

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE BDNF EM  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM NEOPLASIA**

FERNANDA ODRZYWOLEK RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

# **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE BDNF EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM NEOPLASIA**

FERNANDA ODRZYWOLEK RODRIGUES

**Orientador: Prof. Dr. Lauro José Gregianin**

A apresentação dessa dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Odrzywolek Rodrigues, Fernanda  
Avaliação dos Níveis Séricos de BDNF em Pacientes  
Pediátricos com Neoplasia / Fernanda Odrzywolek  
Rodrigues. -- 2012.  
87 f.

Orientador: Lauro José Gregianin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Oncologia Pediátrica. 2. BDNF. 3. Leucemias.  
4. Sobrevida. I. Gregianin, Lauro José, orient. II.  
Título.

*Dedico este trabalho para a minha família, que sempre me apoiou e me apoia. E a todos que contribuíram para este projeto.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Dr. Algemir Lunardi Brunetto e Dr. Lauro José Gregianin**. Ao professor Brunetto, por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto e confiar em mim, é um grande exemplo profissional. Ao doutor Lauro, que me acolheu e me incentivou, além de ser um médico excelente.

Às colegas **Caroline Brunetto de Farias e Ana Abujamra**, que me proporcionaram utilizar este belo projeto, e que ao longo da jornada se tornaram excelentes amigas, e que sem o apoio e ajuda não conseguiria finalizar mais esta etapa, **MUITO OBRIGADA!!!**

Ao pessoal do **Laboratório de Pesquisas em Câncer (Lapesc)**, o trabalho de vocês é inspirador.

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, seu coordenadores, professores e à secretária Rosane Blanguer.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio na realização deste projeto

A todos da equipe do 3º leste que me ajudaram na realização deste projeto; a equipe de enfermagem, equipe de médicos e todos os colaboradores da unidade, que de alguma forma foram importantes na realização deste projeto.

Aos colegas de mestrado e nutricionistas, em especial Cristina Dornelles e Luciane Cruz, que me auxiliaram de diferentes formas no início da minha vida profissional, meu muito obrigada.

Ao **Instituto do Câncer Infantil do RS**, do qual fiz parte integrando a equipe dos voluntários. Parabéns pelo lindo trabalho e por ter feito parte desta equipe maravilhosa.

E em especial aos **pacientes da Oncologia Pediátrica** e suas famílias, todos este trabalho foi pensando em vocês. Que num futuro próximo todo o auxílio de vocês seja multiplicado em descobertas que irão ajudar crianças a passar mais facilmente por esta difícil doença e sair vitoriosas.

*“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio”*

***Martin Luther King***

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O câncer infantil representa cerca de 0,5 a 3% de todas as neoplasias da população em geral. Do ponto de vista clínico, os tumores infantis crescem rapidamente e são mais invasivos que as neoplasias adultas, porém respondem melhor ao tratamento e são considerados de melhor prognóstico. As neurotrofinas e seus receptores (receptores de quinase relacionados à tropomiosina - Trk) são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade neuronal. Além disso, estão envolvidas no processo oncogênico, podendo facilitar ou suprimir o crescimento tumoral. O BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) é uma das neurotrofinas e possui ligação específica com o receptor TrkB, e também está envolvida em diferentes processos corporais.

**OBJETIVOS:** Avaliar os níveis séricos de BDNF em pacientes pediátricos (crianças e adolescentes) com algum tipo de neoplasia e indivíduos sem doença, e avaliar a sua relação com sexo, idade, valor de plaquetas e sobrevida.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo transversal com crianças e adolescentes com idade entre zero a 18 anos. Foram incluídos no estudo 114 pacientes, sendo 72 pacientes do grupo de crianças com neoplasia e 42 do grupo controle. A análise dos níveis séricos de BDNF foi realizada através da técnica de ELISA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

**RESULTADOS:** As medianas (P 25-75) dos valores de BDNF foram 2,45 (0,76-5,23) pg/ml para o grupo com LLA, 0,45 (0,08-0,80) pg/ml para o grupo com LMA, 9,0 (3,14-14,7) pg/ml para o grupo com linfomas e tumores sólidos e 6,08 (2,60-9,35) pg/ml para o grupo controle. Não houve diferença entre os valores de BDNF quando comparados as variáveis sexo e idade entre os diferentes grupos. Em relação aos valores

de BDNF e plaquetas, houveram diferenças significativas entre os grupos de Leucemias e os demais grupos. Pacientes com neoplasia que tinham valores de BDNF menores que 4,00 pg/ml apresentaram uma menor sobrevida ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSÃO:** Os resultados mostram diferenças significativas nos níveis de BDNF em pacientes com tumores infanto-juvenil, principalmente entre as diferentes neoplasias e até mesmo podendo ter influência na sobrevida destes pacientes. Porém mais estudos são necessários para investigar o papel das neurotrofinas nesta população, para quem sabe no futuro serem utilizadas como biomarcadores ou novos alvos terapêuticos.

**Palavras chaves:** Oncologia Pediátrica • BDNF • Leucemias • Sobrevida

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The childhood cancer represents about 0.5 to 3% of all cancers of the general population. From a clinical standpoint, infant tumors grow quickly and are more invasive than the adult cancers, but respond better to treatment and are considered a better prognosis. The neurotrophins and their receptors (tropomyosin-related kinase - Trk) are important regulators of survival, development and neuronal plasticity. They are also involved in the oncogenic process, which can facilitate or suppress tumor growth. BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) is a neurotrophin that has a specific binding with the receptor TrkB, and is also involved in different bodily processes. This study aimed to evaluate the serum levels of BDNF in pediatric patients (children and adolescents) with some type of cancer and healthy individuals, as well its relationship with gender, age, platelet value and survival.

**PATIENTS AND METHODS:** Cross-sectional study with children and adolescents aged zero to 18 years. The study included 114 patients, 72 patients in the group of children with cancer and 42 control group. Analysis of the serum levels of BDNF was performed by ELISA. The project was approved by the Ethics Committee of HCPA.

**RESULTS:** The median (P 25-75) values of BDNF were 2,45 (0,76-5,23) pg/ml for the group with ALL, 0,45 (0,08-0,80) pg/ml for the group with LMA, 9,0 (3,14-14,7) pg/ml for the group with lymphomas and solid tumors and 6,08 (2,60-9,35) pg/ml in the control group. There was no difference between the values of BDNF compared the gender and age among the different groups. Regarding the values of BDNF and platelets, there were significant differences between groups of patients diagnosed with leukemias and other groups. Patients with cancer who had BDNF values lower than 4,00 pg/ml had a lower survival curve ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSION:** The results show significant differences in BDNF levels in patients with tumors, especially among different tumors and even may have an influence on patient survival. But more studies are needed to investigate the role of neurotrophins in this population, who knows in the future be used as biomarkers or new therapeutic targets.

**Key-words:** Pediatric Oncology • BDNF • Leukemia • Survival

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão da Literatura

FIGURA 1 - Principais causas de morte infanto-juvenis no Brasil (2009)..... 19

FIGURA 2 - Vias de sinalização das neurotrofinas. ....24

### Metodologia

FIGURA 3 - Ilustração esquemática do processo de coleta, armazenamento e determinação dos níveis de BDNF.....39

### Artigo Original em Português

FIGURA 1 - I Níveis de BDNF e Grupos de diagnóstico e controles. ....62

FIGURA 2 - Níveis de BDNF e Plaquetas.....63

FIGURA 3 - Níveis de BDNF e Plaquetas por Grupo de diagnóstico e controles. ....64

FIGURA 4 - Sobrevida e Níveis de BDNF.....65

### Artigo Original em Inglês

FIGURE 1 - BDNF levels in different patient populations and in the control groups....79

FIGURE 2 - BDNF levels and platelet counts. ....80

FIGURE 3 - BDNF levels and platelet counts according to tumor type.....81

FIGURE 4 - Cumulative survival as measured according to BDNF levels (4.0 pg/mL).  
.....82

**LISTA DE TABELAS****Revisão da Literatura**

TABELA 1 - Frequência de neoplasias infantis no SOP em crianças até 19 anos de idade durante período de 1994 a 2011. .... 19

TABELA 2 - Neurotrofinas e seus Receptores. .... 23

**Artigo Original em Português**

TABELA 1 - Informações demográficas e clínicas. .... 61

**Artigo Original em Inglês**

TABLE 1 - Information Regarding Patient Population. .... 78

**LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS**

<b>BDNF</b>	Fator de crescimento derivado do cérebro ( <i>Brain derived neurotrophic factor</i> )
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Cálcio
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LLA</b>	Leucemia linfóide aguda
<b>MAPK</b>	Proteína quinase ativadora mitogênica ( <i>Mitogen-activated protein</i> )
<b>NGF</b>	Fator de crescimento nervoso ( <i>Neural growth factor</i> )
<b>NK-κB</b>	Fator nuclear kappa B ( <i>Nuclear Factor-Kappa B</i> )
<b>NT-3</b>	Neurotrofina-3
<b>P13K</b>	Fosfatidilinositol-3 quinase ( <i>Phosphatidyl 3-kinase</i> )
<b>p75NTR</b>	Receptor de neurotrofinas ( <i>Neurotrophic receptor</i> )
<b>PLC-γ1</b>	Fosfolipase C-γ1 ( <i>Phospholipase C-γ1</i> )
<b>SEER</b>	<i>Surveillance, Epidemiology and End Result</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNS</b>	Sistema nervoso simpático
<b>SOP</b>	Serviço de Oncologia Pediátrica
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCPH</b>	Transplante de células progenitoras hematopoiéticas
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>TrK</b>	Receptores de quinase relacionados à tropomiosina ( <i>Tropomyosin related kinase</i> )

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 CÂNCER INFANTIL .....	18
2.1.1 Epidemiologia do câncer infantil.....	18
2.1.2 Prognóstico e tratamento das neoplasias infantis .....	20
2.2 NEUROTROFINAS.....	21
2.2.1 Neurotrofinas e seus Receptores .....	22
2.2.2 Neurotrofinas e Câncer.....	25
2.3 BDNF EM OUTRAS DEONÇAS E EM NEOPLASIAS DE ADULTOS.....	26
2.4 BDNF E NEOPLASIAS PEDIÁTRICAS.....	28
2.4.1 Tumores de Sistemas Nervoso Central.....	28
2.4.2 Tumores de Sistema Nervoso Simpático.....	29
2.4.3 Retinoblastomas .....	30
2.4.4 Tumores Renais .....	31
2.4.5 Leucemias.....	31
<b>3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....</b>	<b>32</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	33
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS .....	33
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
5.1 DESENHO DO ESTUDO .....	34
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	34
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	34
5.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	35
5.5 VARIÁVEIS ANALISADAS .....	36
5.6 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA .....	36
5.7 LOGÍSTICA DO ESTUDO .....	36
5.7.1 Coleta de sangue e armazenamento das amostras .....	36
5.7.2 Determinação dos níveis de BDNF .....	37
5.7.3 Dados complementares.....	39
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	40
5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	40
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL - PORTUGUÊS .....</b>	<b>49</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL - INGLÊS.....</b>	<b>66</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>84</b>
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias pediátricas são relativamente raras se comparadas com as que incidem em pacientes adultos (MALCOLM AND RIES 2002; INCA 2006; INCA 2010). Os tumores característicos do período infanto-juvenil apresentam características clínicas específicas, tais como menores períodos de latência, em geral crescem rapidamente e são mais invasivos, porém respondem melhor ao tratamento e, em geral, são considerados de melhor prognóstico (INCA 2006).

As neurotrofinas são proteínas que têm como principal função o desenvolvimento de neurônios, atuando para a sua sobrevivência, crescimento e diferenciação ( BARDE 1989; HUANG AND REICHARDT 2001; MORIS and VEGA 2003; KRÜTTGEN, SCHNEIDER ET AL. 2006). As mesmas interagem com duas classes distintas de receptores (REICHARDT 2006), os receptores de neurotrofinas p75 e receptores de quinase relacionados à tropomiosina (TrK).

Sabe-se que neurotrofinas e seus receptores estão envolvidas no processo oncogênico (ATWAL, MASSIE ET AL. 2000; BARNABÉ-HEIDER AND MILLER 2003; ABUJAMRA, SPANJAARD ET AL. 2006). Tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou TrK quanto uma sinalização desregulada via TrK podem levar à tumorigênese (CHIAPPA, CHIN ET AL. 1999).

A associação das neoplasias com neurotrofinas tem sido investigada, principalmente em tumores de adultos. Em neoplasias pediátricas existem poucos estudos, restritos principalmente à experimentos *in vitro*.

Apesar dos avanços recentes observados na área da oncologia pediátrica, determinando melhora significativa na sobrevida dos pacientes, persistem esforços para

a identificação de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos, principalmente no que se refere a busca de novos alvos terapêuticos.

A investigação das diferenças de níveis de neurotrofinas entre crianças com e sem câncer, assim como as variações existentes entre os diferentes tipos de neoplasias, pode contribuir para a definição de um novo indicador no diagnóstico ou prognóstico e /ou potencial alvo terapêutico.

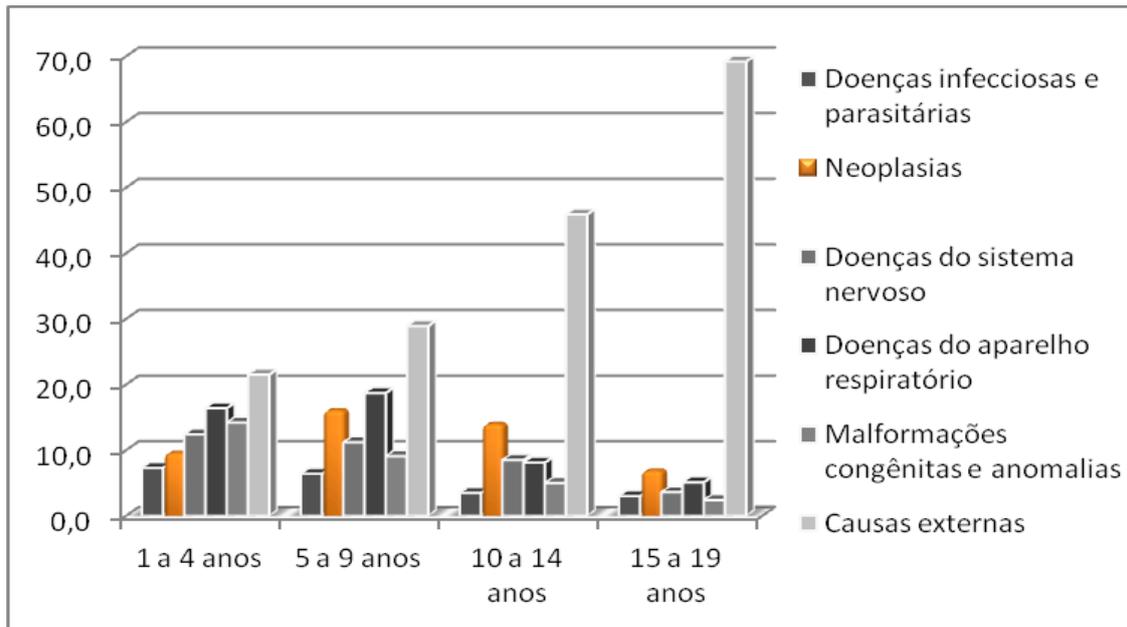
## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 CÂNCER INFANTIL**

#### **2.1.1 Epidemiologia do câncer infantil**

O câncer infantil representa 0,5 a 3% de todas as neoplasias, sendo considerado, portanto relativamente incomum quando comparado com os tumores de adulto (MALCOLM AND RIES 2002). Em geral, a incidência total de tumores malignos na infância é ligeiramente maior no sexo masculino. Do ponto de vista clínico, os tumores infantis apresentam menores períodos de latência, em geral crescem rapidamente e são mais invasivos, porém respondem melhor ao tratamento e são considerados de melhor prognóstico, quando comparados aos tumores de adulto (INCA 2006).

