (disease) according to immunophenotyping results. Each patient could provide more than one sample, obtained at different treatment stages; \*  $p < 0.05$ , significant difference compared to remission in the same disease group, Mann-Whitney *U* Test. Abbreviations: ALL, acute lymphoid leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BM, bone marrow; HI, healthy individuals; PB, peripheral blood.

Test). Therefore BM and PB samples from ALL patients were merged within a single group.

BDNF levels at diagnosis in ALL and AML patients were significantly lower when compared to HI ( $p < 0.001$ ; Fig. 1A). Similar results were observed when patients with ALL at diagnosis ( $p < 0.001$ ), induction ( $p < 0.001$ ), consolidation ( $p < 0.05$ ), diagnosis of relapse ( $p < 0.001$ ) and relapse treatment ( $p < 0.001$ ), were compared to HI. In contrast, there was no difference of BDNF levels among HI (controls) and patients undergoing maintenance ( $p = 0.74$ ) or follow-up ( $p = 0.28$ ; Fig. 1B). These findings suggest that higher BDNF levels may be related to disease-free intervals. Consistent with this possibility, BDNF levels in ALL and AML patients in complete remission from disease were higher compared to those obtained from

those with positive malignant cells ( $p < 0.05$ ; Fig. 1C). Active disease was defined according to immunophenotyping or myelogram when no immunophenotyping was available. Active disease was defined by the presence of leukemic cells or minimal residual disease.

In addition, BDNF levels at diagnosis in ALL patients who died were significantly lower compared to those found in survivors ( $p < 0.05$ ; Fig. 2A), suggesting that low BDNF may be associated with poor prognosis. There was no significant difference in BDNF values among patients with high, intermediary or low risk at either diagnosis ( $p = 0.32$ ) or maintenance ( $p = 0.17$ ; Table 3). Risk stratification was carried out by the medical team based on clinical, laboratorial and BM findings, according to standard protocols. Moreover, there was no difference between patients with

Table 3  
Comparison of BDNF levels in PB or BM samples according to risk stratification, recurrence of the disease and death

Characteristics	BDNF at Diagnosis	<i>p</i> value	BDNF at Maintenance	<i>p</i> value
Risk		0.32 <sup>a</sup>		0.17 <sup>c</sup>
High <sup>b</sup>	<i>n</i> = 16 0.55 (0.17/0.81)		<i>n</i> = 6 3.22 (0.58/6.64)	
Intermediary <sup>b</sup>	<i>n</i> = 3 0.26 (0.04/1.67)		<i>n</i> = 0	
Low <sup>b</sup>	<i>n</i> = 13 3.55 (0.05/5.07)		<i>n</i> = 4 6.86 (4.47/14.76)	
Relapse		0.26 <sup>c</sup>		0.67 <sup>c</sup>
Yes <sup>b</sup>	<i>n</i> = 3 0.06 (0.001/0.7)		<i>n</i> = 7 4.7 (0.61/8.97)	
No <sup>b</sup>	<i>n</i> = 29 0.53 (0.04/1.2)		<i>n</i> = 3 4.4 (1.85/6.26)	
Death		0.05 <sup>c</sup>		0.51 <sup>c</sup>
Yes <sup>b</sup>	<i>n</i> = 7 0.06 (0.001/0.76)		<i>n</i> = 2 4.05 (1.85/6.26)	
No <sup>b</sup>	<i>n</i> = 25 0.86 (0.13/2.19)		<i>n</i> = 11 7.28 (4.4/8.28)	

<sup>a</sup>Kruskal-Wallis Test. <sup>b</sup>Median (P25/P75). <sup>c</sup>Mann-Whitney *U* Test.

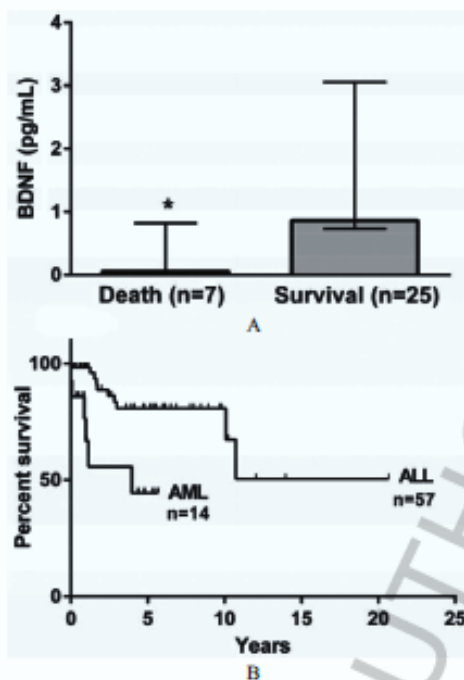


Fig. 2. Higher BDNF levels are associated with survival in patients with pediatric leukemia. (A) Median (interquartile range) of BDNF level (pg/mL) in BM or PB samples at diagnosis from patients who died (AML, *n* = 4; ALL, *n* = 3) or survived (AML, *n* = 3; ALL, *n* = 22); \* *p* < 0.05, significant difference between death and survival groups, Mann-Whitney *U* Test. Only patients for whom samples obtained at diagnosis were available were evaluated. Only disease-related causes of death were considered (leukemia, 7 patients; infections, 4 patients; bleeding, 4 patients; acute respiratory failure, 1 patient). (B) Kaplan-Meier analysis of overall survival. Data are expressed as time in years from diagnosis to death or last medical record (AML, *n* = 14; ALL, *n* = 57); *p* < 0.001, significant difference between groups in time of survival, Gehan-Breslow-Wilcoxon test. Abbreviations: ALL, acute lymphoid leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BDNF, brain-derived neurotrophic factor, BM, bone marrow; PB, peripheral blood.

