

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**BDNF/TrkB EM CÂNCER COLORRETAL: INTERAÇÕES FUNCIONAIS COM
GRPR E EGFR**

CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

Porto Alegre
Setembro de 2012

CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

**BDNF/TrkB EM CÂNCER COLORRETAL: INTERAÇÕES FUNCIONAIS COM
GRPR E EGFR**

**Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Doutor**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre
Setembro de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisa Experimental no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Instituto Nacional de Medicina Translacional (INCT), Instituto do Câncer Infantil do RS (ICI-RS), Fundação Sul-Americana para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer (Fundação SOAD), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e Fundação de Apoio a Pesquisa do Rio Grande do Sul (10/0044-3 - PRONEX).

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO ao meu orientador, Rafael Roesler, pelo seu apoio, incentivo e confiança. Obrigada Rafa, além de seres um profissional excepcional, um grande mestre, és uma pessoa maravilhosa, a quem eu tenho o orgulho de chamar de amigo.

À Ana Lucia Abujamra minha chefe, colega, sócia e amiga. Obrigada pelo auxílio, paciência e estímulo.

À Daniela Cornélio, colega, parceira, sócia e grande amiga, amiga de verdade, de todas as horas, mulher de garra e entusiasmo... queria ter metade da tua energia, te admiro muito.

Aos meus colegas e grandes amigos de ontem, de hoje e sempre, do Laboratório de Pesquisas em Câncer, Amanda, Anníssima, Carol, Dani, Débora Flores, Débora Prush, Felipe, Fê Rodrigues, Gustavo, Lilian, Lu Lima, Marcela, Mari Jager, Mari Schrader, Natasha, Rafa, Rodrigo, Tiago e Vivi. Vocês todos foram fundamentais para a realização deste trabalho, participando com competência e dedicação, dando sugestões valiosas. Muito obrigada a vocês que me ensinaram o verdadeiro significado de “trabalho em equipe”.

Agradeço às Lulus e às minhas amigas queridas Maína Bonetti, Daniela Ainhoren, Giovana Kovaleski, todas vocês são amigas incansáveis, companheiras de todas as horas. Obrigada pela força, fé e carinho. Pra mim é uma grande honra chamá-las de amigas.

À Carmem e Goulart por sempre me receberem de braços abertos com tanto carinho e atenção.

Agradeço ao Instituto do Câncer Infantil do RS e aos meus colegas pela confiança, incentivo e auxílio.

Agradeço, principalmente, à minha mãe e ao meu pai, que foram excepcionalmente dedicados e compreensivos durante toda minha vida, me apoiando, ouvindo, incentivando, ajudando a superar as dificuldades, celebrando cada resultado. Obrigado por me mostrarem que o impossível pode ser possível, que mesmo com dificuldades ao longo do caminho somos sim, capazes de superar tudo, e que sonhando com os pés no chão podemos vencer.

Agradeço ainda aos meus pequenos grandes irmãos, Dário e Davi, e a minha afilhada querida Diulia, que compreenderam minha ausência neste período.

E finalmente, mas não menos importante, agradeço ao Bruno pelo seu carinho, amparo, dedicação e amor. Obrigada por entender e apoiar todos os meus sonhos e projetos. Obrigada por permanecer ao meu lado em todos os momentos, me acalmando e acreditando em mim.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	07
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	11
1.2 Câncer Colorretal	20
1.2.1 Síndromes Hereditárias.....	22
1.2.2 Rastreamento, Acompanhamento e Avaliação de Resposta.....	27
1.2.3 Estadiamento.....	28
1.2.4 Tratamento: quimioterápicos e anticorpos monoclonais.....	28
1.3 Peptídeo Liberador de Gastrina	36
2 OBJETIVOS	44
3 CAPÍTULO 1	45
4 CAPÍTULO 2	56
5 CAPÍTULO 3	62
6 CAPÍTULO 4	72
7 DISCUSSÃO	76
8 CONCLUSÕES	86
9 PERSPECTIVAS	88
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
11 APÊNDICES	106
11.1 Artigo Publicado	107
11.2 Pedido de Patente N° PI BR 10 2012-08895	111