No Brasil as neoplasias são a terceira causa de morte em crianças acima de quatro anos e a segunda em crianças entre 10 e os 19 anos de idade (DATASUS 2009), conforme ilustra a Figura 1.

**FIGURA 1** – Principais causas de morte infanto-juvenis no Brasil (2009).

Fonte: (DATASUS 2009)

Nos Estados Unidos estima-se que anualmente 16 casos novos de câncer sejam diagnosticados para cada 100.000 crianças e adolescentes com idade inferior à 19 anos de idade, conforme dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (HOWLADER, NOONE ET AL. 2011). Na Europa a estimativa de incidência de câncer em crianças e adolescentes até 19 anos é 15,7 novos casos para cada 100.000 pessoas (STELIAROVA-FOUCHER, STILLER ET AL. 2004). No Brasil estima-se uma incidência de 16 casos novos para cada 100.000 crianças com idade inferior a 21 anos (INCA 2010).

As leucemias representam a neoplasia mais freqüente em menores de 15 anos, correspondendo de 25% a 35% de todos os tipos de câncer infanto-juvenil (SMITH AND RIES 2002). Na coorte europeia que estuda neoplasias pediátricas as leucemias correspondem a 34% dos casos, seguida pelos tumores cerebrais e linfomas, com 23% e 12%, respectivamente (KAATSCH 2011).

No Serviço de Oncologia Pediátrica (SOP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), entre 1994 e 2011, 1528 casos de neoplasias malignas foram diagnosticados, sendo sua frequências descrita na Tabelas 1.

**TABELA 1** - Frequência de neoplasias infantis no SOP em crianças até 19 anos de idade durante período de 1994 a 2011.

Neoplasia	SOP	
<b>Leucemias</b>	331	21,7
<b>Linfomas</b>	198	13,0
<b>Tumores SNC</b>	144	9,4
<b>Tumores Ósseos Malignos</b>	135	8,8
<b>Sarcomas de Partes Moles</b>	126	8,3
<b>Tumores SNS</b>	112	7,3
<b>Retinoblastoma</b>	109	7,1
<b>Não Oncológicos</b>	101	6,6
<b>Tumores Renais</b>	87	5,7
<b>Desconhecidos</b>	78	5,1
<b>Tumores de células germinativas</b>	37	2,4
<b>Carcinomas</b>	31	2,0
<b>Tumores Hepáticos</b>	27	1,8
<b>Outros tumores não especificados</b>	12	0,8
<b>TOTAL</b>	<b>1528</b>	<b>100</b>

SNS: Sistema Nervoso Simpático; SOP: Serviço de Oncologia Pediátrica.

### 2.1.2 Prognóstico e tratamento das neoplasias infantis

O prognóstico dos pacientes portadores de doenças malignas que incide na infância e adolescência está evoluindo favoravelmente nas últimas décadas. A mortalidade por leucemia foi reduzida em mais de 50% (ROBISON 2011).

O objetivo do tratamento das neoplasias infantis é aumentar a sobrevida, procurando minimizar a toxicidade do tratamento e preservar a qualidade de vida do paciente (ALCOSER AND RODGERS 2003; SALA, PENCHARZ ET AL. 2004). O tratamento pode ser composto por modalidades terapêuticas isoladas ou em combinação, entre os principais tipos de tratamento estão a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia e o transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) (ALCOSER AND RODGERS 2003).

## 2.2 NEUROTROFINAS

Os fatores tróficos, ou de crescimento, são produzidos por diferentes tipos de células, que regulam a biologia celular tanto de tecidos embrionários como adultos (MORIS and VEGA 2003).

Os fatores de crescimento neurotróficos, conhecidos como neurotrofinas, são proteínas que têm como principal função o desenvolvimento de neurônios, atuando para a sua sobrevivência, crescimento e diferenciação (BARDE 1989; HUANG AND REICHARDT 2001; MORIS AND VEGA 2003; KRÜTTGEN, SCHNEIDER ET AL. 2006). A família das neurotrofinas compreende o Fator de Crescimento Neuronal (em inglês *Nerve Growth Factor* – NGF), o Fator de Crescimento Neurotrófico Derivado do Cérebro (em inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor* – BDNF) e Neurotrofinas-3 (NT-3) e Neurotrofinas-4/5 (NT-4/5) (BARDE, EDGAR ET AL. 1982; LEVI-MONTALCINI 1987; NAKAGAWARA, AZAR ET AL. 1994; BOTHWELL 1995; MORIS AND VEGA 2003; REICHARDT 2006). O NGF foi a primeira neurotrofina a

ser identificada, sendo responsável por oferecer suporte para o desenvolvimento e manutenção dos neurônios simpáticos periféricos e sensoriais, derivados da crista neural (BARDE, EDGAR ET AL. 1982; LEVI-MONTALCINI 1987; NAKAGAWARA, AZAR ET AL. 1994; NAKAGAWARA, AZAR ET AL. 1994; REICHARDT 2006). A segunda neurotrofina a ser caracterizada foi o BDNF, inicialmente purificada a partir de tecido cerebral de suínos e considerada como fator de sobrevivência para várias populações neuronais não-responsivas ao NGF (BARDE, EDGAR ET AL. 1982; REICHARDT 2006). Após estas duas descobertas outras neurotrofinas também foram isoladas, como NT-3 e NT-4/5. Recentemente outras duas novas neurotrofinas também foram isoladas de peixes, recebendo a denominação de neurotrofina-6 (NT-6) e neurotrofina-7 (NT-7) (REICHARDT 2006).

### **2.2.1 Neurotrofinas e seus receptores**

As neurotrofinas interagem com duas classes distintas de receptores (REICHARDT 2006). O primeiro a ser descoberto foi o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) (BIBEL AND BARDE 2000; LEE, KIM ET AL. 2001). Este receptor faz parte da grande família de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (REICHARDT 2006). A segunda classe de receptores de neurotrofinas inclui os receptores de quinase relacionados à tropomiosina (*tropomyosin related kinase* – TrK). Todas as neurotrofinas se ligam ao receptor p75NTR, porém as neurotrofinas se ligam com maior afinidade ao seu receptor TrK específico, conforme mostra a Tabela 2 (LEE, KIM ET AL. 2001; NAKAGAWARA 2001; CHAO 2003; HUANG AND REICHARDT 2003).

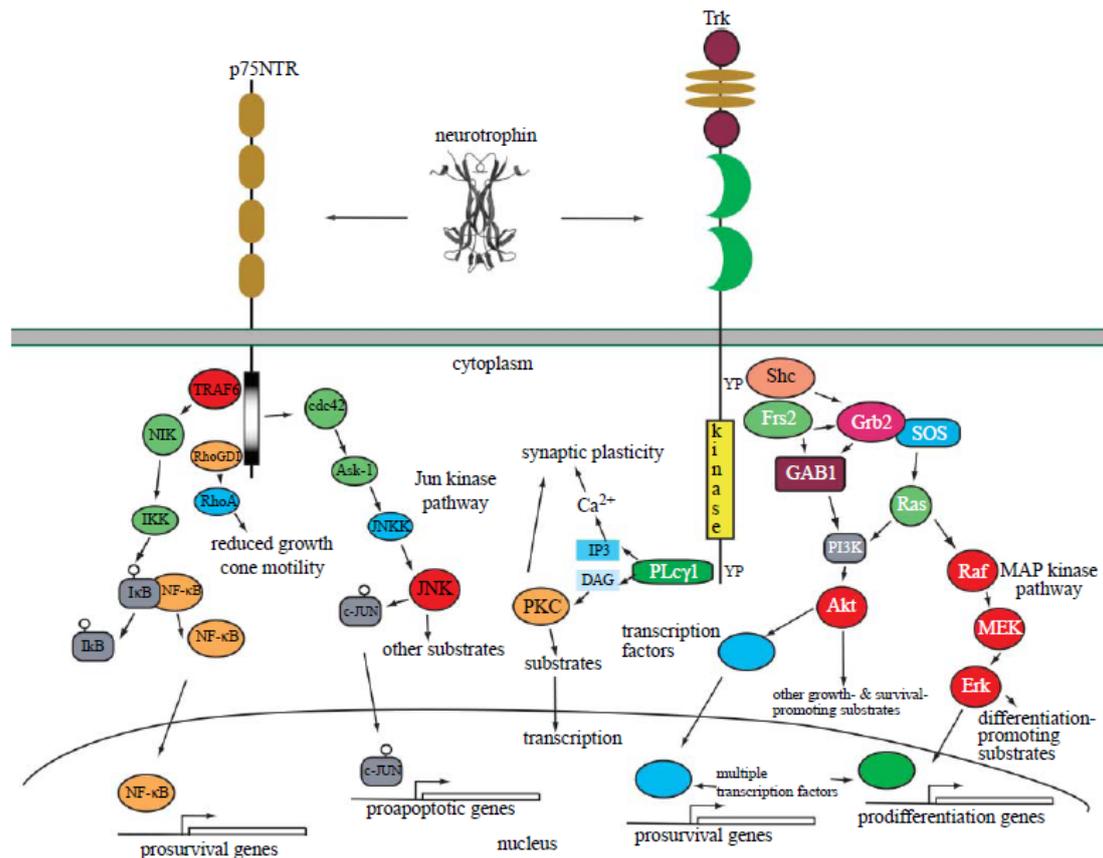
**TABELA 2** - Neurotrofinas e seus Receptores

<b>Neurotrofina</b>	<b>Receptor</b>
<b>NGF</b>	TrK-A / p75NTR
<b>BDNF</b>	TrK-B / p75NTR
<b>NT-4/5</b>	TrK-A / p75NTR
<b>NT-3</b>	TrK-C / p75NTR

As neurotrofinas (BDNF, NGF, NT-3 e NT-4) e seus receptores são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade neuronal (HUANG AND REICHARDT 2001).

Através dos seus receptores, as neurotrofinas ativam diversas vias de sinalização intracelular, tais como as vias de sinalização controlada por *Ras*, *Rho*, a via da proteína quinase ativadora mitogênica (MAPK), fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e fosfolipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1), tendo efeito direto no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (PATAPOUTIAN AND REICHARDT 2001; HUANG AND REICHARDT 2003). Cada receptor, tanto p75NTR quanto TrK, controla mais de uma via de sinalização (REICHARDT 2006).

FIGURA 2 - Vias de sinalização das neurotrofinas.



Fonte: (REICHARDT 2006)

Conforme ilustra a Figura 2, o receptor p75NTR auxilia na ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), que resulta na transcrição de múltiplos genes que promovem a sobrevivência neuronal. A ativação da via da *Jun* quinase controla ativação semelhante de diversos genes, os quais promovem a apoptose. O p75NTR também regula a atividade da *Rho*, que controla o crescimento e reduz a motilidade do cone axonal. A ativação da *Ras* resulta na ativação da cascata de sinalização da MAPK, que promove diferenciação neuronal. A ativação da PI3K, através da *Ras* ou *Gab1*, promove sobrevivência e crescimento de neurônios e outras células. A ativação da PLC- $\gamma$ 1 resulta na ativação da via de Cálcio ( $Ca^{+2}$ ) e vias da proteína quinase regulada por C

(PKC), que promovem a plasticidade sináptica. Cada uma destas vias de sinalização também regulam a transcrição de genes (REICHARDT 2006).

### **2.2.2 Neurotrofinas e Câncer**

As neurotrofinas e seus receptores estão amplamente envolvidas no processo oncogênico (ATWAL, MASSIE ET AL. 2000; BARNABÉ-HEIDER AND MILLER 2003; ABUJAMRA, SPANJAARD ET AL. 2006). Tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou TrK quanto uma sinalização desregulada via TrK podem levar à tumorigênese (CHIAPPA, CHIN ET AL. 1999). De fato, tumores de linhagem neuronal, tais como neuroblastomas, meduloblastomas e gliomas, expressam níveis elevados de neurotrofinas e/ou seus receptores, níveis estes que estimulam a proliferação e migração celular, contribuindo para o desenvolvimento de metástase, e podendo tornar as células resistentes à quimioterapia (WASHIYAMA, MURAGAKI ET AL. 1996; MIDDLEMAS, KIHLE ET AL. 1999; AOYAMA, ASAI ET AL. 2001; FENG, JIANG ET AL. 2001; WADHWA, NAG ET AL. 2003; BRODEUR, MINTURN ET AL. 2009; SCHMIDT, DE FARIAS ET AL. 2010; HO, MINTURN ET AL. 2011).

O papel de neurotrofinas e receptores TrK em outras neoplasias não neuronais, tais como câncer do ovário, da próstata, de pulmão e do fígado também tem sido elucidado, e observa-se que a ativação de TrK age em sinergismo com outras vias de sinalização (DALAL AND DJAKIEW 1997; QIU, ZHOU ET AL. 2006; YANG, HO ET AL. 2006; YU, LIU ET AL. 2008; SIU, WONG ET AL. 2009; ZHANG, HAN ET

AL. 2009; LIU, SU ET AL. 2010; HARADA, YATABE ET AL. 2011). Alguns estudos que avaliaram *in vitro* células de adenocarcinomas e carcinoma hepatocelular mostraram que o antagonista de TrKB, o inibidor da tirosina quinase K252a diminuiu a tumorigenicidade das células de tratadas, além de induzir apoptose, porém o K252a não é seletivo, ele atua bloqueando todos os tipos de TrKs. (PEREZ-PINERA, HERNANDEZ ET AL. 2007; GUO, HOU ET AL. 2011). Em estudo realizado com pacientes com carcinoma hepatocelular mostrou-se que os níveis séricos de BDNF se correlacionaram positivamente com a agressividade do tumor (YANG, HO ET AL. 2006).