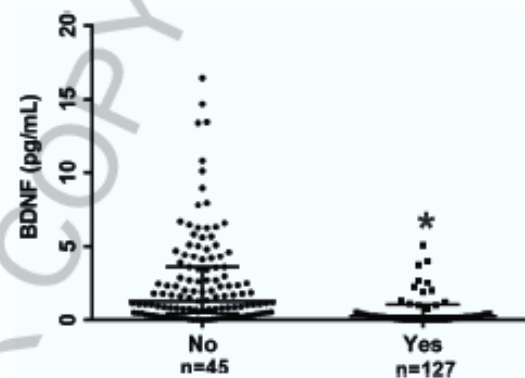


Fig. 3. BDNF levels (pg/ml) in BM and PB samples from patients who received or not platelet transfusion up to 48 h before the sample collection. Data are expressed as median (interquartile range). Dots and squares are used to show the distribution of data; \* *p* < 0.001, transfusion vs. no transfusion, Mann-Whitney *U* Test. Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BM, bone marrow; PB, peripheral blood.

B-lineage or T-lineage ALL (*p* = 0.94). At diagnosis (*n* = 32), there was no correlation between number of platelets or leucocytes and BDNF levels (*p* = 0.935 and *p* = 0.699 respectively; Chi-Square Test; Table 4). Although platelets can carry and release BDNF [7], it is noteworthy that BDNF levels were lower in patients who received platelet transfusion within 48 hours prior to sample collection compared to patients who had not received transfusion (Fig. 3).

The median follow-up time of leukemia patients was 3.67 years (25<sup>th</sup>, 0.76; 75<sup>th</sup>, 4.16). Ten (17.5%) of 57 patients in the ALL group and 6 (42.8%) of 14 in the AML group died during the study. Median survival was 3.61 and 0.99 years for ALL and AML patients, respectively. As expected, AML patients had a significant poorer prognosis (*p* < 0.001; Fig. 2B). Nineteen (26.7%) patients relapsed from the disease, being 4 in AML group and 15 in ALL group (*p* = 0.864).

Table 4  
BDNF levels according to leucocytes and platelets numbers

Diagnosis		Platelets and BDNF									
		AML					ALL				
		36000 (20500-92025) <sup>a</sup>					197500 (176250-216250) <sup>a</sup>				
		78000 (11000-132850) <sup>a</sup>					190000 (171000-209000) <sup>a</sup>				
		ALL and AML					ALL and AML				
		Sig. p = 0,94 <sup>b</sup>					Sig. p = 0,94 <sup>b</sup>				
		Total					Total				
		p25 < 0,075 (< 1,57)					p25 < 0,075 (< 1,57)				
		p75 > 1,57 (> 1,57)					p75 > 1,57 (> 1,57)				
		BDNF values					BDNF values				
		Between p25 and p75					Between p25 and p75				
		(< 0,075) (> 1,57)					(< 0,075) (> 1,57)				
		Total					Total				
		Sig. p = 0,70 <sup>b</sup>					Sig. p = 0,70 <sup>b</sup>				
		Total					Total				
		p25 < 0,075 (< 1,57)					p25 < 0,075 (< 1,57)				
		p75 > 1,57 (> 1,57)					p75 > 1,57 (> 1,57)				
		BDNF values					BDNF values				
		Between p25 and p75					Between p25 and p75				
		(< 0,075) (> 1,57)					(< 0,075) (> 1,57)				
		Total					Total				
		Sig. p = 0,59 <sup>b</sup>					Sig. p = 0,59 <sup>b</sup>				
		Total					Total				
ALL	AML	36000 (20500-92025) <sup>a</sup>	78000 (11000-132850) <sup>a</sup>	190000 (171000-209000) <sup>a</sup>	197500 (176250-216250) <sup>a</sup>	3210 (2760-3800) <sup>a</sup>	2120 (2120-2120) <sup>a</sup>				
ALL and AML	ALL and AML	10390 (2175-33110) <sup>a</sup>	75355 (21832,5-212540) <sup>a</sup>	34210 (2760-3800) <sup>a</sup>	2120 (2120-2120) <sup>a</sup>						
Leucocytes levels	Leucocytes levels	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	Between p25 and p75 (0,075-1,57)	< p25 (< 0,075)	< p25 (< 0,075)	< p25 (< 0,075)	
Normal value for age and sex	Normal value for age and sex	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
Below the normal value for age and sex	Below the normal value for age and sex	3	3	2	2	4	1	1	1	1	
Above the normal value for age and sex	Above the normal value for age and sex	7	2	4	13	0	0	0	0	0	
Total	Total	11	5	5	23	5	1	1	2	2	

<sup>a</sup>Median and interquartile range; <sup>b</sup>Pearson Chi-Square; <sup>c</sup>Leucocyte countings were not available for all patients.

#### 4. Discussion

Previous studies have not examined BDNF levels in hematological malignancies. One study found no alterations in the blood amount of BDNF after chemotherapy in women with breast cancer [8]. Expression of BDNF and TrkB has recently been described in biopsies from patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [9], and expression of p75<sup>NTR</sup> was found in 8% of adult patients with AL, particularly ALL (26%) [10].

The role of BDNF/TrkB signaling in leukemia cells remains elusive. NTs promote survival and drug resistance in malignant B-cells [5,9], and BDNF/TrkB expression is associated with the induction of leukemogenesis in a murine model of adult AL [6]. However, we found that BDNF levels were decreased in active phases of pediatric AL, and restored to normal levels during maintenance and follow-up. Given the role of Trk signaling in differentiation, it is possible that low BDNF levels contribute in keeping cells in an immature state that promotes disease progression. Further experimental studies manipulating TrkB activity in pediatric AL cells should help clarifying these issues.

In summary, the present findings provide the first evidence for a role of BDNF levels as a marker of active disease and poor prognosis in pediatric AL. These data raise the possibility, which should be investigated by further studies with larger patient cohorts, that by measuring BDNF at diagnosis we might obtain information about the risk of death, helping in guiding therapeutic decisions.

#### Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Health/CNPq/FAPERGS PPSUS grant number 1245-2551/13-0023 to C.B.F., the Children's Cancer Institute (ICI), and the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

#### Conflict of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

#### References

- [1] A. Valsinavi, A.T. Le, and R.C. Doebele, TRKING down an old oncogene in a new era of targeted therapy, *Cancer Discov.*, 5 (2015), 25-34.
- [2] E.J. Huang, and L.F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, 72 (2003), 609-642.
- [3] C.J. Desmet, and D.S. Peeper, The neurotrophic receptor TrkB: A drug target in anti-cancer therapy? *Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (2006), 755-759.
- [4] C.J. Thiele, Z. Li, and A.E. McKee, On Trk – the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology, *Clin. Cancer Res.*, 15 (2009), 5962-5967.
- [5] J. Hillis, M. O'Dwyer, and A.M. Gorman, Neurotrophins and B-cell malignancies, *Cell. Mol. Life Sci.*, 73 (2015), 41-73.
- [6] Z. Li, G. Beutel, M. Rhein, J. Meyer, C. Koenecke, T. Neumann, M. Yang, J. Krauler, N. von Neuhoff, M. Heuser, H. Diedrich, G. Göhring, L. Wilkens, B. Schlegelberger, A. Ganser, and C. Baum, High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis, *Blood*, 113 (2009), 2028-2037.
- [7] T. Burnouf, Y.P. Kuo, D. Blum, S. Burnouf, and C.Y. Su, Human platelet concentrates: A source of solvent/detergent-treated highly enriched brain-derived neurotrophic factor, *Transfusion*, 52, (2012), 1721-1728.
- [8] M.F. Aslam, Z.O. Merhi, S. Ahmed, O. Kuzbart, D.B. Setler, and H. Minkoff, Changes in plasma müllerian-inhibiting substance and brain-derived neurotrophic factor after chemotherapy in premenopausal women, *Fertil. Steril.*, 95 (2011), 1790-1793.
- [9] L. Dubanet, H. Bentayeb, B. Petit, A. Olivrie, S. Saada, M.A. de la Cruz-Morcillo, F. Lalloué, M.P. Gourin, D. Bordesoulle, N. Faumont, M. Delage-Corre, A.L. Fauchals, M.O. Jauberteau, and D. Troutaud, Anti-apoptotic role and clinical relevance of neurotrophins in diffuse large B-cell lymphomas, *Br. J. Cancer*, 113 (2015), 934-944.
- [10] G. Beutel, J. Meyer, L. Ma, S. Yin, M. Eder, N. von Neuhoff, L. Wilkens, J. Wei, B. Hertenslein, G. Heil, B. Schlegelberger, A. Ganser, Z. Li, and C. Baum, Expression of the p75 neurotrophin receptor in acute leukaemia, *Br. J. Haematol.*, 131 (2005), 67-70.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro relato referente aos níveis de BDNF em amostras de leucemias agudas pediátricas. Nosso estudo mostrou que os níveis de BDNF são significativamente menores em estágios de doença ativa quando comparadas a indivíduos saudáveis. Os níveis de BDNF mostraram-se aumentados uma vez que os pacientes tiveram resposta clínica e recuperação imunofenotípica na medula óssea. Atualmente, o prognóstico é avaliado pelas características do paciente (idade, sexo, etnia, peso), resultados de exames laboratoriais (contagem de células brancas ao diagnóstico, anormalidades cromossômicas, subtipo da doença), presença de células malignas em outros órgãos e resposta ao tratamento inicial (fase de indução) (American Cancer Society, 2015). Sendo assim, os níveis de BDNF ao diagnóstico podem emergir como um marcador prognóstico em leucemias agudas pediátricas, fornecendo informações sobre o risco de óbito do paciente e, conseqüentemente, a necessidade de estratégias de tratamentos mais agressivos.

Outro dado importante é que pacientes submetidos à transfusão de plaquetas em até 48 horas antes da coleta da amostra apresentaram níveis de BDNF baixos comparados com pacientes que não foram submetidos à transfusão. Visto que BDNF está presente em plaquetas (FUJIMURA, 2002), esperava-se que esses pacientes apresentassem níveis mais elevados de BDNF. Entretanto, supõe-se que esses pacientes estavam clinicamente mais debilitados e a transfusão não foi capaz de melhorar os níveis dessa neurotrofina.

Os baixos níveis de BDNF encontrados nas amostras de leucemia podem contribuir para a imaturidade das células e levar ao desenvolvimento e/ou manutenção da leucemia. O papel do BDNF em uma série de neoplasias está relacionado à sobrevivência tumoral, e considerando que ele também esteja envolvido com a maturação de células sanguíneas, sugere-se que nas leucemias pediátricas esteja relacionado com a diferenciação do tumor. Em tumores hematológicos de células maduras, como mieloma múltiplo, linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Burkitt, observou-se uma expressão elevada de neurotrofinas, sugerindo um mecanismo diferente de sinalização. Outra hipótese é que, em leucemias pediátricas, TrkB seja ativado por outras moléculas, além do BDNF, que estão contribuindo para a sobrevivência das células tumorigênicas. Além

disso, receptores Trk também podem estar ativados na ausência de neurotrofinas (LEE, 2001).

Sabe-se que há diferenças marcantes na hematopoiese de adultos e crianças (WILLIAMS, 2006), e a maioria dos estudos que mostram o efeito pró-sobrevivência de BDNF foram realizados em adultos. Provavelmente, existem diferentes fatores de proteção ou que cooperem para a proteção de células hematopoiéticas infantis no que diz respeito à patogênese das neoplasias (COPLEY, 2013).

A complexa interação entre neurotrofinas e seus receptores pode estar envolvida na patogênese da leucemia aguda pediátrica. Este estudo pode ser considerado um ponto de partida para aprofundar o envolvimento das neurotrofinas nessa doença, prevalente e tão heterogênea. De maneira inédita propõe-se o uso dos níveis de BDNF como um marcador prognóstico de doença ativa nas leucemias agudas infantis, porém, encorajamos novos estudos que investiguem o papel do BDNF nesse contexto.