11.3 Pedido de Patente N° PI BR 10 2012-012574-9.....	117
11. 4 Artigo Aceito.....	124
12 CURRÍCULO LATTES.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-FU:** 5 -Fluoracil
- BDNF:** *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
- BRS3:** *Bombesin-like Receptor 3* (Receptor preferencial para o subtipo 3 de Bombesina)
- CCR:** Carcinoma colorretal
- COX2:** *Cyclooxygenase 2* (Cicloxigenase 2)
- DACH:** Diaminociclohexano
- DAG:** *Diacylglycerol* (Diacilglicerol)
- EGF:** *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidérmico)
- EGFR:** *Epidermal Growth Factor* (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
- ERK:** *Extracellular Signal-Regulated Kinases* (Quinase reguladora de sinal extracelular)
- FAK:** *Focal-adhesion kinase* (quinase de adesão focal)
- GPCRs:** *G protein-coupled receptors* (Receptores acoplados a proteína G)
- GRPR:** *Gastrin Releasing Peptide Receptor* (Peptídeo Liberador de Gastrina)
- HNPCC:** *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (Carcinoma Colônico Não Polipose Hereditária, **CCNPH**)
- MMR:** *DNA-Mismatch Repair* (Genes de reparo de DNA)
- MSI:** *Microsatellite instability* (Instabilidade de microssatélites)
- NGF:** *Neural Growth Factor* (Fator de Crescimento Neural)
- NMB:** *Neuromedin B* (Neuromedina B)
- NMBR:** *Neuromedin B receptor* (Receptor preferencial a Neuromedina B)
- NMC:** *Neuromedin C* (Neuromedina C)
- NT-3:** Neurotrofina 3
- NT-4/5:** Neurotrofina 4/5
- PAF:** Polipose Adenomatosa Familiar
- PGE2:** *Prostaglandin E2* (Prostaglandina E2)
- PI3K:** *Phosphoinositide 3-Kinases* (Fosfatidilinositol 3 quinase)
- PIP2:** *Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate* (Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato)

PKC: *Protein kinase C* (Proteína quinase C)

PLA2: *Phospholipase A2* (Fosfolipase A2)

PLC- β : *Phospholipase C- β* (Fosfolipase C- β)

ROCK: *Rho-associated Serine-threonine Protein Kinase* (Proteína quinase serina-treonina associada à proteína Rho)

RTKs: *Receptor Tyrosine Kinases* (Receptores Tirosina Quinase)

SL: Síndrome de Lynch

SPJ: Síndrome de Peutz-Jeghers

TS: Timidilato Sintase

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

RESUMO

BDNF/TrkB são descritos em diversas neoplasias onde iniciam sinais mitogênicos, facilitam o crescimento tumoral, previnem apoptose e regulam angiogênese e metástase. Outros fatores de crescimento também são importantes para tumorigênese, como GRP/GRPR e EGF/EGFR.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o papel de BDNF/TrkB em câncer colorretal avaliando possíveis interações com GRPR e EGFR. Verificamos que BDNF e seu receptor, TrkB, estão presentes em amostras de pacientes com câncer colorretal esporádico, e os níveis de BDNF encontram-se mais elevados no tecido neoplásico que no tecido adjacente ao tumor. O tratamento com RC-3095, um antagonista de GRPR, na linhagem celular de câncer colorretal humana, HT-29, causa diminuição nos níveis de NGF secretados pelas células e aumento de BDNF em relação ao controle não tratado. RC-3095 inibe a proliferação e viabilidade celular das linhagens HT-29 (EGFR positiva) e SW-620 (EGFR negativa), embora apenas em HT-29 ocorra um aumento significativo na expressão de mRNA de BDNF. Por isso, um anticorpo monoclonal anti-EGFR, cetuximabe, foi combinado a RC-3095, nas células HT-29, sendo capaz de prevenir tal aumento, sugerindo que este efeito seja mediado por EGFR. Os tratamentos com um inibidor de Trks, K252a (1000 nM) ou com cetuximabe (10 nM) também inibem a proliferação celular. Entretanto, a combinação de BDNF a cetuximabe previne este efeito, enquanto que a combinação de doses não efetivas de K252a (10 nM) à cetuximabe (1 nM) inibe a proliferação celular de HT-29. Além disso, cetuximabe também causa aumento na expressão de mRNA de TrkB e BDNF, após 600 minutos de tratamento. Nossos resultados sugerem que a inibição da proliferação celular *in vitro* ou do crescimento tumoral *in vivo* devem acontecer através do bloqueio combinado entre GRPR e TrkB em células de câncer colorretal EGFR positivas, e que BDNF também esteja envolvido em mecanismos de resistência a fármacos. Por isso, o bloqueio de BDNF / TrkB pode emergir como potencial alvo antitumoral.