Em estudo realizado por Vanhecke *et al* (2011) em pacientes com câncer de mama mostrou que as células cancerosas mamárias expressavam e secretavam neurotrofinas BDNF e NT-4/5, e a utilização de anticorpos bloqueadores sugeriu uma resistência autócrina celular à apoptose (VANHECKE, ADRIAENSSENS ET AL. 2011).

### **2.3 BDNF EM DOENÇAS E NEOPLASIAS DE ADULTOS**

O gene do BDNF está localizado no cromossomo 11, na região 11p13 (MAISONPIERRE, LE BEAU ET AL. 1991). A proteína codificada pelo gene do BDNF é necessária para a sobrevivência dos neurônios estriados no cérebro (BARDE, EDGAR ET AL. 1982; SCHINDER AND POO 2000). Diversas isoformas variantes de transcrição da codificação já foram descritas para este gene (ISLAM, LOO ET AL. 2009).

A expressão do gene do BDNF encontra-se reduzida em algumas doenças neurológicas, como Alzheimer e Huntington (GE AND LAHIRI 2002; STRAND, BAQUET ET AL. 2007). Porém também pode encontrar-se aumentada em pacientes com outros tipos de transtornos neurológicos não tratados, como no transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (SHIM, HWANGBO ET AL. 2008). O gene do BDNF também desenvolve um importante papel na regulação da resposta ao estresse e na biologia dos transtornos do humor (MAI, JOPE ET AL. 2002; BRUNONI, LOPES ET AL. 2008; LEE AND KIM 2009).

O BDNF e seu receptor, TrK-B, têm sido amplamente estudado nas neoplasias típicas de adultos. Em estudo realizado em pacientes com carcinoma de células transicionais de bexiga mostrou a presença de super expressão de BDNF e seu receptor TrK-B no tecido com doença quando comparado com amostras de tecido do urotélio normais (LAI, CHIU ET AL. 2010).

Guo *et al* estudaram o papel de BDNF/TrK-B no carcinoma hepatocelular através de análise imuno-histoquímica, e mostraram alta expressão de BDNF em mais de 63% das amostras, assim como uma expressão positiva de TrK-B em 55%, e os achados correlacionaram-se significativamente com estágio avançado do carcinoma hepatocelular (GUO, HOU ET AL. 2011). Também foi observado, em estudo *in vitro*, que a utilização do antagonista do receptor TrK, o K252a, efetivamente induziu a apoptose e suprimiu a invasão de células malignas nas duas linhagens de células de câncer hepatocelular estudadas (GUO, HOU ET AL. 2011).

No câncer de mama o papel do BDNF tem sido elucidado por diversos pesquisadores (PATANI, JIANG ET AL. 2011; VANHECKE, ADRIAENSSENS ET AL. 2011). Em um destes estudos foi realizada análise imuno-histoquímica das células

neoplásicas encontradas no tecido epitelial mamário e comparados os dados obtidos de tecidos normais, onde os pesquisadores constataram maior expressão de BDNF no interior de células neoplásicas. Esta expressão aumentada de BDNF também foi significativamente associada com parâmetros patológicos desfavoráveis e desfechos clínicos adversos (PATANI, JIANG ET AL. 2011). Os autores sugerem a utilização do BDNF como um marcador de prognóstico para o câncer de mama.

A expressão de BDNF e TrK-B também está aumentada em pacientes com câncer colorretal quando comparado com tecido normal (BRUNETTO DE FARIAS, ROSEMBERG ET AL. 2011). Pacientes com com câncer de cólo de útero também apresentam aumento na expressão de BDNF e TrK-B nas células neoplásicas em estudo realizado com 80 pacientes (MOON, WON ET AL. 2011).

## **2.4 BDNF E PRINCIPAIS NEOPLASIAS PEDIÁTRICAS**

Os níveis séricos de BDNF podem estar alterados em pacientes portadores de algumas neoplasias pediátricas, porém ainda existem poucos estudos com esta população.

### **2.4.1 Tumores do Sistema Nervoso Central**

Alguns estudos tem mostrado a regulação da viabilidade e proliferação em células malignas de meduloblastoma através de vias de expressão de BDNF e TrKB, (SCHMIDT, DE FARIAS ET AL. 2010).

No estudo realizado por Schmidt *et al* (2010) utilizando o BDNF como tratamento para células *in vitro* de meduloblastoma, foi observado que a neurotrofina inibiu significativamente a viabilidade de algumas linhagens celulares de meduloblastoma.

Em estudo realizado por Chiaretti *et al* (2004) mostrou a expressão de BDNF elevada nas amostras de líquido cérebro-espinhal de pacientes com astrocitomas de baixo grau e ependimomas, porém nas amostras de tecido tumoral esta expressão apresentava-se inalterada quando comparada com dados de pacientes sem doença neoplásica (WADHWA, NAG ET AL. 2003; CHIARETTI, ALOE ET AL. 2004)

#### **2.4.2 Tumores do Sistema Nervoso Simpático**

Existem diversos estudos mostrando o papel das neurotrofinas nos neuroblastomas, entre elas o BDNF e seu receptor TrKB (BRODEUR, NAKAGAWARA ET AL. 1997; FENG, JIANG ET AL. 2001; SCHRAMM, SCHULTE ET AL. 2005; ZHANG, LI ET AL. 2008; BRODEUR, MINTURN ET AL. 2009; HO, MINTURN ET AL. 2011; LIGHT, KOYAMA ET AL. 2011; ZAGE, GRAHAM ET AL. 2011).

Mais de um estudo já mostrou que a co-expressão de BDNF e TrKB em neuroblastoma esta relacionado a um prognóstico desfavorável, podendo representar uma via de sobrevivência autócrina (NAKAGAWARA, AZAR ET AL. 1994; LIGHT, KOYAMA ET AL. 2011).

Em estudo realizado por Ho *et al* (2002) foi observado que a expressão de BDNF-TrKB é associada com a resistência à quimioterapia em neuroblastomas. Isto foi sugerido através da exposição de células *in vitro* de neuroblastomas a agentes

citotóxicos, tais como doxorrubicina, etoposide e cisplatina. Os resultados mostraram tumores do tipo neuroblastomas que expressam a neurotrofina BDNF e seu receptor TrKB podem proporcionar a sobrevivência das células malignas quando expostas à reagentes quimioterápicos que causam dano ao DNA celular, podendo ser explicado pela ativação da via PI3K/AKT (HO, EGGERT ET AL. 2002; JABOIN, KIM ET AL. 2002).

### **2.4.3 Retinoblastoma**

Mais de um estudo *in vitro* realizado com linhagens celulares de retinoblastoma mostrou presença a de recptores TrK e neurotrofinas nas células malignas (WAGNER, WAGNER ET AL. 2000; STEPHAN, ZAKRZEWSKI ET AL. 2008). Em estudo realizado por *Stephanet al.* (2008) mostrou-se que a expressão de TrK-B e BDNF era mais evidente quando comparado com outros receptores e neurotrofinas, sugerindo que ambos possam ter envolvimento na biologia do retinoblastoma (STEPHAN, ZAKRZEWSKI ET AL. 2008).

Em estudo onde foi utilizado o inibidor de proteína quinase, o k252a, evitou a fosforilação da proteína, bloqueando a proliferação e diferenciação das células neoplásicas, mostrando que as neurotrofinas e seus receptores podem fazer parte do mecanismo de proliferação de células malignas no retinoblastoma (WAGNER, WAGNER ET AL. 2000).

#### 2.4.4 Tumores Renais Wilms

Existem poucos estudos relacionando o BDNF e seu receptor em crianças com Tumor de Wilms ou outro tipo de neoplasia renal.

Eggert *et al* (2001) estudaram em um grupo de crianças com tumor de Wilms a expressão de neurotrofinas e seus receptores no tumor. Foi constatado que a expressão aumentada do receptor TrK-B no tumor foi associada significativamente a um pior prognóstico quando comparada com tumores com menor expressão do receptor. A sobrevivência em cinco anos livre de recidiva foi de 100% *versus* 65% entre tumores que expressavam baixa *versus* alta concentração de TrK-B (EGGERT, GROTZER ET AL. 2001).

#### 2.4.5 Leucemias

Até o momento não está claramente identificado o papel das neurotrofinas e seus receptores na hematopoiese normal ou alterado por uma doença maligna, pois existem poucos estudos. Em estudo envolvendo pacientes adultos com leucemia aguda recidivada ou em casos de segunda neoplasia foi demonstrado a expressão de três tipos de receptores TrK, onde pelo menos um deles foi expresso em 55% dos pacientes (LI, BEUTEL ET AL. 2009). Neste mesmo estudo também foi observado a co-expressão de BDNF e seu receptor (TrK-B) em mais de 50% dos casos, levando os pesquisadores a acreditarem que esta co-expressão em células hematopoiéticas pode ser um fator relacionado a indução de leucemias (LI, BEUTEL ET AL. 2009).

### **3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Apesar dos sucessos recentes no tratamento de neoplasias infanto-juvenil, ainda existe um grupo de pacientes que necessitam de um tratamento mais eficaz. A identificação de um novo alvo terapêutico poderá permitir no futuro o desenvolvimento de um tratamento mais direcionado, adequando-o de acordo com o grupo de risco e consequentemente contribuindo para a diminuição dos efeitos tardios causados pelo tratamento atual nestes pacientes.

Existem evidências que os níveis de BDNF estão alterados em algumas neoplasias e nestas situações sua determinação poderia ser de utilidade para o planejamento terapêutico para estes pacientes. Existem poucos estudos investigando o papel do BDNF nas neoplasias pediátricas, sendo que sua ação é controversa, pois seus níveis variam de acordo com o tipo de tumor e outros fatores. O objetivo do presente estudo foi avaliar as diferenças dos níveis de BDNF no plasma de crianças com neoplasia e de crianças sem doença neoplásica, comparando também as diferenças de BDNF nos diferentes tipos de neoplasias infanto-juvenil.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Avaliar os níveis plasmáticos de BDNF em pacientes pediátricos com neoplasia e em crianças sem neoplasia.

### **4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Correlacionar os níveis de BDNF obtidos com as seguinte variáveis:

- Idade
- Sexo
- Diagnóstico
- Plaquetas
- Sobrevida

## **5 POPULAÇÃO E MÉTODO**

### **5.1 DESENHO DO ESTUDO**

Estudo transversal.

### **5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Pacientes Portadores de Neoplasia: pacientes pediátricos com diagnóstico de neoplasia em início de tratamento em atendimento no Serviço de Oncologia Pediátrica (SOP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Pacientes Não Portadores de Neoplasia: pacientes pediátricos sem neoplasia, que estivessem realizando exames laboratoriais de rotina com solicitação médica no Hospital Parque Belém.

### **5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- Pacientes que haviam iniciado o tratamento em outros hospitais;
- Pacientes com história de retardo mental, autismo, paralisia cerebral e outras morbidades associadas ao desenvolvimento cerebral, situações

que reconhecidamente podem causar alterações nos níveis de BDNF;

#### **5.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA**

Os pacientes foram selecionados durante as visitas diárias da pesquisadora à enfermaria do SOP no período de Julho de 2009 à Agosto de 2011. Após a verificação de potenciais novos pacientes, era realizado contato com o médico assistente da equipe, para confirmar dados referente ao diagnóstico e verificar se este preenchia os critérios de inclusão do estudo. Realizada a confirmação, a pesquisadora explicava o estudo ao paciente e seu responsável e entregava o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após a leitura do TCLE e havendo concordância em participar do estudo, o responsável e o paciente, se possível, assinavam o TCLE. Posteriormente eram realizadas a coleta de sangue do paciente, sempre concomitantemente com uma coleta de rotina, nunca sendo realizado um procedimento exclusivo para o projeto.

Em relação aos controles, este procedimento também era realizado da mesma forma. Caso a criança que fosse coletar sangue por solicitação e preenchesse os critérios de inclusão, seu responsável era contatado para autorização e era preenchido o TCLE.

## **5.5 VARIÁVEIS ANALISADAS**

- Idade
- Sexo
- Diagnóstico
- Plaquetas
- Sobrevida

## **5.6 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA**

Considerando um intervalo de confiança de 95% e um erro beta de 80%, a amostra deveria constituir-se de no mínimo 26 pacientes por grupo (caso e controle). Porém pensando que pudessem ocorrer eventuais perdas foi definido um acréscimo de 10%, correspondendo um mínimo de 29 pacientes. Este número de pacientes era compatível com o histórico de casos novos diagnosticados no SOP, devendo ser obtido dentro de um ano de coleta de dados. Os controles foram pareados por sexo e idade.

## **5.7 LOGÍSTICA DO ESTUDO**

### **5.7.1 Coleta de sangue e armazenamento das amostras**

Foram coletados quatro mL de sangue periférico de cada paciente, inserido em um tubo a vácuo com EDTA e imediatamente centrifugadas a 3.000 rpm durante 5

minutos. Após a centrifugação, o plasma das amostras foi pipetado e armazenado em micro tubos tipo *Eppendorf* e identificados com as iniciais do paciente, o número identificador do banco de dados e a data da coleta. Cada micro tubo continha um volume de 400 µl de plasma. Em seguida os *Eppendorfs* foram armazenados em um freezer do Laboratório de Pesquisas em Câncer (Lapesc) na temperatura de -80°C.

As coletas foram realizadas apenas em concomitância a uma coleta de sangue de rotina, evitando qualquer possível desconforto adicional ao paciente.