## 5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras pretendemos avaliar a expressão de outras neurotrofinas em amostras de leucemia e avaliar as neurotrofinas como terapias-alvo através da resposta a inibidores Trk. Em um estudo pré-clínico envolvendo animais, foi observado uma redução significativa de linfócitos B no sangue periférico, no baço e na medula óssea em uma situação de deficiência de BDNF, seguido de um aumento dos linfócitos após administração de BDNF (SCHUMANN, 2005). Além disso, Sniderhan e colaboradores (2009), demonstraram que o tratamento de células em cultura com K252a, pan-bloqueador de receptores Trk, pode emergir como um novo agente terapêutico para linfoma não-Hodgkin.

### **Materiais e Métodos**

#### **Critérios de Inclusão de Pacientes**

Foram analisadas 40 amostras de pacientes ao momento do diagnóstico e mais 24 amostras do momento de indução (dias 15 e 35 após o início do tratamento - D15 ou D35). As amostras são provenientes de pacientes pediátricos (idade de zero a 18 anos) diagnosticados com leucemia linfóide aguda no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Todos os pacientes e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG # 1300-23)

#### **Coleta de Sangue e Medula Óssea**

As coletas de sangue periférico e medula óssea dos pacientes foram realizadas apenas quando houve solicitação médica para avaliação de parâmetros clínicos do paciente, minimizando assim possíveis riscos e desconfortos. Estas avaliações acontecem, geralmente, ao diagnóstico (antes do início do tratamento, dia zero; D0) e no período de indução do tratamento, dias 15 (D15) e 35 (D35).

Todos os pacientes diagnosticados com leucemia linfóide aguda foram incluídos no estudo, independente do momento. Foram coletados 4 mL de sangue periférico e/ou 4mL de medula óssea em tubos a vácuo com EDTA e processados no Laboratório de Pesquisas em Câncer (Centro de Pesquisa Experimental/HCPA).

### **Cultura Primária de Linfócitos**

Foi realizada a separação de linfócitos para todas as coletas (D0, D15 e D35). Para isso, em um tubo cônico de 15 mL, eram adicionados 4mL de amostra a 3mL de Ficoll-Paque, seguida de centrifugação a 1600 rpm durante 30 minutos. Após, o plasma da amostra foi coletado e a camada de células nucleadas transferida para outro tubo cônico, lavadas duas vezes com PBS cada, e centrifugadas por 10 minutos a 900 rpm e 670 rpm, respectivamente. Posteriormente, as células nucleadas foram ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, antibiótico 1% e antifúngico 0,1%. Após contagem do número de células em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com azul de tripan, as células foram plaqueadas, tratadas e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas.

### **Compostos Químicos**

A viabilidade celular foi avaliada utilizando os seguintes compostos: BDNF, NGF, K252a. As concentrações a utilizadas foram determinadas com base em dados da literatura e curvas de dose.

### **Cultura Celular**

As linhagens de células neoplásicas (JURKAT e MOLT-4) foram obtidas do American Type Culture Collection – ATCC (Rockville, Maryland, EUA). As células eram cultivadas em frascos estéreis de 25cm<sup>2</sup> com meio de cultura adequado (RPMI 1640, Gibco), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v), penstrepto 1% e fungizone® 0,1%. Foram plaqueadas entre 12 e 20x10<sup>4</sup> células por poço em placas de 12 poços, e 1,5x10<sup>4</sup> células por poço em placas de 96 poços. As células foram mantidas em incubadora à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Métodos de Avaliação de Viabilidade Celular**

Após o tratamento, a avaliação de viabilidade celular foi realizada pelo método de contagem com exclusão por Azul de Tripan, conforme descrito por Freshney e colaboradores (1994). Brevemente, as células eram cultivadas em placas de 12 poços, já tratadas com BDNF, NGF, K252a todos em duplicata por 72h.

Após esse período, uma alíquota de 10 $\mu$ L de cada amostra era homogeneizada manualmente a uma alíquota de 10 $\mu$ L de Tripán Blue 0,4% (Vetec, Brasil) e era realizada a contagem celular em câmara de Neubauer por microscopia óptica. As células mortas ou com danos na membrana celular são permeáveis ao corante, e desta forma a viabilidade celular é a razão entre as células não coradas (vivas) e o total de células (somatório de vivas e mortas).

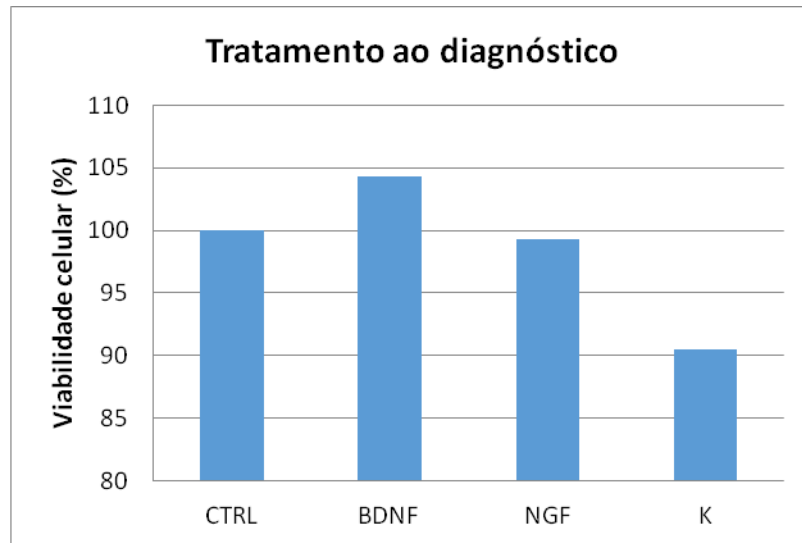
### **Tamanho Amostral e Análise Estatística**

Levando-se em consideração o número de casos novos de pacientes diagnosticados no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, estimou-se a inclusão de cerca de 40 pacientes com leucemia linfóide aguda no período de um ano. Considerando-se um intervalo de confiança de 95% e um erro beta de 80%, a amostra mínima deve constituir-se de no mínimo 26 pacientes por grupo, sendo os grupos D0 e indução.