Palavras-chave Câncer Colorretal • Células HT-29 • Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) • Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) • Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR) • RC-3095 • TrkB •

ABSTRACT

BDNF / TrkB are described in various cancers where they participate in tumor growth, apoptosis, angiogenesis and metastasis. Furthermore, other growth factors are also important to tumorigenesis as GRP/GRPR and EGF/EGFR. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of BDNF/TrkB in colorectal cancer evaluating the interactions with GRPR and EGFR. We found that BDNF and its receptor, TrkB, are present in samples from patients diagnosed with sporadic colorectal cancer, and BDNF levels were higher in tumor tissue compared to adjacent tumor tissue. Treatment with RC-3095, GRPR antagonist, in human colorectal cancer cell line, HT-29 caused a decrease in NGF levels secreted by cells, and generated increase of BDNF when compared to untreated control. RC-3095 inhibited the proliferation and cell viability in HT-29 (EGFR positive) and SW-620 (EGFR negative), but only HT-29 cells showed a significant increase in BDNF mRNA expression. Therefore, a monoclonal anti-EGFR antibody, cetuximab was combined with RC-3095 in HT-29 cells, and was able to prevent such an increase, suggesting that this effect is mediated by EGFR. The treatment with a Trk inhibitor, K252a (1000 nM) or cetuximab (10 nM), inhibited cell proliferation. However, the combination of BDNF with cetuximab prevented this effect, whereas the combination of ineffective doses of K252a (10 nM) with cetuximab (1 nM) still inhibited cell proliferation of HT-29. Furthermore, cetuximab also caused an increase in BDNF and TrkB mRNA expression, 600 minutes after treatment. In summary, our results suggest that inhibition of cell proliferation *in vitro* or tumor growth *in vivo* must occur between the combination of GRPR and TrkB in EGFR positive colorectal cancer cells, and that BDNF is also involved in drug resistance mechanisms. Therefore, blockage of BDNF / TrkB may emerge as potential antitumor target.

Key words: Brain-derived neurotrophic factor • Colorectal cancer • Epidermal growth factor receptor • Gastrin-releasing peptide receptor • HT-29 cells • RC-3095 • TrkB •

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

As neurotrofinas formam uma família de fatores de crescimento estruturalmente relacionados que possuem um papel crucial na sobrevivência, diferenciação, proliferação e manutenção das populações neuronais (KRÜTTGEN *et al.*, 2006). São fatores tróficos altamente conservados, essenciais à vida (BIBEL & BARDE, 2000).

O primeiro membro desta família foi um peptídeo chamado Fator de Crescimento Neural (NGF, da sigla em inglês para *Neural Growth Factor*), identificado no ano de 1940 pela bióloga italiana Rita Levi-Montalcini. Ela observou que a injeção de anticorpos contra NGF em camundongos recém-nascidos resultava em total degeneração dos gânglios simpáticos (BEAR *et al.*, 2002). Embora quase a metade dos neurônios simpáticos normalmente sofra apoptose, a aplicação de NGF exógeno impede que a maioria das células morra, enquanto que a neutralização de NGF mediante anticorpos produz morte generalizada dos neurônios simpáticos (RAFF *et al.*, 1993). O NGF produzido e liberado pelo tecido-alvo é absorvido pelos axônios simpáticos e transportado retrogradamente, onde age promovendo a sobrevivência neuronal. Na realidade, se o transporte axoplasmático é interrompido, os neurônios morrem apesar da liberação de NGF pelo tecido-alvo. Este trabalho pioneiro rendeu a Levi-Montalcini e Cohen o prêmio Nobel de 1986 (BEAR *et al.*, 2002).