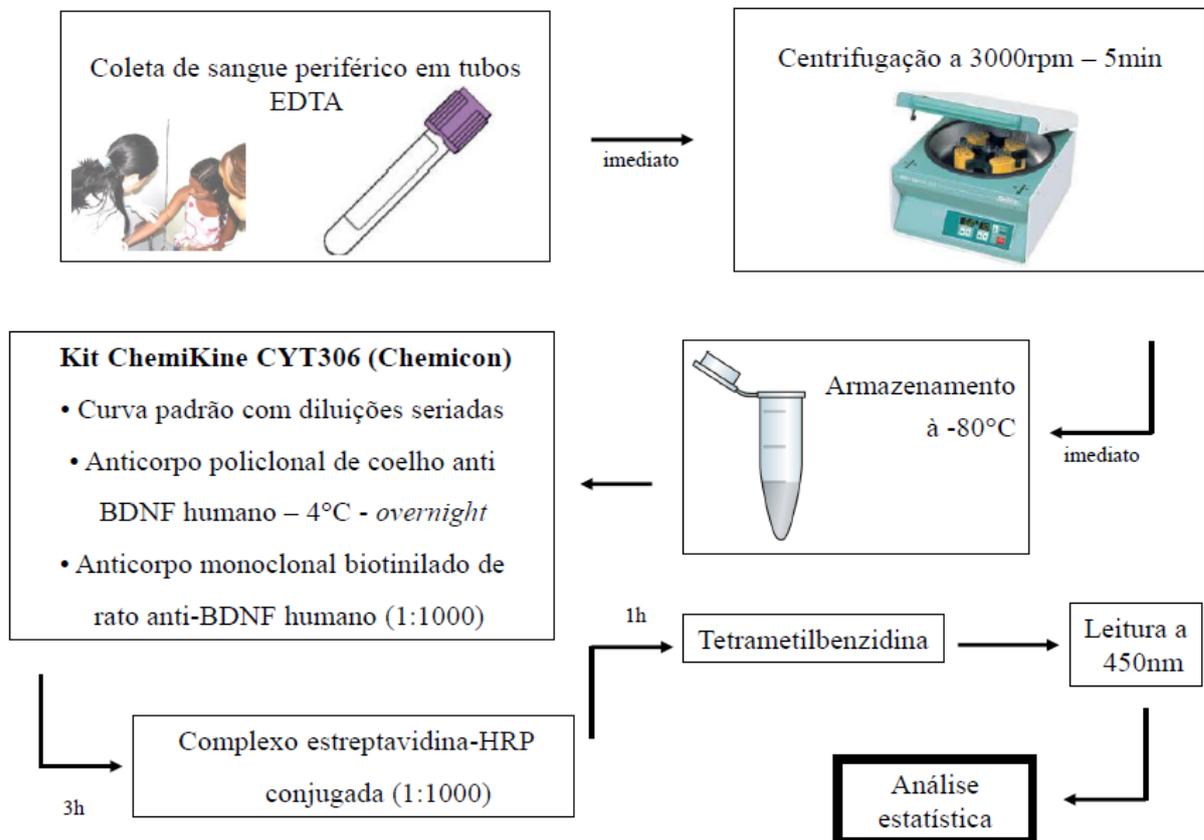
O sangue periférico dos pacientes não portadores de neoplasias foi coletado de crianças e adolescentes que fossem submetidos à coleta de rotina de acordo com a solicitação do seu médico assistente no Laboratório Parque Belém. Estas crianças e adolescentes foram incluídos após contato de um dos pesquisadores com seu responsável e posteriormente à assinatura do TCLE. Os indivíduos foram incluídos neste estudo somente após o pesquisador obter o TCLE do responsável. Os mesmos foram monitorados em relação ao hemograma, sendo que se apresentassem valores alterados era automaticamente excluído da amostra.

### **5.7.2 Determinação dos níveis de BDNF**

Para análise dos níveis de BDNF foi utilizado um kit de imuno-ensaio enzimático tipo sanduíche (*Chemicon International, ChemiKine, USA*, nº catálogo: CYT306). O kit consiste de uma placa de 96 poços revestida com anticorpo policlonal de coelho contra BDNF humano.

Para a realização da técnica as amostras foram descongeladas. Uma curva padrão com diluições seriadas 1:2 de zero até sete utilizando-se o diluente da amostra (n° do catálogo 60240) foi preparada e adicionada na placa em duplicatas num volume de 100  $\mu$ L. As amostras de plasma dos pacientes portadores e não portadores de neoplasias foram também inoculadas com o mesmo volume em cada poço. A placa foi coberta e incubada de 2°C a 8°C durante uma noite. Após o período de incubação, a placa foi lavada quatro vezes com 250 $\mu$ L do tampão de lavagem (n° do catálogo 60245). Imediatamente, 100 $\mu$ L de anticorpo monoclonal biotilado de rato anti-BDNF humano (n° do catálogo 60583) foi acrescentado na placa em uma concentração 1:1000, permanecendo incubado por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as lavagens foram repetidas. Então, 100 $\mu$ L da solução diluída com streptavidina-HRP conjugada (n° do catálogo 60582) numa concentração 1:1000 foi adicionada em cada poço e incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, uma nova lavagem como descrito anteriormente foi realizada. Imediatamente foi incubado por 15 minutos em 100 $\mu$ L da solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (n° do catálogo 60096). A reação foi finalizada, acrescentando 100 $\mu$ L da solução de parada (n° do catálogo 60260) por poço, seguida da leitura da placa em 450nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF. A concentração de proteínas total foi quantificada pela técnica de Bradford, usando albumina bovina sérica padrão. O processo de coleta, armazenamento e determinação dos níveis de BDNF estão exemplificados na Figura 3.

**FIGURA 3** - Ilustração esquemática do processo de coleta, armazenamento e determinação dos níveis de BDNF.



### 5.7.3 Dados complementares

Foram coletados dados complementares do prontuário do paciente, tais como o diagnóstico, sexo, data de nascimento, valores da contagem de plaquetas e data de óbito.

## **5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados através do programa Excel para Windows Vista. A análise dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS, versão 12.0.

Foi utilizada para a análise estatística dos dados, os valores de mediana e percentis 25 e 75, visto que a variável principal estudada, o BDNF, apresentava distribuição assimétrica. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal-Wallis, para verificar se existiam diferenças entre os grupos avaliados; Mann-Whitney, para localizar as diferenças; ANCOVA, para análises das covariâncias, e para avaliação da sobrevida foi utilizada a curva de Kaplan Meier. Foi utilizado o nível de significância de 5%.

## **5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto de pesquisa elaborado para o desenvolvimento deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, conforme consta na Resolução do Projeto número 08-511.

Os objetivos e os procedimentos da pesquisa foram explicados individualmente a cada paciente e seus responsáveis, sendo incluídos somente após assinatura de TCLE pelo pai ou responsável legal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abujamra, A. L., R. A. Spanjaard, et al. (2006). "Leukemia virus long terminal repeat activates NF $\kappa$ B pathway by a TLR3-dependent mechanism." Virology **345**(2): 390-403.

Alcoser, P. W. and C. Rodgers (2003). "Treatment strategies in childhood cancer." Journal of pediatric nursing **18**(2): 103-112.

Aoyama, M., K. Asai, et al. (2001). "Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants." Cancer Lett **164**(1): 51-60.

Atwal, J. K., B. Massie, et al. (2000). "The TrkB-Shc Site Signals Neuronal Survival and Local Axon Growth via MEK and PI3-Kinase." Neuron **27**(2): 265-277.

Barde, Y.-A. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-1534.

BARDE, Y. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-34.

Barde, Y. A., D. Edgar, et al. (1982). "Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain." EMBO J **1**(5): 549-53.

Barnabé-Heider, F. and F. D. Miller (2003). "Endogenously Produced Neurotrophins Regulate Survival and Differentiation of Cortical Progenitors via Distinct Signaling Pathways." The Journal of Neuroscience **23**(12): 5149-5160.

Bibel, M. and Y. Barde (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes Dev **14**(23): 2919-37.

Bothwell, M. (1995). "Functional Interactions of Neurotrophins and Neurotrophin Receptors." Annual Review of Neuroscience **18**(1): 223-253.

Brodeur, G. M., J. E. Minturn, et al. (2009). "Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas." Clin Cancer Res **15**(10): 3244-50.

Brodeur, G. M., A. Nakagawara, et al. (1997). "Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas." J Neurooncol **31**(1-2): 49-55.

Brunetto de Farias, C., D. B. Rosemberg, et al. (2011). "BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer." Oncology **79**(5-6): 430-9.

Brunoni, A. R., M. Lopes, et al. (2008). "A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression." Int J Neuropsychopharmacol **11**(8): 1169-80.

Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.

Chiappa, S. A., L. S. Chin, et al. (1999). "Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines." Neurosurgery **45**(5): 1148-54; discussion 1154-5.

Chiaretti, A., L. Aloe, et al. (2004). "Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas." Childs Nerv Syst **20**(6): 412-9.

Dalal, R. and D. Djakiew (1997). "Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate." Mol Cell Endocrinol **134**(1): 15-22.

DATASUS. (2009). "Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM." Acesso em Fevereiro de 2012, from <http://www.datasus.gov.br>.

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

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

Ge, Y. W. and D. K. Lahiri (2002). "Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **973**: 463-7.

Guo, D., X. Hou, et al. (2011). "More expressions of BDNF and TrkB in multiple hepatocellular carcinoma and anti-BDNF or K252a induced apoptosis, suppressed invasion of HepG2 and HCCLM3 cells." Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **30**(1): 97.

Harada, T., Y. Yatabe, et al. (2011). "Role and relevance of TrkB mutations and expression in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **17**(9): 2638-45.

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

Ho, R., J. E. Minturn, et al. (2011). "The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas." Cancer Lett **305**(1): 76-85.

Howlander, N., A. Noone, et al. (2011). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute.

HUANG, E. and L. REICHARDT (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-42.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.

INCA (2006). A Situação do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA - Instituto Nacional do Câncer.

INCA (2010). Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional. M. d. Saúde. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer - INCA. **IV**: 488.

Islam, O., T. X. Loo, et al. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways." Curr Neurovasc Res **6**(1): 42-53.

Jaboin, J., C. J. Kim, et al. (2002). "Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway." Cancer Res **62**(22): 6756-63.

Kaatsch, P. (2011). "Epidemiology of childhood cancer." Cancer treatment reviews **36**(4): 277-285.

Krüttgen, A., I. Schneider, et al. (2006). "The Dark Side of the NGF Family: Neurotrophins in Neoplasias." Brain Pathology **16**(4): 304-310.

Lai, P. C., T. H. Chiu, et al. (2010). "Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens." Oncol Rep **24**(5): 1265-70.

Lee, B.-H. and Y.-K. Kim (2009). "Reduced platelet BDNF level in patients with major depression." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **33**(5): 849-853.

Lee, F. S., A. H. Kim, et al. (2001). "The uniqueness of being a neurotrophin receptor." Current Opinion in Neurobiology **11**(3): 281-286.

Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science **237**(4819): 1154-62.

Li, Z., G. Beutel, et al. (2009). "High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis." Blood **113**(9): 2028-37.

Light, J. E., H. Koyama, et al. (2011). "Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas." Pediatr Blood Cancer.

Liu, M., Y. H. Su, et al. (2010). "Expressions of neurotrophic factors and their receptors in prostate cancer." National Journal of Andrology **16**(2): 129-31.

Mai, L., R. S. Jope, et al. (2002). "BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents." J Neurochem **82**(1): 75-83.

Maisonpierre, P. C., M. M. Le Beau, et al. (1991). "Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations." Genomics **10**(3): 558-568.

Malcolm, A. and L. Ries (2002). Childhood cancer: incidence, survival, and mortality. Principles and Practice of Pediatric Oncology. P. Pizzo and D. Poplack. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 2-12.

Middlemas, D. S., B. K. Kihl, et al. (1999). "Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells." J Biol Chem **274**(23): 16451-60.

Moon, A., K. Y. Won, et al. (2011). "Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix." Pathology **43**(5): 453-458

MORIS, G. and J. VEGA (2003). "Neurotrophic factors: basis for their clinical application." Neurologia **18**(1): 18-28.

Moris, G. and J. A. Vega (2003). "[Neurotrophic factors: basis for their clinical application]." Neurologia **18**(1): 18-28.

Nakagawara, A. (2001). "Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development." Cancer letters **169**(2): 107-114.

Nakagawara, A., C. G. Azar, et al. (1994). "Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol. Cell. Biol. **14**(1): 759-767.

Nakagawara, A., C. G. Azar, et al. (1994). "Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol Cell Biol **14**(1): 759-67.

Patani, N., W. G. Jiang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer." Cancer Cell Int **11**(1): 23.

Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." Current Opinion in Neurobiology **11**(3): 272-280.

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

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

Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **361**(1473): 1545-1564.

Robison, L. L. (2011). "Late Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Patients Diagnosed at 0-20 Years of Age." ASH Education Program Book **2011**(1): 238-242.

Sala, A., P. Pencharz, et al. (2004). "Children, cancer, and nutrition—A dynamic triangle in review." Cancer **100**(4): 677-687.

Schinder, A. F. and M.-m. Poo (2000). "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity." Trends in Neurosciences **23**(12): 639-645.

Schmidt, A. L., C. B. de Farias, et al. (2010). "BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells." J Mol Neurosci **40**(3): 303-10.

Schramm, A., J. H. Schulte, et al. (2005). "Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma." Cancer Lett **228**(1-2): 143-53.

Shim, S.-H., Y. Hwangbo, et al. (2008). "Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD)." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **32**(8): 1824-1828.

Siu, M. K., O. G. Wong, et al. (2009). "TrkB as a therapeutic target for ovarian cancer." Expert Opin Ther Targets **13**(10): 1169-78.

Smith, M. and L. Ries (2002). Childhood cancer: incidence, survival, and mortality. Principles and practice of pediatric oncology. P. Pizzo and D. Poplack. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. **4**: 1-12.

Steliarova-Foucher, E., C. Stiller, et al. (2004). "Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the

1970s (the ACCIS project): an epidemiological study." The Lancet **364**(9451): 2097-2105.

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

Strand, A. D., Z. C. Baquet, et al. (2007). "Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration." J Neurosci **27**(43): 11758-68.

Vanhecke, E., E. Adriaenssens, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival." Clin Cancer Res **17**(7): 1741-52.

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

Wagner, N., K. D. Wagner, et al. (2000). "An abnormal response of retinoblastoma cells (Y-79) to neurotrophins." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(7): 1932-9.

Washiyama, K., Y. Muragaki, et al. (1996). "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.

Yang, Z. F., D. W. Ho, et al. (2006). "Significance of the serum brain-derived neurotrophic factor and platelets in hepatocellular carcinoma." Oncol Rep **16**(6): 1237-43.

Yu, X., L. Liu, et al. (2008). "Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer." Cancer Sci **99**: 543 - 552.

Zage, P. E., T. C. Graham, et al. (2011). "The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan." Cancer **117**(6): 1321-1391.

Zhang, J. H., A. M. Li, et al. (2008). "Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells." Chinese Journal of Contemporary Pediatrics **10**(1): 47-50.

Zhang, Z., L. Han, et al. (2009). "Up-regulation of Tropomyosin related kinase B contributes to resistance to detachment-induced apoptosis in hepatoma multicellular aggregations." Mol Biol Rep **36**(5): 1211-6.