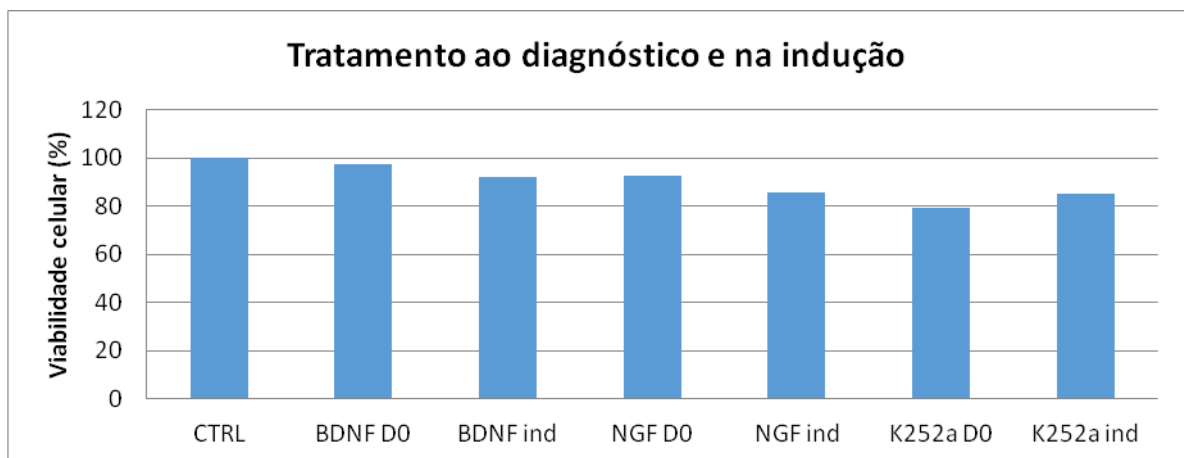
Os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Comparações entre os grupos, bem como entre os respectivos tratamentos de cada grupo com BDNF, NGF e K252a serão realizadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por testes post-hoc adequados quando o valor de P for menor que 0,05.

### **Resultados preliminares**

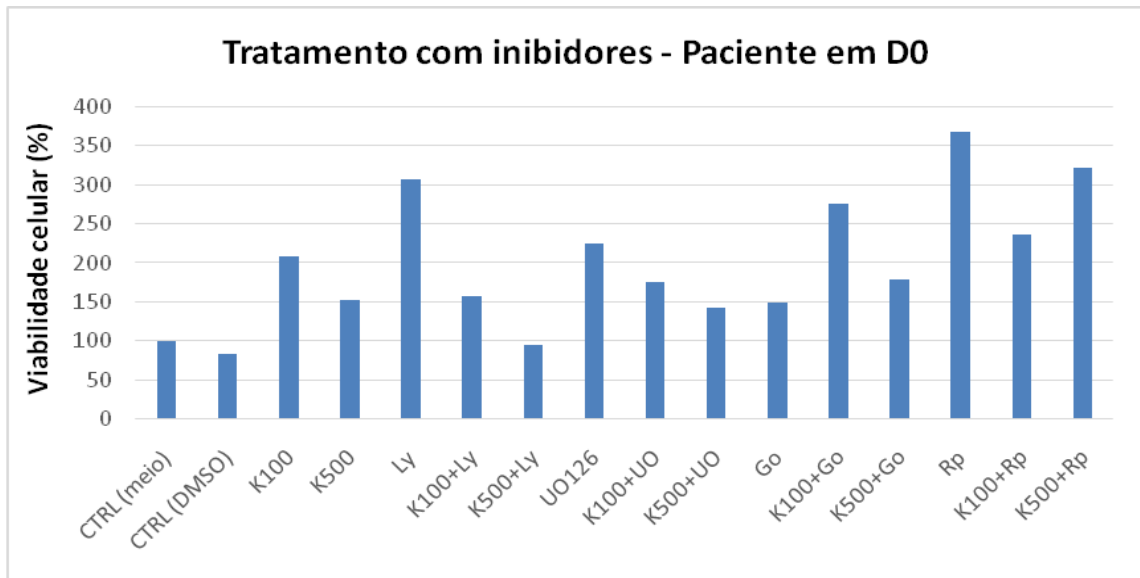
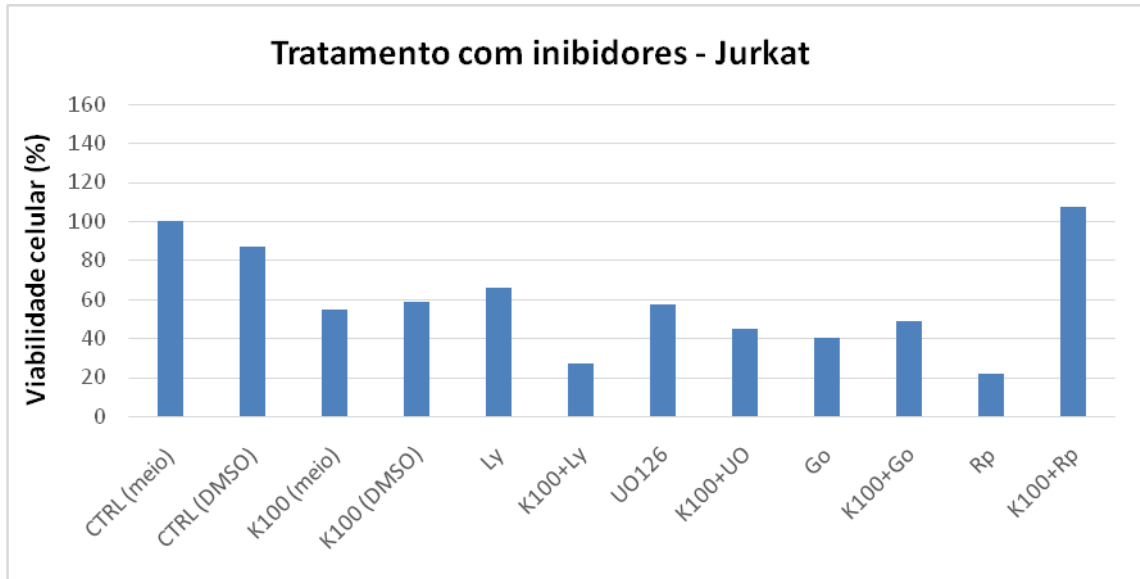
Os dados abaixo são uma apresentação em porcentagem das contagens dos pacientes, sendo o controle sempre considerado como tendo 100% de viabilidade celular e os outros tratamentos com valores em relação a ele. Devido às dificuldades encontradas para realização dos cultivos, manutenção das células, obtenção de amostras com células viáveis e correlação com os achados clínicos dos pacientes, ao diagnóstico foram obtidas 40 amostras até o momento.