Além de NGF, outros membros da família de neurotrofinas foram posteriormente identificados em mamíferos incluindo o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF da sigla em inglês de *Brain Derived Neurotrophic*

Factor) que foi identificado e isolado a partir de cérebros de porcos por Ivens Barde e colegas em 1980, e ainda, Neurotrofina-3 (NT-3) e Neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (KRÜTTGEN *et al.*, 2006).

Os efeitos das neurotrofinas são mediados por duas classes de receptores de membrana celular: os que pertencem a uma família de receptores de quinase relacionados à tropomiosina (do inglês, *Tropomyosin Related Kinase*; Trk), dentre eles TrkA, TrkB e TrkC e o receptor comum às neurotrofinas, p75^{NTR}, que pertence à família dos receptores do fator de necrose tumoral (BOTHWELL, 1991; CHAO, 1992; GLASS, 1993).

Enquanto p75^{NTR} se liga às neurotrofinas com baixa afinidade e especificidade, os receptores Trks se ligam às neurotrofinas com alta afinidade e especificidade (KRÜTTGEN *et al.*, 2006). TrkA se liga a NGF, TrkB se liga a BDNF e NT-4/5, e TrkC se liga a NT-3 (SEGAL & GREENBERG, 1996; COM *et al.*, 2007; ODEGAARD *et al.*, 2007), como demonstrado na Figura 1.

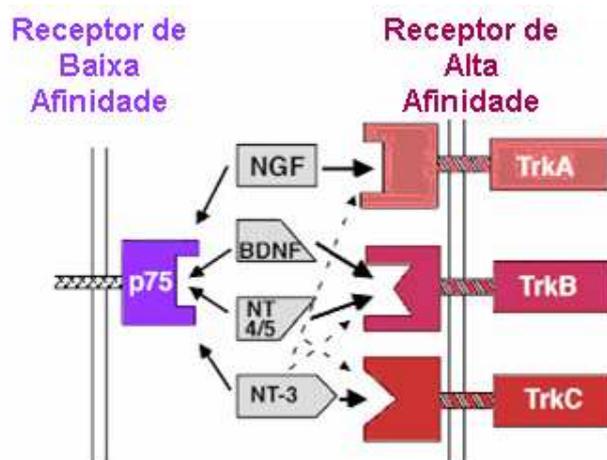


Figura 1. A família de neurotrofinas consiste de Fator de Crescimento Neural (NGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT3), e Neurotrofina 4/5 (NT-4/5). NGF se liga especificamente ao receptor TrkA, BDNF e NT4 se ligam especificamente à TrkB e NT-3 ativa TrkC, sendo que todas as neurotrofinas ligam-se à p75 com baixa afinidade (Adaptado de BOHLEN & HALBACH, 2010).

Receptores Trks foram identificados pela primeira vez por Dionisio Martin-Zanca e colegas (1986) como oncogenes presentes em um carcinoma de colo humano, capazes de mediar transformações de fibroblastos (MARTIN-ZANCA *et al.*, 1986). A partir de então, muitos grupos pesquisam o papel dos Trks em câncer. Entretanto, ao longo dos anos, neurotrofinas e Trks tem sido melhores caracterizados principalmente como moléculas envolvidas no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), na sobrevivência neuronal e na plasticidade sináptica, enquanto o seu papel em câncer manteve-se relativamente menos explorado.

Neurotrofinas são fatores de crescimento multifuncionais e exercem numerosos efeitos também em células não-neuronais como, por exemplo, na diferenciação de linfócitos B (OTTEN *et al.*, 1989), liberação de histamina (NASSENSTEIN *et al.*, 2005), formação de vasos sanguíneos (WAGNER *et al.*, 2005), desenvolvimento de folículo piloso (STUCKY *et al.*, 1998), inibição e diferenciação de músculo esquelético (MOUSAVI & JASMIN, 2006), migração de células de Schwann (ANTON *et al.*, 1994) e crescimento de folículos nos ovários (PAREDES *et al.*, 2004).

A ligação de neurotrofinas a Trks forma um homodímero e resulta na fosforilação de vários resíduos de tirosina, fenômeno necessário para sua sinalização intracelular (GUITON *et al.*, 1994; HUANG E REICHARDT, 2001; LESSMAN *et al.*, 2003). Em células neuronais, o receptor p75^{NTR} regula a transcrição de genes envolvidos com sobrevivência ou apoptose, bem como a ativação de Rho, que controla a motilidade celular. Nestas mesmas células, os receptores Trks ativam a sinalização de Ras e MAPK promovendo diferenciação e

crescimento celular e a ativação de PI3K que promove sobrevivência das células. Já a sinalização por PLC resulta em aumento de cálcio intracelular que por sua vez ativa PKC promovendo proliferação celular (REICHARDT, 2006; Ver figuras 2 e 3).