## 7. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

### **Associação dos níveis de BDNF e sobrevida global em pacientes com neoplasias pediátricas**

Fernanda Odrzywolek Rodrigues<sup>1</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>2,3</sup>, Jiseh Fagundes Loss<sup>4</sup>, Bruno Kilpp Goulart<sup>2</sup>, Ana Lucia Abujamra<sup>2,3,4</sup>, Algemir Lunardi Brunetto<sup>2,4</sup>, José Lauro Gregianin<sup>4,5</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

2. Laboratório de Pesquisa em Câncer, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

3. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Translacional

4. Instituto do Câncer Infantil e Unidade de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

5. Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

#### **Autor responsável pela correspondência:**

Lauro José Gregianin, Serviço de Oncologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 3º andar leste, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil, Telefone: (51) 3359.8267, Fax: 3330.8087

## RESUMO

As neurotrofinas e seus receptores são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento e plasticidade neuronal. Além disso, estão envolvidas no processo oncogênico, podendo facilitar ou suprimir o crescimento tumoral. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos da neurotrofina BDNF em pacientes pediátricos e sua relação sexo, idade, valor de plaquetas e sobrevida. Foram incluídos no estudo 114 pacientes, sendo 72 pacientes do grupo de crianças com neoplasia e 42 do grupo controle pareados por sexo e idade. As medianas (P 25-75) dos valores de BDNF foram 2,45 (0,76-5,23) pg/ml para o grupo com LLA, 0,45 (0,08-0,80) pg/ml para o grupo com LMA, 9,0 (3,14-14,7) pg/ml para o grupo com linfomas e tumores sólidos e 6,08 (2,60-9,35) pg/ml para o grupo controle. Não houve diferença entre os valores de BDNF quando comparados as variáveis sexo e idade entre os diferentes grupos. Em relação aos valores de BDNF e plaquetas, houveram diferenças significativas entre os grupos de Leucemias e os demais grupos. Pacientes com neoplasia que tinham valores de BDNF menores que 4,00 pg/ml apresentaram uma menor sobrevida ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:** Oncologia Pediátrica • BDNF • Leucemias • Sobrevida

## INTRODUÇÃO

As neoplasias pediátricas são relativamente raras se comparadas com as que incidem em pacientes adultos [1-3]. Os tumores característicos do período infanto-juvenil apresentam características clínicas específicas, tais como menores períodos de latência, em geral crescem rapidamente e são mais invasivos, porém respondem melhor ao tratamento e, em geral, são considerados de melhor prognóstico [2].

As neurotrofinas são proteínas que têm como principal função o desenvolvimento de neurônios, atuando para a sua sobrevivência, crescimento e diferenciação [4-7]. As mesmas interagem com duas classes distintas de receptores: receptores de neurotrofinas p75 e receptores de quinase relacionados à tropomiosina (TrK) [8].

Sabe-se que neurotrofinas e seus receptores estão envolvidas no processo oncogênico [9-11]. Tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou TrK quanto uma sinalização desregulada via TrK podem levar à tumorigênese [12]. A associação das neoplasias com neurotrofinas tem sido investigada, principalmente em tumores de adultos. Em neoplasias pediátricas existem poucos estudos, restritos principalmente à experimentos *in vitro*.

Apesar dos avanços recentes observados na área da oncologia pediátrica, determinando melhora significativa na sobrevida dos pacientes, os esforços persistem para a identificação de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos. A investigação das diferenças de níveis de neurotrofinas entre crianças com e sem câncer, assim como as variações existentes entre os diferentes tipos de neoplasias, pode contribuir para a definição de um novo indicador no diagnóstico ou prognóstico e /ou potencial alvo

terapêutico. Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de BDNF em pacientes pediátricos comparados com crianças saudáveis e sua relação sexo, idade, valor de plaquetas e sobrevida.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Pacientes elegíveis para o estudo foram definidos com idade entre zero e 18 anos, com diagnóstico de leucemia, linfoma ou tumor sólido. As crianças do grupo controle realizaram a coleta de sangue em outro hospital da mesma cidade e foram pareadas por sexo e idade com o grupo estudado. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos e seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da inclusão no estudo.

Todas as coletas dos pacientes com doença foram realizadas junto com uma coleta de rotina, não sendo necessário procedimento apenas para o estudo. O sangue era coletado em um tubo específico contendo EDTA e imediatamente centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O plasma então era transferido para um tubo tipo *ependorf* e armazenado para posterior análise à -80°C. Os níveis de BDNF foram analisados através do método de Elisa.

As amostras dos pacientes e controle foram pareadas por sexo e idade. Os pacientes com neoplasia foram estratificados de acordo com o diagnóstico (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, linfomas e tumores sólidos). Também foram analisados contagem de plaquetas e, se aplicável, a sobrevida global.

## RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 114 pacientes que tiveram coleta de BDNF, sendo 72 pacientes do grupo de crianças com neoplasia e 42 do grupo controle. As características demográficas e clínicas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores de BDNF e plaquetas são apresentados em medianas e percentis pois apresentam distribuição assimétrica. Não houve diferença entre os valores de BDNF quando comparados as variáveis sexo e idade entre os diferentes grupos.

Em relação aos valores de BDNF e plaquetas, houveram diferenças significativas entre os grupos de Leucemias (LLA e LMA) quando comparados com os demais grupos. Isto pode ser explicado em parte pelo fato que pacientes submetidos ao tratamento de leucemia tem tendência ao desenvolvimento de trombocitopenia. Na Figura 1 temos os valores de BDNF para os grupos de LLA, LMA, linfomas e tumores sólidos e controles. Podemos observar que os grupos de leucemias (LLA e LMA) mostram tendência à menor variabilidade, indicando maior homogeneidade entre os valores de BDNF.

A fim de melhor avaliar a relação entre os níveis de BDNF e a contagem de plaquetas, a relação entre estas duas variáveis foi analisada. A Figura 2 mostra a relação entre os níveis de BDNF e as contagens de plaquetas, mostrando uma correlação positiva ( $r_s=0,721$ ,  $p<0,001$ ). Este dado era esperado, uma vez que os níveis de BDNF do plasma foram avaliados e não os níveis séricos, pois se sabe que plaquetas e outros fatores de coagulação são carreadores de BDNF. Para avaliar se essa relação ocorreu apenas em pacientes com leucemia, os grupos foram estratificados de acordo com o tipo de tumor e também foi incluído o grupo controle. Conforme é mostrado na Figura 3 esta relação se mantém mesmo com os grupo estratificados (Grupo LLA:  $r_s=0,721$ ,

$p < 0,001$ ; Grupo LMA:  $r_s = 0,847$ ,  $p = 0,016$ ; Grupo Tumores sólidos e Linfomas:  $r_s = 0,389$ ,  $p = 0,041$ ; Grupo Controle:  $r_s = 0,839$ ,  $p = 0,001$ ), indicando que, se houvesse uma relação entre os níveis de BDNF e as contagens de plaquetas, esta relação não estaria presente em todos os tipos de tumores, e sim apenas nas leucemias. Em seguida, analisamos as co-variâncias por ANCOVA, controlando para a contagem de plaquetas. Observou-se que a diferença entre os níveis de BDNF em todos os grupos permaneceram as mesmas ( $p < 0,05$ ), indicando que os níveis de BDNF não são plaquetas-dependentes.

Na avaliação da sobrevida e níveis de BDNF, foi utilizado o valor de 4,00 pg/ml, sendo a mediana encontrada na população estudada e devido ao fato de não existir na literatura um valor de referência para o BDNF. Na Figura 4 podemos observar que os pacientes com neoplasia que apresentaram valores de BDNF menor que 4,00 pg/ml tinham menor sobrevida global ( $p < 0,05$ ). Através da curva de Kaplan-Meier podemos observar que os pacientes que tinham valores maiores ou iguais a 4,00 pg/ml apresentavam probabilidade de sobrevida de aproximadamente 92% aos 20 meses, enquanto pacientes com valores menores que 4,00 pg/ml tinham a probabilidade de sobrevida diminuída para 63% no mesmo período. A relação entre a sobrevida e os valores de plaquetas também foi avaliada, porém que não apresentou diferenças significativas ( $p = 0,675$ ).

## **DISCUSSÃO**

Nas últimas décadas a população pediátrica acometida por algum tipo de câncer se beneficiou imensamente de tratamentos mais eficazes e melhores ferramentas de

dianóstico e prognóstico. No entanto, novo tratamento com alvos mais específicos e marcadores prognósticos mais sensíveis ainda são necessários.

Este estudo foi realizado para investigar se os níveis de BDNF séricos em crianças diagnosticadas com câncer poderia ser utilizada como um possível alvo molecular de diagnóstico ou prognóstico, com base na hipótese de que outros estudos têm mostrado que esta neurotrofina encontra-se alterada em alguns tipos de cânceres [13-20].

Ao analisar a relação entre os níveis de BDNF em diferentes grupos, não foram encontradas diferenças com relação à idade e sexo. No entanto, outros estudos mostraram que os níveis de BDNF podem diferir de acordo com idade e sexo [21,22]. Isto pode ser verdade em uma população adulta, uma vez que um estudo recente em uma população adulta descobriu que os valores BDNF diminuir com a idade, e que as mulheres geralmente têm níveis mais elevados de BDNF quando comparado aos homens [21].

Os valores de BDNF podem ser avaliados em diferentes tecidos, tais como tumores, soro, plasma e plaquetas. Sabe-se que uma grande quantidade de BDNF é armazenada em plaquetas humanas, enquanto que apenas uma pequena quantidade de BDNF circula no plasma sanguíneo e soro [23]. Este fator foi considerado quando este estudo foi delineado, e através da coleta de sangue em tubos contendo EDTA fomos capazes de identificar se este fator interferiu. É importante ressaltar que a variável da contagem de plaquetas foi controlada durante a análise estatística e apesar destes valores apresentarem diferenças significativas, os níveis de BDNF permaneceram diferentes entre pacientes com câncer e o grupo controle.

Quase todos os estudos que avaliaram os níveis de BDNF e sua relação com tumores em crianças e adolescentes foram realizados utilizando experimentos *in vitro*. A

grande maioria dos estudos que examinaram os níveis de BDNF em tumores pediátricos avaliou tumores característicos do sistema nervoso central. Sabe-se que a expressão de BDNF e seu receptor TrkB está associada a um pior prognóstico em neuroblastoma, e pode estar relacionada com a resistência a agentes quimioterapêuticos convencionais [17]. Em um estudo *in vitro* com células de meduloblastoma, foi observado que o BDNF e TrkB pode desempenhar um papel na regulação da viabilidade das células tumorais [24]. Em outro estudo que avaliou crianças com astrocitomas e ependimomas, não foram encontradas diferenças entre os níveis de BDNF no plasma de crianças com diagnóstico de câncer quando comparados com o grupo controle, com exceção do líquido cefalorraquidiano, que apresentaram níveis mais elevados de BDNF em crianças diagnosticadas com câncer [25].

É importante ressaltar que encontramos níveis mais baixos de BDNF em crianças diagnosticadas com leucemia, particularmente leucemia mieloblástica aguda, em comparação com pacientes com diagnóstico de linfoma e tumores sólidos, e em comparação com os controles. Seria importante estabelecer uma avaliação contínua deste grupo, a fim de elucidar se isso pode afetar outros fatores, como resposta à terapia, sobrevida livre de doença e sobrevida global. Vários estudos mostram que a neurotrofina NGF pode desempenhar um papel na hematopoiese, demonstrando a sua capacidade de influenciar diretamente a proliferação, diferenciação e maturação de promotores mielóides, juntamente com a indução de sobrevivência, migração e ativação de células hematopoiéticas maduras [26].

Em um estudo realizado por Li e colaboradores (2009), a co-expressão de BDNF e do seu receptor (TrkB) foi observada em mais de 50% dos casos com diagnóstico de leucemia, levando os pesquisadores a sugerem a possibilidade de que a expressão de BDNF e TrkB em células hematopoiéticas pode ser um fator de risco para

leucemia [27]. Portanto, mais estudos devem ser realizados em uma grande população de pacientes com diagnóstico de leucemia, a fim de avaliar melhor se esta associação, de fato, é verdade para todos os subtipos de leucemia, e para elucidar melhor o papel das neurotrofinas nesta doença.

Não existem estudos na literatura relacionando os níveis BDNF no soro, ou níveis plasmáticos, e sobrevida livre de doença ou sobrevida global em crianças e adolescentes com neoplasia. Na análise da sobrevida da população estudada, mesmo quando avaliamos uma amostra relativamente pequena, verificou-se que os níveis de BDNF inferior a 4,00 pg / mL foram associados com menor sobrevida global (n = 12). Um estudo que avaliou pacientes adultos diagnosticados com leucemia mieloblástica aguda foi observado que pacientes que apresentavam co-expressão de BDNF e TrkB tiveram menores taxas de sobrevida quando comparados aos pacientes que não expressaram BDNF e TrkB, (8% *versus* 30% em três anos, respectivamente), embora não foram encontradas diferenças significativas na avaliação de sobrevida livre de eventos [27].

Este é o primeiro estudo, do nosso conhecimento, a avaliar os níveis de BDNF séricos em crianças e adolescentes diagnosticados com câncer. Embora estes resultados possam ser preliminares, indicam um possível novo fator prognóstico e alvo molecular do tumor, e oferece uma base científica para estudos posteriores.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pelo Projeto Rafael Koff Acordi (Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul; ICI-RS), pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(FIPE-HCPA) pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram que não há conflito de interesse que possa ter influenciado os resultados e discussão aqui apresentados.

## **REFERÊNCIAS**

1. Malcolm A, Ries L. Childhood cancer: incidence, survival, and mortality. Principles and Practice of Pediatric Oncology. P. Pizzo and D. Poplack. Philadelphia, 2002; Lippincott Williams & Wilkins: 2-12.
2. INCA. A Situação do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA - Instituto Nacional do Câncer 2006.
3. INCA. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional. M. d. Saúde. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer - INCA. IV: 488, 2010.
4. Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. Neuron 1989; 2(6): 1525-1534.
5. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci 2001;24: 677-736.
6. Moris G, Vega J. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. Neurologia 2003; 18(1): 18-28.
7. Krüttgen A, Schneider I, et al. The Dark Side of the NGF Family: Neurotrophins in Neoplasias. Brain Pathology 2006; 16(4): 304-310.

8. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2006; 361(1473): 1545-1564.
9. Atwal JK, Massie B, et al. The TrkB-Shc Site Signals Neuronal Survival and Local Axon Growth via MEK and PI3-Kinase. *Neuron* 2000; 27(2): 265-277.
10. Barnabé-Heider F, Miller FD. Endogenously Produced Neurotrophins Regulate Survival and Differentiation of Cortical Progenitors via Distinct Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(12): 5149-5160.
11. Abujamra AL, Spanjaard RA, et al. Leukemia virus long terminal repeat activates NFκB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 2006; 345(2): 390-403.
12. Chiappa SA, Chin LS, et al. Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery* 1999; 45(5): 1148-55.
13. Brodeur GM, Nakagawara A, et al. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol* 1997; 31(1-2): 49-55.
14. Feng X, Jiang H, et al. BDNF dependence in neuroblastoma. *J Neurosci Res* 2001; 64(4): 355-63.
15. Schramm A, Schulte JH, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005; 228(1-2): 143-53.
16. Zhang JH, Li AM, et al. Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 2008; 10(1): 47-50.
17. Ho R, Eggert A, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6462-6.