Quando comparamos amostras de pacientes ao diagnóstico e em algum momento da indução, seja ele no dia 15 ou no dia 35, incluímos até o momento 24 pacientes.



Além disso, também iniciamos o tratamento de células dos pacientes com K252a e inibidores de vias de sinalização, como Ly294002, UO126, GO6983 e Rp. Devido às dificuldades no cultivo das células, esses experimentos foram realizados em apenas uma linhagem de leucemia aguda (Jurkat) e em um paciente no momento do diagnóstico. As doses utilizadas foram 100 nM para K252a e 1 mM para todos os inibidores.



Os resultados desses tratamentos com os inibidores de vias de sinalização deverão ser correlacionados com os diferentes momentos de tratamento dos pacientes. Entretanto, encontramos diversas dificuldades em cultivar as células de linhagens de leucemia e das amostras de pacientes. Isto por que essas células ficam em suspensão no meio, dificultando sua manutenção, tornando-as mais suscetíveis à contaminação, além disso elas não resistem ao congelamento e não permanecem viáveis durante muito tempo, mesmo nas condições recomendadas de cultivo. Esperamos conseguir finalizar esses experimentos, incluindo um maior número de pacientes tanto para o tratamento com neurotrofinas, quanto para o tratamento combinado de inibidor de receptor Trk e inibidores de vias de sinalização. Além disso, espera-se incluir ainda experimentos com mais dois inibidores de receptor Trk,

sendo eles ANA-12 e GW9662, inibidores específicos de TrkB e TrkA, respectivamente.

O tratamento de células de leucemia com agonistas e antagonistas de receptores Trk, além da utilização de inibidores de vias, seria a parte inicial da caracterização dos efeitos desses compostos sobre viabilidade celular de culturas de leucemias agudas. Isso ajudaria na compreensão dos mecanismos pelos quais BDNF tem níveis diminuídos em leucemias pediátricas agudas, além de elucidar os mecanismos pelos quais as neurotrofinas, de uma maneira geral, interferem nessa doença. Ainda, traria a possibilidade de descobrir novos alvos terapêuticos e assim, auxiliar no tratamento de crianças acometidas pelas leucemias.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJAMRA AL, et al. Leukemia virus long terminal repeat activates NF kappa B pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*, 345(2): 390-403, 2006.

ALCOSER PW, RODGERS C. Treatment strategies in childhood cancer. *J Pediatr Nurs*, 18(2): 103-12, 2003.

American Cancer Society. *Prognostic factors in childhood leukemia (ALL or AML)*. 2015. Disponível em:

<http://www.cancer.org/cancer/leukemiainchildren/detailedguide/childhood-leukemia-prognostic-factors>

ANTON ES, WESKAMP G, REICHARDT LF & MATTHEW WD. Nerve growth factor and its receptor low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 2795-2799, 1994.

ASTOLFI A, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*, 37: 1719-1725, 2001.

BARNABÉ-HEIDERF & MILLER FD. Endogenously-produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci*, 23(12): 5149-60, 2003.

BELSON M, KINGSLEY B, HOLMES A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, 115(1): 138-45, 2007.

BERNSTEIN ML. Targeted therapy in pediatric and adolescent oncology. *Cancer*, 117 (10): 2268–2274, 2011.

BOTHWELL, N. Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell*, 65: 915-918, 1991.

BROWNSTEIN CM, et al. Factors that affect final height and change in height standard deviation scores in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9): 4422-7, 2004.

CHESSSELS JM. Relapsed lymphoblastic leukemia in children: a countinouing challenge. *Br J Haematol*, 102: 423-38, 1998.

CHIARETTI A, et al. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst*, 20(6): 412-9.25, 2004.

COHEN-CORY S, KIDANE AH, SHIRKEY NJ, MARSAHK S. Brain-Derived Neurotrophic Factor and the Development of Structural Neuronal Connectivity. *Developmental Neurobiology*, 271-288, 2010.

COPLEY MR and EAVES CJ . Developmental changes in hematopoietic stem cell properties. *Exp Mol Med*, 45(11): e55, 2013.

DE FARIAS CB, et al. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology*, 79(5-6): 430-9, 2011.

DEN BÔER ML, et al. Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 13(12): 2023-30, 1999.

DESMET CJ & PEEPER DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci*, 63: 755–759, 2006.

D'ONOFRIO M, et al. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw*, 11: 283-291, 2000.

DOUMA S, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 430: 1034–1039, 2004.

EDEN T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treatment Reviews*, 36: 286–297, 2010.

EGGERT A, et al. Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 35: 569-572, 2000.

EGGERT A, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*, 19(3): 689-96, 2001.

EINSIEDEL HG, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol*, 23 (31): 7942-50, 2005.

ESPOSITO D, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*, 276: 32687–32695, 2001.