Alguns estudos demonstraram que neurotrofinas são importantes na progressão de câncer, pois iniciam sinais mitogênicos que facilitam o crescimento tumoral (SINGER *et al.*, 1999), prevenindo apoptose (ASTOLFI *et al.*, 2001), regulando angiogênese (EGGERT *et al.*, 2000) e auxiliando na propagação das células levando à metástase (MENTER *et al.*, 1994).

As neurotrofinas podem aumentar ou suprimir o crescimento tumoral dependendo do tipo de tumor a que se relacionam (KRÜTTGEN *et al.*, 2006). Esta relação com o seguimento do tumor pode estar vinculada à ativação de cascatas de sinalização celular desencadeada pelos receptores Trks, dentre as quais MAPK / ERK e PI3K (figura 2) que estão grandemente envolvidas em processos oncogênicos (ATWAL *et al.*, 2000; BAMABÉ-HEIDER & MILLER, 2003; ABUJAMRA *et al.*, 2006). Portanto, tanto um aumento nos níveis de neurotrofinas ou Trk como uma sinalização desregulada via Trk pode levar à tumorigênese.

O papel de neurotrofinas em tumores começou a ser estudado, principalmente, em neoplasias neurais como em astrocitomas, glioblastomas (WADHWA *et al.*, 2003), paragangliomas (PELLO *et al.*, 1999), neuroblastomas (DESMET & PEEPER, 2006) e meduloblastomas (NAKAGAWARA, 2001).

De fato, tumores do sistema nervoso expressam níveis elevados de neurotrofinas e/ou seus receptores, níveis estes que estimulam a proliferação e migração celular, contribuindo com metástases e com mecanismos de resistência

à quimioterapia (FENG *et al.*, 2001; MIDDLEMAS *et al.*, 1999; WADHWA *et al.*, 2003; WASHIYAMA *et al.*, 1996).