18. Ho R, Minturn JE, et al. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas." *Cancer Lett* 2011; 305(1): 76-85.
19. Light JE, Koyama H, et al. Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59(2): 226-32
20. Zage PE, Graham TC, et al. The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer* 2011; 117(6): 1321-1391.
21. Lommatzsch M, Zingler D, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005; 26(1): 115-23.
22. Iughetti L, Casarosa E, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides*. 2011;45(3): 205-11
23. Jeon HJ, Kang ES, et al Childhood trauma and platelet brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after a three month follow-up in patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2012; 46(7): 966-72.
24. Schmidt AL, de Farias CB, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 2010; 40(3): 303-10.
25. Chiaretti A, Aloe L, et al. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst* 2004; 20(6): 412-9.
26. Rezaee F, Rellick SL, et al. Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway. *PLoS One*. 2010; 15;5(3):e9690.
27. Li Z, Beutel G, et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 2009; 113(9): 2028-37.

Tabela 1. Informações demográficas e clínicas

	N (%) / Mediana (percentis 25 – 75)					p
	Total (n = 114)	LLA (n = 36)	LMA (n = 7)	Linfoma/Tumores sólidos (n = 29)	Controles (n = 42)	
<b>Sexo</b>						
Feminino	45 (40,2)	26 (72,2)	4 (57,1)	18 (62,1)	18 (45,0)	0,103
Masculino	67 (59,8)	10 (27,8)	3 (42,9)	11 (37,9)	22 (55,0)	
<b>Idade</b>						
Até 10 anos	51 (44,7)	11 (30,6)	2 (28,6)	7 (28,0)	12 (28,6)	0,844
> 10 anos	63 (55,3)	25 (69,4)	5 (71,4)	18 (72,0)	30 (71,4)	
BDNF (pg/ml)	4,35 (1,38 a 9,3)	2,45 (0,76 a 5,23) <sup>b</sup>	0,25 (0,08 a 0,80) <sup>a</sup>	9,0 (3,14 a 14,7) <sup>c</sup>	6,08 (2,60 a 9,35) <sup>c</sup>	< 0,001
Plaquetas	99250 (186500 a 253750)	160500 (37000 a 197750) <sup>a</sup>	47000 (14000 a 120000) <sup>b</sup>	232500 (172750 a 325750) <sup>c</sup>	269500 (225500 a 347750) <sup>c</sup>	< 0,05

LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA, Leucemia Mieloblástica Aguda;

a,b,c - Letras iguais não diferem pelo teste de Mann-Whitney a 5% de significância

Figura 1.

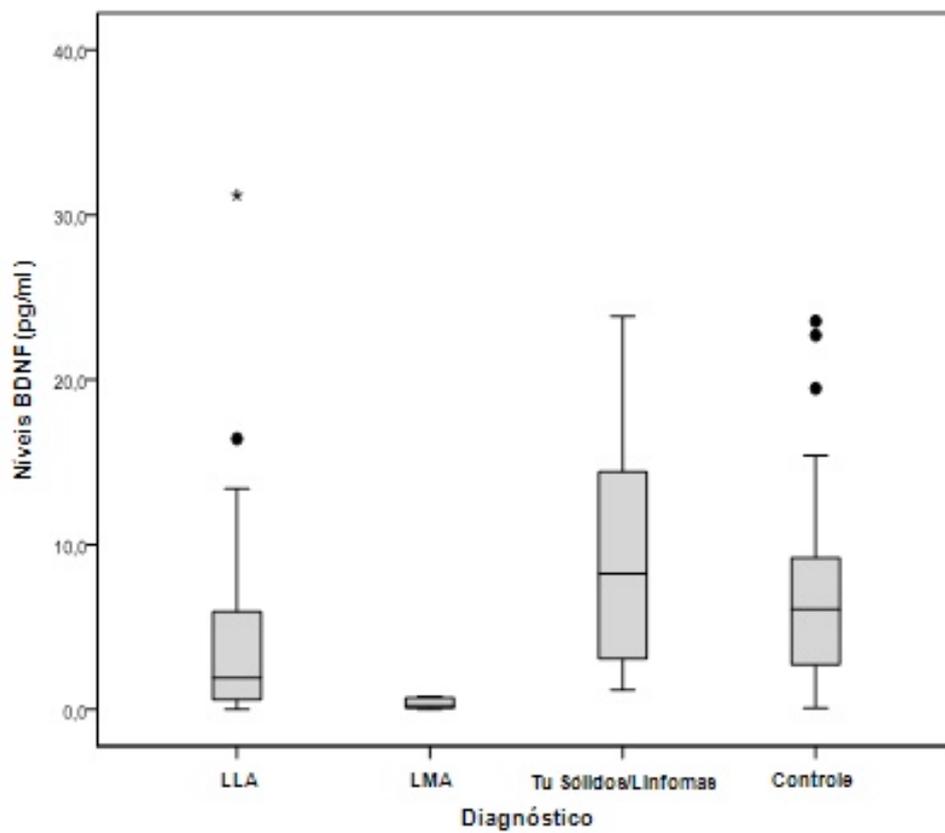


Figura 1. Níveis de BDNF e Grupos de diagnóstico e controles

Figura 2.

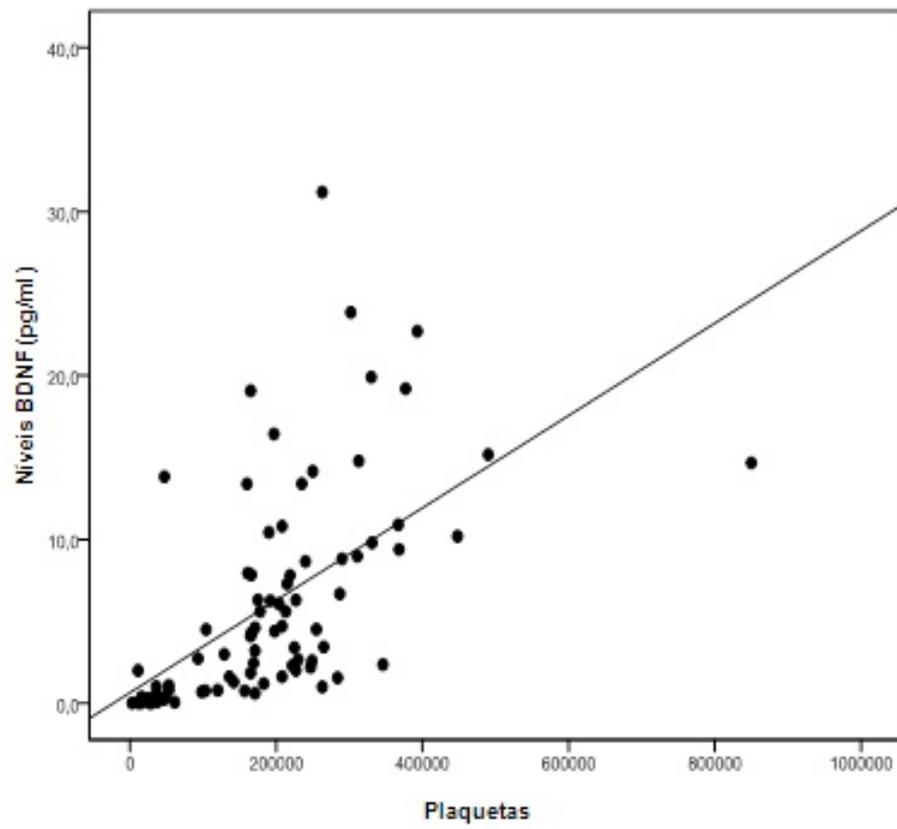


Figura 2. Níveis de BDNF e Plaquetas

Figura 3.

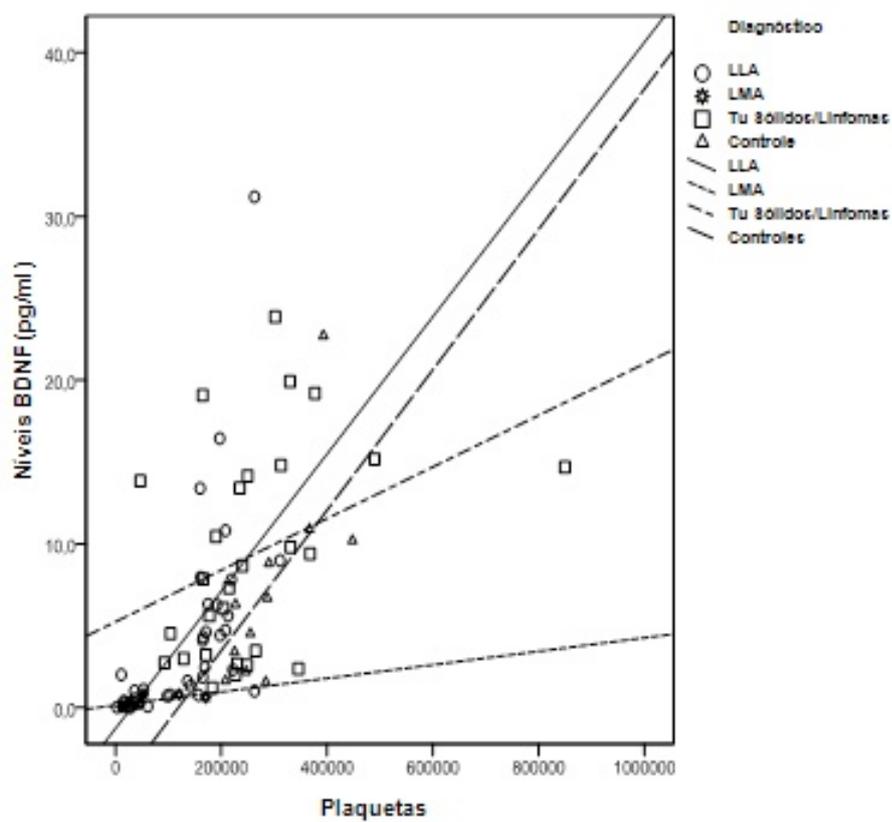


Figura 3. Níveis de BDNF e Plaquetas por Grupo de diagnóstico e controles

Figura 4.

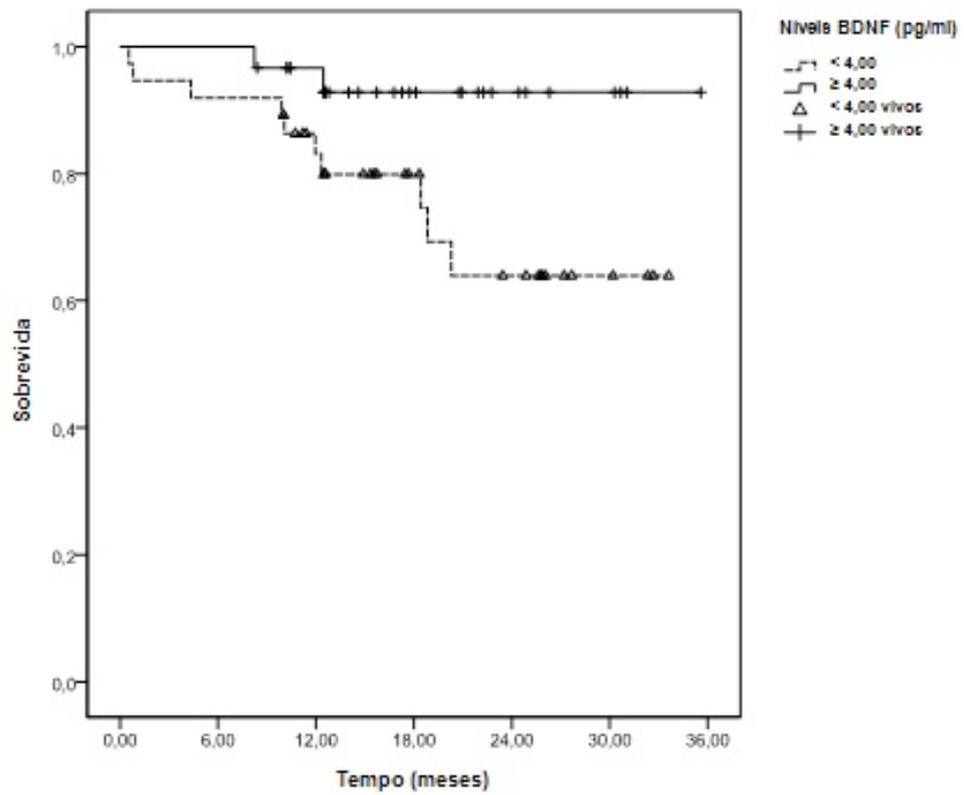


Figura 4. Sobrevida e Níveis de BDNF

## 8. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

### **BDNF Levels Associate with Overall Survival in Pediatric Patients Diagnosed with Cancer**

Fernanda Odrzywolek Rodrigues<sup>1</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>2,3</sup>, Jiseh Fagundes Loss<sup>4</sup>,  
Bruno Kilpp Goulart<sup>2</sup>, Ana Lucia Abujamra<sup>2,3,4</sup>, Algemir Lunardi Brunetto<sup>2,4</sup>, José  
Lauro Gregianin<sup>4,5</sup>

1. Graduate Program in Child and Adolescent Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2. Laboratory for Research on Cancer, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

3. National Institute of Science and Technology in Translational Medicine

4. Cancer Institute and Children's Pediatric Oncology Unit of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

5. Professor of Graduate Program in Child and Adolescent Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

#### **Corresponding author:**

Lauro José Gregianin, Pediatric Oncology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 3rd floor east, 90035-903 Porto Alegre, Brazil, Telephone: (51) 3359.8267 Fax: 3330.8087

## ABSTRACT

Neurotrophins and their receptors are important regulators of survival, development and neuronal plasticity. They are also involved in the oncogenic process, which can facilitate or suppress tumor growth. The aim of this study was to evaluate BDNF serum levels in pediatric patients and its possible relationship with gender, age, platelet count and survival. The study included 114 patients; 72 patients diagnosed with cancer and 42 controls matched for age and gender. The median (P 25-75) values of BDNF were 2,45 (0,76-5,23) pg/ml for the group with ALL, 0,45 (0,08-0,80) pg/ml for the group with LMA, 9,0 (3,14-14,7) pg/ml for the group with lymphomas and solid tumors and 6,08 (2,60-9,35) pg/ml in the control group. There was no difference between BDNF values when compared to gender and age among the different groups. Regarding BDNF values and platelets, there were significant differences between groups of patients diagnosed with leukemias and other groups. Patients with cancer who had BDNF values lower than 4.00 pg / mL had a lower survival curve ( $p < 0.05$ ).

Keywords: Pediatric Oncology • BDNF • Leukemia • Survival

## INTRODUCTION

Pediatric tumors are relatively rare compared with those affecting the adult population, [1-3], and present specific clinical features, such as short latency periods, quick growth and a higher propensity for invasiveness and metastasis. On the other hand, pediatric tumors respond better to treatment and, in general, have a better prognosis when compared to adult tumors [2].