FAUCHAIS AL, et al. Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival. *J Immunol*, 181(5): 3027-38, 2008.

FENG X, et al. BDNF dependence in neuroblastoma. *J Neurosci Res*, 64(4): 355-63, 2001.

FUJIMURA H, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Throm Haemost*, 87(4): 728-34, 2002.

GAYNON PS. Childhood acute lymphoblastic leukaemia and relapse. *Br J Haematol*, 131: 579-97, 2005.

GREENE LA, KAPLAN DR. Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 5: 579–87, 1995.

GURNEY JG, SEVERSON RK, DAVIS S, ROBISON LL. Incidence of cancer in children in the United States, sex, race, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*, 75:2186–2195, 1995.

HILLIS J, O'DWYER M, GORMAN AM. Neurotrophins and B-cell malignancies. *Cell Mol Life Sci*, e-pub ahead of print 23 September 2015.

HO R, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*, 62(22): 6462-6, 2002.

HUANG EJ, REICHARD TLF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24: 677-736, 2001.

INCA. Câncer: Tipos de câncer – Infantil. 2016. Disponível em:  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>.

KAATSCH P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36: 277–285, 2010.

KAPLAN DR, MILLER FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10: 381-391, 2000.

KRÜTTGEN A, SCHNEIDER I and WEIS J. The dark side of the NGF family: neurotrophins in neoplasias. *Int. Soc. Neurophatol Brain Phatol*, 16: 304-310, 2006.

LEE R, KERMANI P, TENG KK, HEMPSTEAD BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294: 1945–1948, 2001.

LI Z, et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood Journal*, 113(9): 2028-2037, 2009.

LONGO FM, MASSA SM. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nat Rev Drug Discov*, 12: 507-525, 2013.

MARODER M, et al. Expression of TrkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J Immunol*, 157(7): 2864-72, 1996.

MARSHALL GM, et al. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer*, 14(4): 277–289, 2014.

MBAH AFUNGCHWI G, CHALLINOR J. Addressing Childhood Cancer in Low-Resource Countries: Current Challenges, Strategies, and Recommendations. *Oncol Nurs Forum*, 43(4):525-8, 2016.

MCCARTY JH, FEINSTEIN SC. The TrkB receptor tyrosine kinase regulates cellular proliferation via signal transduction pathways involving SHC, PLC gamma and CBL. *J Recept Signal Transduct Res*, 19: 953–974, 1999.

MENTER DG, HERRMANN JL, MARCHETTI D & NICOLSON GL. Involvement of neurotrophins and growth factors in brain metastasis formation. *Invas Metast*, 14: 372-384, 1994.

MIDDLEMAS DS, KIHLE BK, ZHOU J, ZHU X. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 274(23): 16451-60, 1999.

MOORE AS, et al. Novel therapies for children with acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 27(7): 1451–60, 2013.

MOUSAVI, K & JASMIN BJ. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite and inhibit myogenic differentiation. *J Neurosci*, 26: 5739-5749, 2006.

MOWLA SJ, et al. Biosynthesis and post translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 276: 12660–12666, 2001.

NAKASHI T, et al. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*, 470(2): 113-7, 2000.

NASSENSTEIN C, BRAUN A, NOCKHER, WO, RENZ, H. Neurotrophin effects on eosinophils in allergic inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*, 5: 204-211, 2005.

OTTEN U, EHRHARD P, PECK R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 86: 10059-10063, 1989.

PAN W, et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*, 37(12): 1553-61, 1998.

PEARSE RN, SWENDEMAN SL, LI Y, RAFII D, HEMPSTEAD BL. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival. *Blood*, 105(11): 4429-36, 2005.

PEREZ-PINERA P, et al. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem*, 295(1-2): 19-26, 2007.

PIETERS R, KLUMPER E, KASPERS GJ. Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 25(1): 11-26, 1997.

PINKEL D. Five-year follow-up of "total therapy" of childhood lymphocytic leukemia. *JAMA*, 216(4): 648-652, 1971.

PUI CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol*, 12(1):3-12, 2000.

PUI CH, et al. Long-term results of St Jude total therapy studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(2): 371-382, 2010.

PUI CH, et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J ClinOncol*, 17 (3): 818-24, 1999.

QIU L, et al. Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int J Oncol*, 29(4): 1003-11, 2006.

RADAELLI A, LASKIN BL, STEPHENS JM, BOTTEMAN MF, PASHOS CL. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)*, 14(1): 53-62, 2005.

REICHARDT LF. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Phil Trans R Soc B*, 361: 1545-1564, 2006.

RIES LAG, KOSARY CL, HANKEY BF. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, editors. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1995, 1998.

ROBISON LL. Late Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Patients Diagnosed at 0-20 Years of Age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 238-42, 2011.

RODRIGUEZ-GALINDO C, et al. Toward the Cure of All Children With Cancer Through Collaborative Efforts: Pediatric Oncology As a Global Challenge. *Journal of Clinical Oncology*, 33 (27): 3065-3076, 2015.

RUBNITZ JE, INABA H. Childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 159: 259–287, 2012

SCHMIDT AL, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 40: 303-10, 2010.

SCHUHMANN B, et al. A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol*, 163: 15-23, 2005.

SHUSTER JJ, et al. Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 16 (8): 2854-63, 1998.

SINGER HS, HANSIN B, MARTINIE D & KARP CL. Mitogenesis in glioblastoma multiforme cell lines: a role for NGF and its TrkA receptors. *J Neurooncol*, 45: 1-8, 1999.

SMITH MA, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol*, 28(15): 2625-2634, 2010.

SMITH MT, et al. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206: 237 – 245, 2005.

SNIDERHAN LF, et al. Neurotrophin signaling through tropomyosin receptor kinases contributes to survival and proliferation of non-Hodgkin lymphoma. *Exp Hematol*, 37(11): 1295-309, 2009.