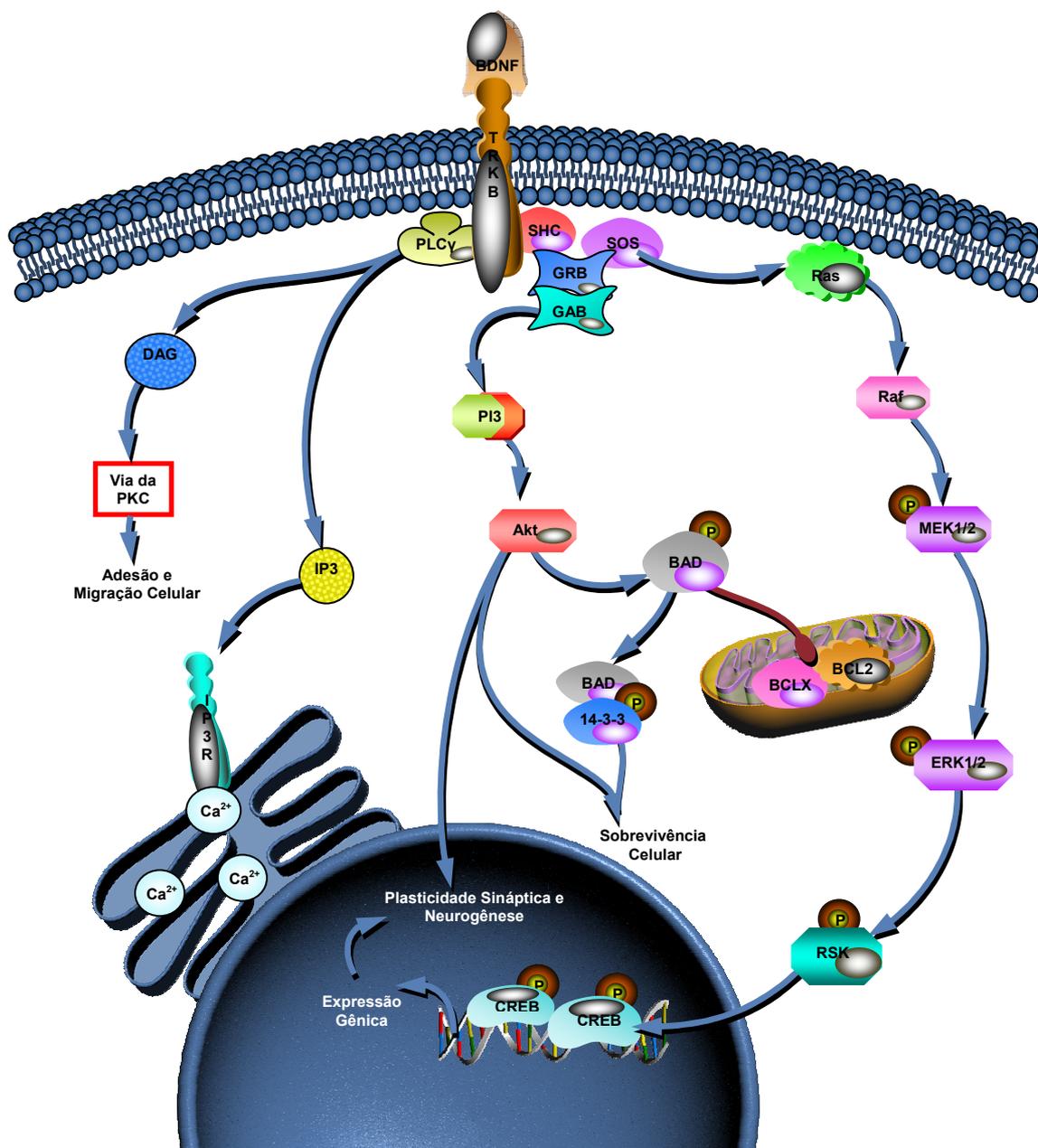


Figura 2. Via de sinalização de BDNF (Adaptado de QIAGEN, 2012).

Em neuroblastomas, níveis elevados de TrkA e TrkC estão associados com melhor prognóstico, enquanto que BDNF e TrkB são expressos em tumores mais

agressivos (NAKAGAWARA, 2001; DESMET & PEEPER, 2006). Além disso, o aumento da sinalização BDNF / TrkB em células de neuroblastoma mantém a expressão autócrina e parácrina para promoção do crescimento e invasão tumoral e metástase, e a ativação de TrkB por BDNF promove resistência à quimioterapia em células de neuroblastoma através de um mecanismo mediado por PI3K e Akt (KRÜTTGEN *et al.*, 2006; THIELE *et al.*, 2009).

Um estudo recente mostrou que, em células de neuroblastoma com expressão elevada de TrkB, o tratamento com BDNF protegeu a morte celular induzida *in vitro* pelo tratamento com etoposide, e neuroblastomas com expressão elevada de TrkB foram menos sensíveis a este tratamento *in vivo* do que os tumores com baixa expressão de TrkB (LI *et al.*, 2011).

Em meduloblastoma, um tumor de origem neural bastante comum na infância, a expressão de TrkC correlaciona-se com uma melhor resposta à terapia, enquanto TrkB provavelmente promove a sobrevivência das células (NAKAGAWARA, 2001). No entanto, recentemente foi demonstrado que, pelo menos em algumas linhagens celulares de meduloblastoma humanas, BDNF humano recombinante diminui a viabilidade das células, sugerindo que a estimulação da sinalização de BDNF / TrkB possa também inibir o crescimento de meduloblastoma (SCHMIDT *et al.*, 2010).

Recentes evidências do papel de neurotrofinas têm sido elucidadas também em tumores não neurogênicos, tais como melanoma (MARCHETTI *et al.*, 1993), câncer de ovário (DAVIDSON *et al.*, 2003), pâncreas (MIKNYOCZKI *et al.*, 1999), próstata (DIONNE *et al.*, 1998; GUATE *et al.*, 1999), pulmão (RICCI *et al.*, 2001), tumor de tireóide (McGREGOR *et al.*, 1999), tumor de Wilms (EGGERT *et*

al., 2000), tumor de bexiga (KHWAJA & DJAKIEW, 2003), câncer de mama (COM *et al.*, 2007), tumores hepáticos (YANG *et al.*, 2005) e câncer colorretal (BARDELLI *et al.*; 2003). Nestas neoplasias observa-se uma superexpressão de Trks (HANAHAN *et al.*, 2000), e a ativação destes receptores parece agir em sinergismo com outras vias de sinalização (QIU *et al.*, 2006), levando ao crescimento tumoral, metástases e resistência à terapia (THIELE *et al.*, 2009; DESMET & PEEPER, 2006).