Neurotrophins are proteins that are mainly responsible for coordinating processes involved in neuronal survival, growth and differentiation [4-7]. These ligands interact with two distinct classes of receptors: p75 neurotrophin receptors and receptors related to tropomyosin kinase (Trk) [8].

It is known that neurotrophins and their receptors are involved in the oncogenic process [9-11]. An increase in neurotrophin levels and/or in their respective receptors, as well as a dysregulation in the Trk signaling pathway, may lead to tumorigenesis [12]. The association between neurotrophin levels and their respective receptors has been mainly investigated in adult tumors. With regards to pediatric neoplasms, few studies have been undertaken, mostly focusing in *in vitro* experiments.

Despite of the recent advances in the field of pediatric oncology, efforts are still necessary to identify more effective treatments, all the while reducing toxicity. The analysis of differences between neurotrophin levels in children with or without cancer, as well as variations in neurotrophin levels between the different types of malignancies, can contribute in determining whether this could be considered as a new prognostic or diagnostic factor, or as a potential therapeutic target. Thus the objective of this study

was to evaluate BDNF plasma levels in pediatric patients versus healthy controls, and how these levels vary, if at all, with the patient's gender, age, and platelet count.

## MATERIALS AND METHODS

Patients were considered eligible for the study if they were diagnosed with leukemia, lymphoma or solid tumors and were aged between zero and 18 years. Children in the control group underwent blood collection at another hospital in the same city and were matched for age and gender. This study was approved by the Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All study subjects signed an informed consent form before being included in the study protocol.

All patient samples were collected during the patients' routine diagnostic procedure, so as to avoid an extra visit to the hospital solely for this study's purpose. Blood was drawn into a blood collection tube containing EDTA and was immediately processed by centrifuging at 3000rpm for 5 minutes at room temperature. The plasma was transferred to an Eppendorf tube and stored for later analysis at -80°. BDNF levels were assayed via indirect ELISA .

Patient samples and control samples were gender and age matched. Patient samples were further stratified according to diagnosis (acute lymphoblastic leukemia, acute myeloblastic leukemia, lymphomas and solid tumors), platelet count and, if applicable, overall survival.

## RESULTS

This study included a total of 114 patients, 72 of which were diagnosed with cancer and 42 controls. The demographic and clinical characteristics are presented in Table 1. BDNF levels and platelet counts are presented in median percentiles since they have an asymmetric distribution. There was no difference between BDNF values between the two groups with regards to gender and age.

BDNF levels and platelet counts were significantly different between the leukemia groups (ALL and AML) when compared to other groups. This could be explained in part by the fact that leukemia patients undergoing treatment have a tendency for developing thrombocytopenia. In Figure 1 presents the BDNF levels for all groups (ALL, AML, lymphomas, solid tumors and controls). It is observed that the leukemias (ALL and AML) show a tendency for less variability, indicating greater homogeneity between BDNF values .

In order to better evaluate the relationship between BDNF and platelet counts, the relationship between these two variables was evaluated. Figure 2 shows the relationship between BDNF levels and platelet counts, which shows that there was a positive correlation between BDNF levels and platelet counts ( $r_s = 0.721$ ,  $p < 0.001$ ). This is to be expected, since BDNF plasma levels were evaluated as opposed to BDNF serum levels, and it is known that platelets and other clotting factors are BDNF carriers. To evaluate whether this relationship occurred only in leukemic patients, we stratified the groups according to tumor type and controls. As shown in figure 3, the ratio between BDNF levels and platelet counts is maintained (LLA:  $r_s = 0.721$ ,  $p < 0.001$ ; AML:  $r_s = 0.847$ ,  $p = 0.016$ ; Solid tumors and lymphomas:  $r_s = 0.389$ ,  $p = 0.041$ ;

Controls:  $r_s = 0.839$ ,  $p = 0.001$ ), indicating that, if there were a relationship between BDNF levels and platelet counts, then this relationship is present in all tumor types and not only in leukemias. We then analyzed the co-variances by ANOVA, controlling for platelet count. It was observed that the difference between BDNF levels in all groups remain the same ( $p < 0.05$ ), indicating that the BDNF levels were not platelet-dependent.

We then proceeded to evaluate whether survival and BDNF were associated. A BDNF level of 4.00 pg/mL was utilized as a cut off point, since this was the median found in our study population, and in accordance with other literature data. As shown in Figure 4, cancer patients with BDNF levels of less than 4.00 pg/mL had a shorter overall survival ( $p < 0.05$ ). The Kaplan-Meier curves of patients who had BDNF levels greater than or equal to 4.00 pg/mL indicates a survival rate of approximately 92% at 20 months, while patients with values lower than 4.00 pg/mL had a survival rate of only 63% at the same time point. The relationship between survival and platelet count was also evaluated, showing no significant differences ( $p = 0.675$ ).

## DISCUSSION

In the past decades the pediatric population suffering from some type in cancer benefited immensely from new effective treatments and better diagnostic and prognostic tools. However, new treatment with more specific targets and more sensitive prognostic markers are still necessary.

This study was conducted to investigate whether BDNF plasma levels in children diagnosed with cancer could be considered for a possible diagnostic,

prognostic ou molecular target, based on the hypothesis that other studies have shown that this neurotrophin is altered in some cancers types [13-20].

When analyzing the relationship between BDNF levels in different groups, no differences were found with regards to age and gender. However, other studies have shown that BDNF levels may differ in accordance to age and gender [21,22]. This might be true in an adult population, since a recent study in an adult population found that BDNF values decrease with increasing age, and that women generally have higher BDNF levels when compared to men [21].

BDNF can be evaluated in different tissues such as tumors, serum, plasma and platelets. It is known that a large amount of BDNF is stored in human platelets, while only a small amount of BDNF circulates in serum and blood plasma [23]. This factor was considered when designing this study, and by collecting blood in tubes containing EDTA we were able to identify whether this factor came into play. It is important to point out that the platelet count variable was controlled during out statistical analysis and despite platelet count values, BDNF levels remained different between cancer patients and the control group.

Almost all studies which evaluated BDNF levels and its relationship with tumors in children and adolescents were performed using *in vitro* experiments. The vast majority of studies which examined BDNF levels in pediatric tumors did so with regards to the central nervous system. It is known that BDNF expression and its receptor TrkB is associated with a worse prognosis in neuroblastoma, and may be related to resistance to conventional chemotherapeutic agents [17]. In an *in vitro* study with medulloblastoma cells, BDNF and TrkB may play a role in regulating tumor cell viability [24]. In a study evaluating children with astrocytomas and ependymomas, no

differences were found between BDNF levels in the plasma of children diagnosed with cancer when compared with the control group, with the exception of the cerebrospinal fluid, which showed higher BDNF levels in children diagnosed with cancer [25].

It is noteworthy that we found lower BDNF levels in children diagnosed with leukemia, particularly acute myeloblastic leukemia, as compared to patients diagnosed with lymphoma and solid tumors, and as compared to controls. It would be important to establish an ongoing evaluation of this group, in order to elucidate whether this may affect other factors such as response to therapy, disease-free survival, and overall survival. Several studies show that the neurotrophin NGF may play a role in hematopoiesis, demonstrating its ability to directly influence the proliferation, differentiation, and maturation of myeloid promoters along with the induction of survival, migration and activation of mature hematopoietic cells [26].

In a study by Li and colleagues (2009), co-expression of BDNF and its receptor (TrkB) was observed in more than 50% of diagnosed leukemias, leading researchers to suggest the possibility that BDNF and TrkB expression in hematopoietic cells may be a risk factor for leukemias [27]. Therefore, further studies should be performed in a large population of patients diagnosed with leukemia in order to better evaluate whether this association is in fact true for all leukemia subtypes, and to better elucidate the role of neurotrophins in this disease.

There are no studies in the literature relating BDNF serum or plasma levels and disease-free survival or overall survival in children and adolescents. In the survival analysis of our study population, even when evaluating a relatively small sample and control population, we found that BDNF levels lower than 4.00 pg/mL was associate with a lower overall survival (n = 12). A study evaluating adult patients diagnosed with

acute myeloblastic leukemia found that patients who co-expressed BDNF and TrkB also had lower survival rates when compared to patients who did not express BDNF and TrkB, (8% versus 30% in three years respectively), although no significant differences were found when evaluating event-free survival [27].

This is the first study to our knowledge evaluating BDNF plasma levels in children and adolescents diagnosed with cancer. Although these results may be preliminary, they indicate a possible new prognostic factor and molecular tumor target, and offers a scientific basis for further studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by the Rafael Koff Acordi Project (Children's Cancer Institute; ICI-RS), the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

#### CONFLICTS OF INTEREST

The authors hereby declare that there are no conflict of interest that may have influenced the results and discussion presented herein.

## REFERENCES

28. Malcolm A, Ries L. Childhood cancer: incidence, survival, and mortality. Principles and Practice of Pediatric Oncology. P. Pizzo and D. Poplack. Philadelphia, 2002; Lippincott Williams & Wilkins: 2-12.
29. INCA. A Situação do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA - Instituto Nacional do Câncer 2006.
30. INCA. Câncer no Brasil - Dados dos Registros de Base Populacional. M. d. Saúde. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer - INCA. IV: 488, 2010.
31. Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. Neuron 1989; 2(6): 1525-1534.
32. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci 2001;24: 677-736.
33. Moris G, Vega J. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. Neurologia 2003; 18(1): 18-28.
34. Krüttgen A, Schneider I, et al. The Dark Side of the NGF Family: Neurotrophins in Neoplasias. Brain Pathology 2006; 16(4): 304-310.
35. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2006; 361(1473): 1545-1564.
36. Atwal JK, Massie B, et al. The TrkB-Shc Site Signals Neuronal Survival and Local Axon Growth via MEK and PI3-Kinase. Neuron 2000; 27(2): 265-277.
37. Barnabé-Heider F, Miller FD. Endogenously Produced Neurotrophins Regulate Survival and Differentiation of Cortical Progenitors via Distinct Signaling Pathways. The Journal of Neuroscience 2003; 23(12): 5149-5160.

38. Abujamra AL, Spanjaard RA, et al. Leukemia virus long terminal repeat activates NF $\kappa$ B pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology* 2006; 345(2): 390-403.
39. Chiappa SA, Chin LS, et al. Neurotrophins and Trk receptors in primitive neuroectodermal tumor cell lines. *Neurosurgery* 1999; 45(5): 1148-55.
40. Brodeur GM, Nakagawara A, et al. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol* 1997; 31(1-2): 49-55.
41. Feng X, Jiang H, et al. BDNF dependence in neuroblastoma. *J Neurosci Res* 2001; 64(4): 355-63.
42. Schramm A, Schulte JH, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005; 228(1-2): 143-53.
43. Zhang JH, Li AM, et al. Blocking TrkB-BDNF signal pathway decreases the livability of neuroblastoma cells. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 2008; 10(1): 47-50.
44. Ho R, Eggert A, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6462-6.
45. Ho R, Minturn JE, et al. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas." *Cancer Lett* 2011; 305(1): 76-85.
46. Light JE, Koyama H, et al. Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59(2): 226-32
47. Zage PE, Graham TC, et al. The selective Trk inhibitor AZ623 inhibits brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroblastoma cell proliferation and signaling and is synergistic with topotecan. *Cancer* 2011; 117(6): 1321-1391.
48. Lommatzsch M, Zingler D, et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005; 26(1): 115-23.

49. Iughetti L, Casarosa E, et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides*. 2011;45(3): 205-11
50. Jeon HJ, Kang ES, et al Childhood trauma and platelet brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after a three month follow-up in patients with major depressive disorder. *J Psychiatr Res*. 2012; 46(7): 966-72.
51. Schmidt AL, de Farias CB, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 2010; 40(3): 303-10.
52. Chiaretti A, Aloe L, et al. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst* 2004; 20(6): 412-9.
53. Rezaee F, Rellick SL, et al. Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway. *PLoS One*. 2010; 15;5(3):e9690.
54. Li Z, Beutel G, et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 2009; 113(9): 2028-37.

Table 1. Information Regarding Patient Population

	N (%) / Median (percentiles 25 – 75)					p
	Total (n = 114)	ALL (n = 36)	AML (n = 7)	Lymphoma/Solid Tumors (n = 29)	Controls (n = 42)	
Gender						
Female	45 (40,2)	26 (72,2)	4 (57,1)	18 (62,1)	18 (45,0)	0,103
Male	67 (59,8)	10 (27,8)	3 (42,9)	11 (37,9)	22 (55,0)	
Age						
≤ 10 years	51 (44,7)	11 (30,6)	2 (28,6)	7 (28,0)	12 (28,6)	0,844
> 10 years	63 (55,3)	25 (69,4)	5 (71,4)	18 (72,0)	30 (71,4)	
BDNF (pg/mL)	4,35 (1,38 to 9,3)	2,45 (0,76 to 5,23) <sup>b</sup>	0,25 (0,08 to 0,80) <sup>a</sup>	9,0 (3,14 to 14,7) <sup>c</sup>	6,08 (2,60 to 9,35) <sup>c</sup>	< 0,001
Platelets	99250 (186500 to 253750)	160500 (37000 to 197750) <sup>a</sup>	47000 (14000 to 120000) <sup>b</sup>	232500 (172750 to 325750) <sup>c</sup>	269500 (225500 to 347750) <sup>c</sup>	< 0,05

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloblastic leukemia;

a,b,c – these values no not differ according to the Mann-Whitney test, 5% significance

Figure 1.