STEPHAN H, et al. Neurotrophin receptor expression in human primary retinoblastomas and retinoblastoma cell lines. *Pediatr Blood Cancer*, 50(2): 218-22, 2008.

TANAKA K, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Tropomyosin-Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. *PLoS One*, e-pub ahead of print 6 May 2014.

TASIAN SK, POLLARD JA, APLENC R. Molecular therapeutic approaches for pediatric acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*, 4: Article 55: 1-11, 2014

THIELE CJ, LI Z, MCKEE AE. On Trk – The TrkB Signal Transduction Pathway Is Increasingly Important Target in Cancer Biology. *Clin Cancer Res*, 15(19): 5962-5967, 2009.

VALENT P, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*, 12(11): 767-775, 2012.



WADHWA S, et al. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci*, 28(2): 181-8, 2003.

WAGNER N, et al. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilm's tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 19: 2631-2642, 2005.

WASHIYAMA K, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor proteins in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumors of the pediatric central nervous system. *Am J Pathol*, 148(3): 929-40, 1996.

WIEMELS J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions*, 196: 59–67, 2012.

WILLIAMS DA, XU H, CANCELAS JA. Children are not little adults: just ask their hematopoietic stem cells. *J Clin Invest*, 116(10): 2593-6, 2006.

XIA D, et al. RNA interference-mediated knockdown of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes cell cycle arrest and apoptosis in B-cell lymphoma cells. *Neoplasia*, 61(5): 523-32, 2014.

YANG ZF, et al. Significance of the serum brain-derived neurotrophic factor and platelets in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 16(6): 1237-43, 2006.

ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001.

ZHAO Y, HUANG H, WEI G. Novel agents and biomarkers for acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol*, 6: 40, 2013.

ZIRRGIEBEL U, et al. Characterization of TrkB receptor-mediated signaling pathways in rat cerebellar granule neurons: involvement of protein kinase C in neuronal survival. *J Neurochem*, 65: 2241–2250, 1995.

## **7. ANEXOS**

7.1. Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que foi entregue aos responsáveis pelos pacientes para posterior coleta de amostra.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NEUROTROFINAS EM CULTURA PRIMÁRIA DE LEUCEMIAS PEDIÁTRICAS

Investigador Principal: Dra. Caroline Brunetto de Farias  
Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul  
Laboratório de Pesquisas em Câncer  
Fone: 51 – 3359-7616

Por favor, leia atentamente este termo de consentimento livre e esclarecido. Use o tempo necessário para lê-lo e para perguntar o máximo que desejar. Se houverem palavras ou informações que não estiverem claras, será um prazer para a equipe do estudo explicá-las a você.

#### **INTRODUÇÃO**

Você foi informado que seu/sua filho(a) foi diagnosticado com Leucemia Aguda. O seu médico já lhe informou que coletas de sangue e de medula óssea podem ocorrer durante o período de tratamento para a avaliação do estado de saúde de seu/sua filho (a).

## **PROPÓSITO DO ESTUDO**

Estamos realizando um estudo para avaliar a resposta ao tratamento com determinadas moléculas, chamadas de neurotrofinas, nas células dos pacientes diagnosticados com leucemias pediátricas.

## **PROCEDIMENTOS DE PESQUISA**

Se você concordar em permitir que seu/sua filho (a) participe deste estudo, iremos solicitar a sua autorização para que possamos retirar uma pequena quantidade de sangue periférico e/ou medula óssea a mais (de 3 mL à 4 mL), no momento em que for realizado o exame de rotina. Parte deste material será destinada aos exames solicitados pelo seu médico e a parte restante será usada para esta pesquisa e analisada no Laboratório de Pesquisas em Câncer - HCPA.

## **RISCOS POTENCIAIS E DESCONFORTOS**

A coleta de sangue periférico e/ou medula óssea será realizada no mesmo momento da solicitação médica para avaliação do paciente, e desconfortos durante os procedimentos podem ocorrer. Entretanto, a participação na pesquisa não apresenta nenhum risco potencial.

## **BENEFÍCIOS POTENCIAIS**

Não oferecemos benefícios diretos ao seu filho/ sua filha ou a você. Mas a sua participação nesta pesquisa poderá nos ajudar a melhor entender esta doença.

## **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO EM CASO DE DÚVIDA**

No caso de qualquer dúvida ou necessidade você poderá entrar em contato com a pesquisadora Caroline Brunetto de Farias pelo telefone 51 – 3359.7616.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante no estudo, você poderá entrar em contato pelo telefone 51 – 3359.8304.

## **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A participação neste estudo de pesquisa é voluntária e depende da sua decisão, e decisão de seu filho/sua filha. O atendimento médico que seu filho/sua filha recebe no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Oncologia Pediátrica, ou fora dele não será afetado agora ou futuramente, quer você e seu filho/sua filha participe ou não neste estudo. E você não terá nenhuma despesa decorrente da participação desta pesquisa. Os dados deste estudo podem ser publicados. Entretanto, o seu nome e nome de seu filho/sua filha e outras informações de identificação não sairão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Oncologia Pediátrica, sem permissão por escrito, a menos que permitido pelas leis aplicáveis.

## **CONSENTIMENTO**

Pedimos que caso você concorde em participar desta pesquisa, preencha os dados abaixo e assine este consentimento. Você também ficará com uma cópia assinada deste documento.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição que garantiu sua aprovação.

Eu, abaixo assinado, de nome \_\_\_\_\_,  
responsável pelo paciente \_\_\_\_\_  
confirmando que fui informado quanto aos riscos, vantagens e possíveis efeitos colaterais que possam ser resultantes desta pesquisa. Apresento, pois meu livre consentimento para que o paciente pelo o qual sou responsável participe deste estudo. Posso, a qualquer momento, optar por interrompê-lo sem motivo especial e sem qualquer prejuízo aos cuidados que meu filho / minha filha tenha o direito de receber.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente ou Responsável

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura e Nome do Pesquisador

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável pelo Projeto

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
Data