Por exemplo, em adenocarcinomas de pulmão a expressão de TrkB em células A549 e o tratamento com BDNF estimula a via Akt, enquanto que um inibidor de Trks, K252a, inibe o crescimento celular e induz apoptose (PEREZ-PINERA *et al.*, 2007). Além disso, níveis séricos de BDNF correlacionam-se positivamente com a agressividade tumoral (YANG *et al.*, 2006).

BDNF e TrkB são superexpressos em amostras humanas de câncer de bexiga (LAI *et al.*, 2010) e a ativação de BDNF aumenta a proliferação e sobrevivência celular (HUANG *et al.*, 2010), enquanto que um anticorpo anti-TrkB induz citotoxicidade e suprime migração e invasão em células de carcinoma (HUANG *et al.*, 2010a).

Estudos recentes sugerem ainda um papel da sinalização BDNF / TrkB em câncer de mama, onde a expressão de BDNF e TrkB foi detectada em linhagens celulares e em espécimes de tumor. O BDNF induziu resistência a apoptose, enquanto que injeções de um anticorpo anti-BDNF reduziu o crescimento de tumores de mama em modelo animal (VANHECKE *et al.*, 2011).

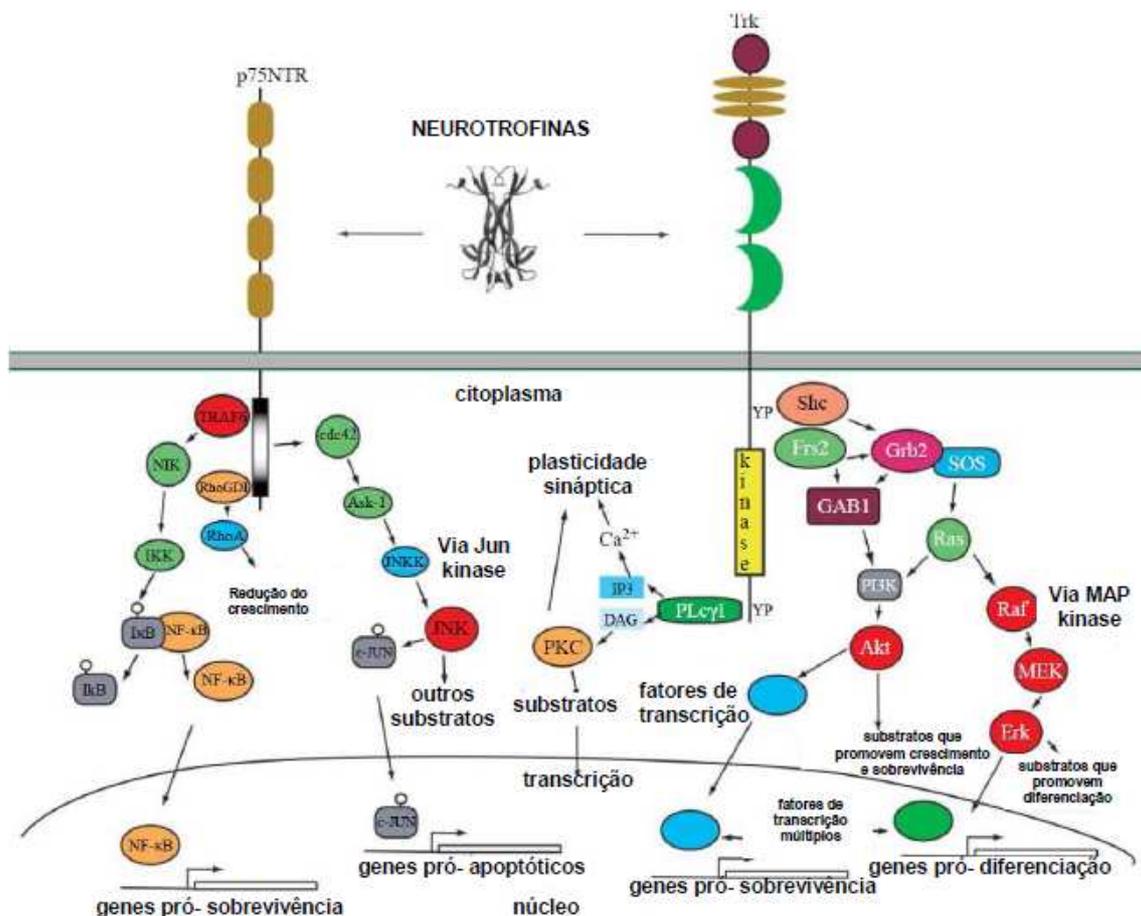


Figura 3. Sinalização de neurotrofinas (Adaptado de REICHARDT, 2006).

Além disso, amostras com câncer de mama expressaram mais BDNF que o tecido normal, e altos níveis de transcritos de BDNF foram associados com parâmetros patológicos desfavoráveis, incluindo pior prognóstico e morte (PATANI *et al.*, 2011). E, além disso, a superexpressão de NGF / TrkA em câncer de mama atua como um fator de crescimento e sobrevivência celular (COM *et al.*, 2007; DESCAMPS *et al.*, 1998; KRÜTTGEN *et al.*, 2006).

A expressão de mRNA de BDNF e TrkB também foi maior em linhagens de câncer cervical e carcinoma de células escamosas do colo uterino que em tecidos normais e foi relacionada aos parâmetros clínico-patológicos (MOON *et al.*, 2011).

A expressão do receptor p75^{NTR} diminuiu o crescimento e metástase de células de câncer de próstata *in vitro* (KRYGIER & DJAKIEW, 2002), e a expressão desses receptores reduziu NGF e induziu apoptose (PFLUG *et al.*, 1998). Além disso, em câncer de próstata a expressão de p75^{NTR} é perdida durante a progressão do tumor, indicando que esse receptor possa agir como um supressor tumoral, enquanto que receptores Trks parecem estar envolvidos na progressão desta neoplasia (ODEGAARD *et al.*, 2007).