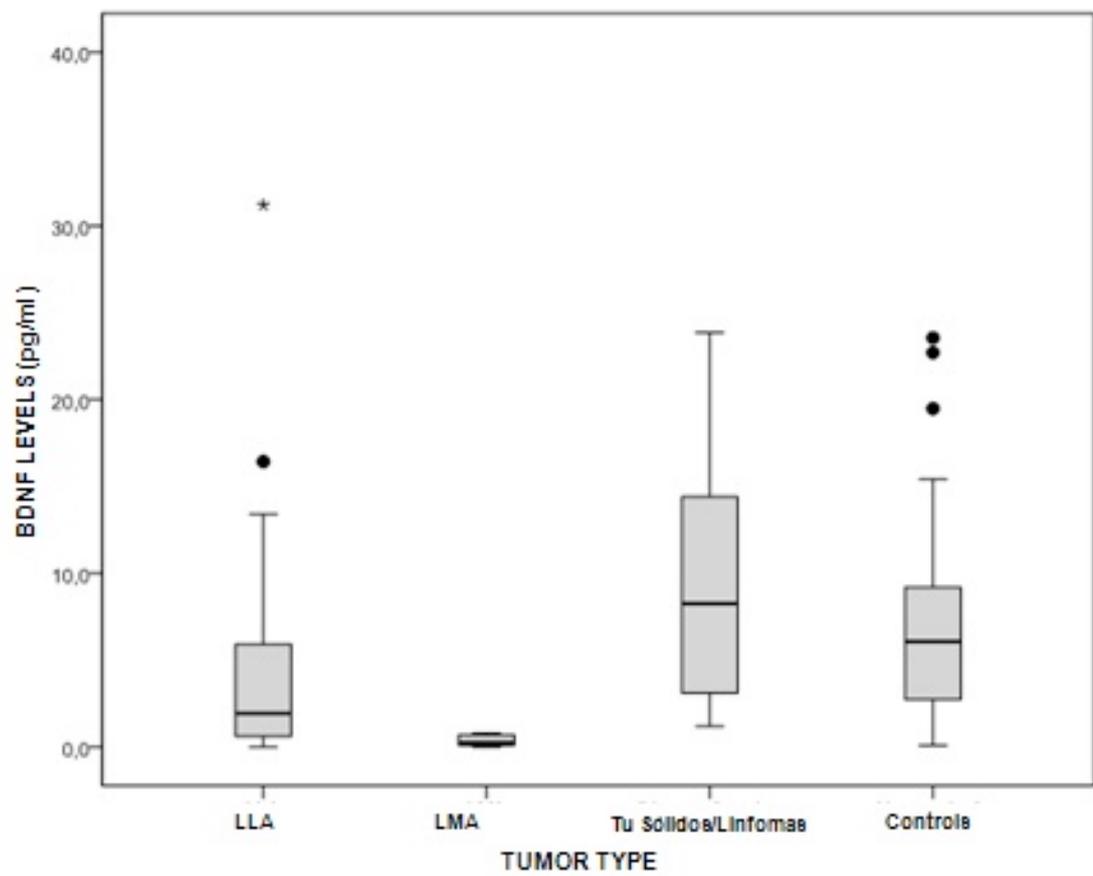


Figure 1. BDNF levels in different patient populations and in the control groups

Figure 2.

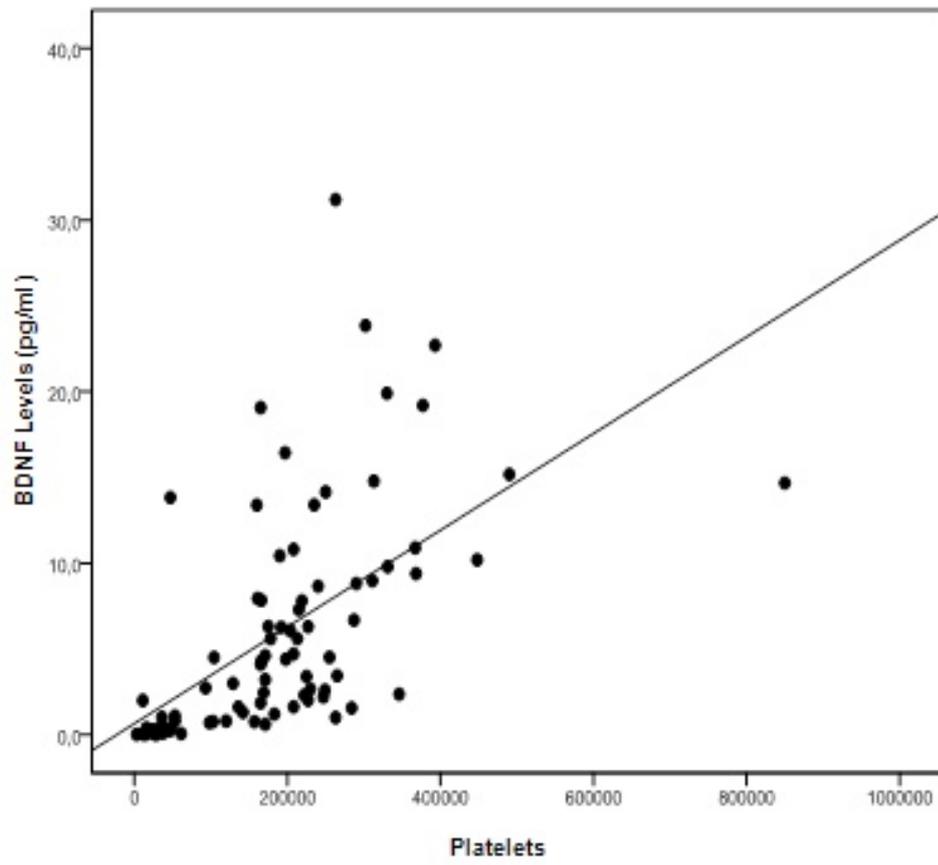


Figure 3.

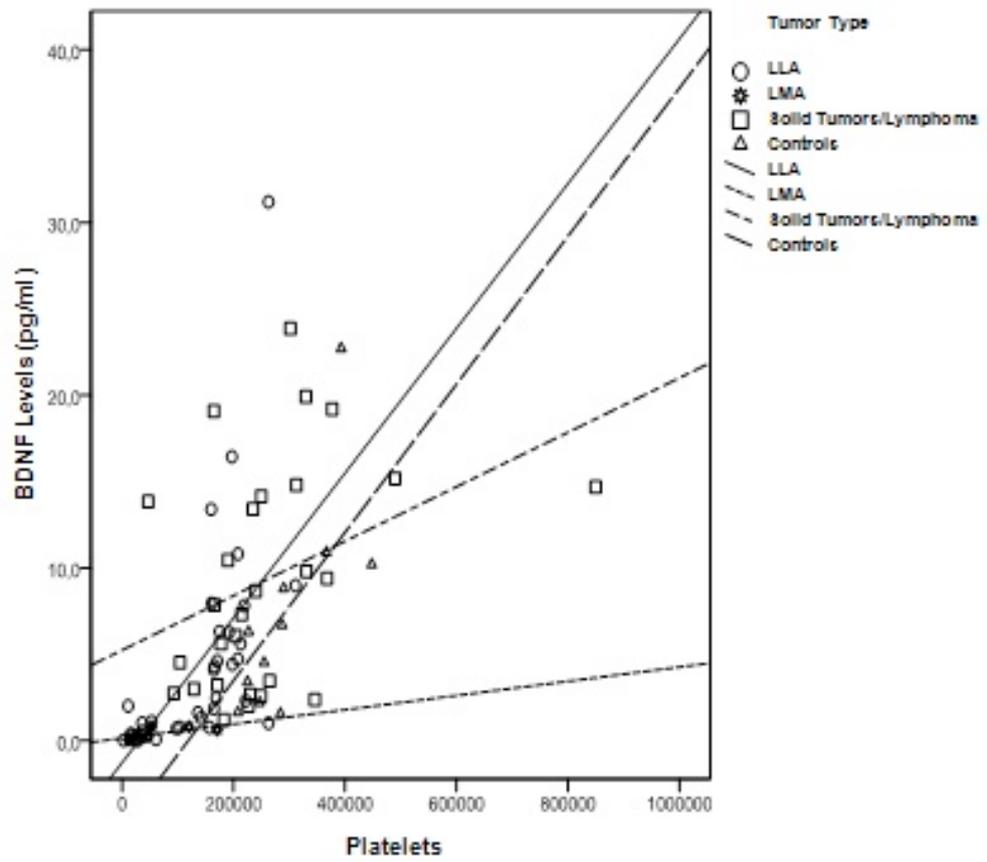


Figure 3. BDNF levels and platelet counts according to tumor type

Figure 4.

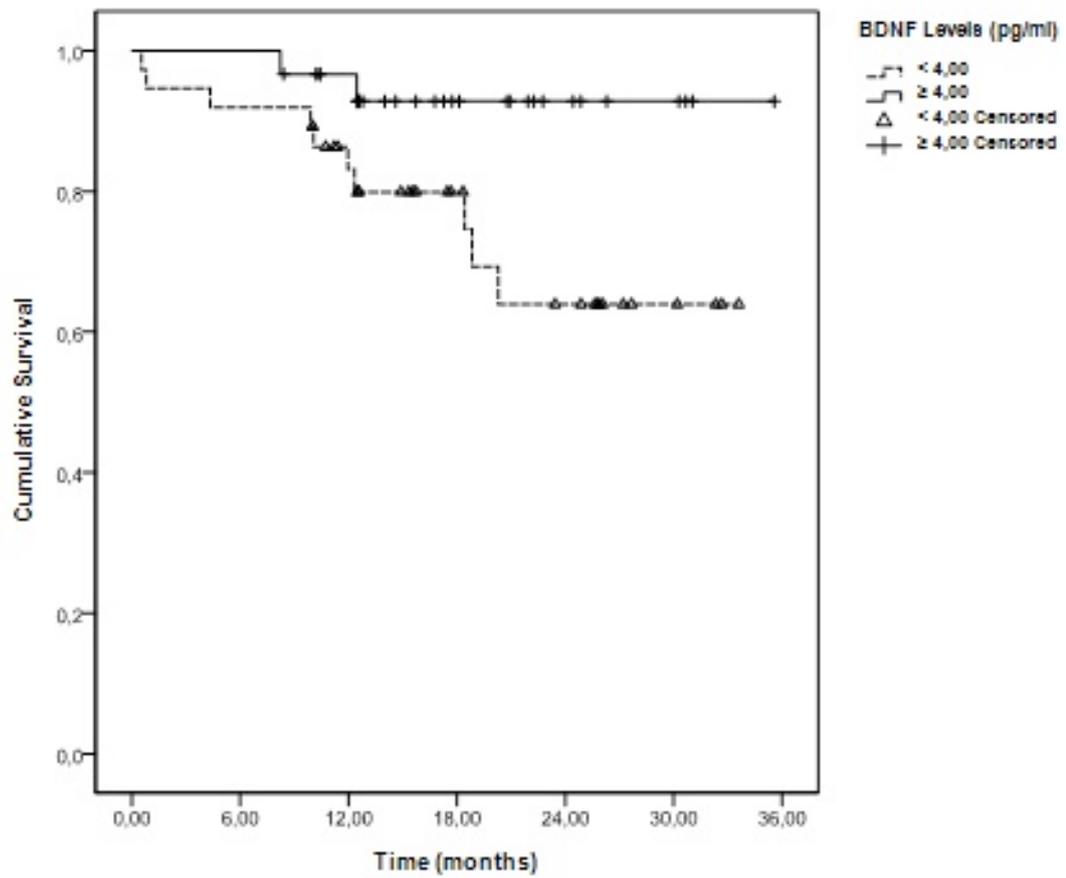


Figure 4. Cumulative survival as measured according to BDNF levels (4.0 pg/mL).

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o câncer infanto-juvenil apresenta taxas de cura altas, estima-se que este valor seja em torno de 85% de forma global. Em decorrência de esforços múltiplos, principalmente através de pesquisas com novos agentes terapêuticos e modalidades de tratamento, muitas crianças e adolescentes têm conseguido atingir a idade adulta. Através da pesquisa básica cada vez mais novas descobertas estão chegando à pesquisa clínica, e com isto podemos pensar em novos alvos terapêuticos e/ou marcadores para diagnóstico e prognóstico.

O estudo das neurotrofinas é extremamente amplo, porém ainda temos poucas pesquisas realizadas em crianças com neoplasia. Este estudo foi desenvolvido a fim de investigar os valores de BDNF em crianças com neoplasias e compará-las com crianças previamente hípidas, assim como verificar as diferenças entre os diferentes tipos de neoplasias. Com os resultados encontrados podemos observar que estas diferenças existem, porém ainda temos que descobrir o porquê e quais vias de sinalização estão envolvidas e o papel das neurotrofinas durante o processo oncológico, em especial nas leucemias.

Mesmo com as limitações do estudo, pode-se observar que as neurotrofinas têm papel importante no câncer infanto-juvenil, variando seus níveis conforme o diagnóstico e podendo ter algum tipo de influência na sobrevida dos pacientes acometidos por tumores na infância. Sabemos que existem diversos fatores que influenciam tanto o aparecimento do câncer pediátrico como a resposta ao tratamento. Com certeza mais estudos devem ser realizados para a identificação de alvos importantes que podem auxiliar no diagnóstico e/ou tratamento dos tumores infanto-juvenil.

## **APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE BDNF EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS**

Investigador Principal: Dr. Rafael Roesler  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 2º andar – CPB  
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 alguma neoplasia. O seu médico já lhe informou que coletas de sangue serão feitas 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 as células dos pacientes diagnosticados com neoplasias para verificarmos algumas alterações que podem estar presentes. Para isso nós analisaremos certas proteínas presente no sangue do paciente.

#### **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 a mais (de 3mL à 4mL), no momento em que for realizado o exame de sangue de rotina. Uma parte deste sangue será usada para a pesquisa e**

**analisada em nosso laboratório. O restante do sangue será destinado aos exames solicitados pelo seu médico.**

#### RISCOS POTENCIAIS E DESCONFORTOS

O procedimento usado para a coleta de sangue é o utilizado rotineiramente. Entretanto, como qualquer procedimento hospitalar existe um risco a ser observado. O paciente pode sentir algum desconforto durante o procedimento quando a agulha penetra na pele ou quando é colocado o torniquete ao redor do braço para melhor localizar os vasos sanguíneos. A retirada da quantidade de sangue necessária à realização do estudo não trará nenhum efeito adverso. É possível que o paciente apresente a formação de algum hematoma no local da coleta (área roxa), mas isto desaparecerá em alguns dias.

#### BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não oferecemos benefícios diretos a você. Você pode contribuir nos ajudando com o melhor entendimento desta doença.

#### COM QUEM DEVE 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** pelos telefones: **51 – 2101.7616** ou **51-8110.8137** ou com o pesquisador responsável pelo estudo, **Dr. Rafael Roesler** pelo telefone: **51 – 2101.7616**.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um dos participantes no estudo, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: **Dra. Nadine Claussel, telefone: 51 – 2101.8304**

#### PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A participação neste estudo de pesquisa é voluntária e depende da sua decisão (decisão de seu filho/sua filha). O atendimento médico que você (seu filho/sua filha) recebe no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Oncologia Pediátrica, ou fora dele não

será afetado agora ou futuramente, quer você (seu filho/sua filha) participe ou não neste estudo.

Os dados deste estudo podem ser publicados. Entretanto, o seu nome (nome de seu filho/sua filha) e outras informações de identificação não sairão do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Oncologia Pediátrica, sem permissão por escrito, a menos que permitido pelas leis aplicáveis.

### CONSENTIMENTO

*Pedimos que caso você concorde em realizar o tratamento, assine este consentimento de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, de outubro de 1996, que assegura a proteção dos pacientes envolvidos em pesquisa biomédica.*

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

Eu, abaixo assinado, de nome \_\_\_\_\_, responsável pelo paciente \_\_\_\_\_ confirmo que fui informado quanto aos riscos, vantagens e possíveis efeitos colaterais que possam ser resultantes do tratamento. 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 eu (meu filho / minha filha) tenho (a) o direito de receber.

\_\_\_\_\_ / /

Assinatura do Paciente ou Responsável

Data

\_\_\_\_\_ / /

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data