A expressão de p75^{NTR} em carcinomas de ovário de estágio I é limitado, sugerindo que esse receptor tenha um papel menor na tumorigênese de ovário e que sua presença não seja necessária para ativação de TrkA (ODEGAARD *et al.* 2007).

Todavia, tumores sólidos não são os únicos que expressam neurotrofinas e seus receptores. Células de mieloma múltiplo expressam TrkB e BDNF de forma aberrante, e BDNF estimula significativamente a migração destas células (HU *et al.*, 2006). Em leucemia alterações na sinalização de Trks parece ser um bom indicador de sensibilidade tumoral (RHEIN, *et al.*, 2010).

Por tudo isso, o bloqueio da sinalização mediada por neurotrofinas pode constituir uma ferramenta terapêutica para o tratamento de tumores que dependem de neurotrofinas para a sobrevivência ou progressão (PEREZ-PINERA *et al.*, 2007).

Em carcinoma colorretal humano foram descritas duas mutações pontuais não-sinônimas para o domínio quinase do gene *TrkB* (TRKB^{T6951} e TRKB^{D751N}) (BARDELLI *et al.*, 2003), que demonstraram ter menor atividade após a estimulação por BDNF em relação ao tipo selvagem, tanto em células epiteliais de

ratos quanto em duas linhagens de câncer colorretal humanas (GEIGER *et al.*, 2011). Entretanto, o papel de TrkB nesses tumores ainda é pouco conhecido.

Além disso, até o presente momento, as neurotrofinas e suas vias de sinalização envolvidas no mecanismo de proliferação tumoral não foram correlacionadas a fatores de crescimento tais como GRP / GRPR e EGF / EGFR em câncer colorretal. A identificação da superexpressão de neurotrofinas e/ou seus receptores nestes carcinomas pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos, bem como a um fator prognóstico associado a essas malignidades.

1.2 Câncer Colorretal

Carcinoma colorretal (CCR) é assim denominado porque se deriva das células epiteliais que recobrem o colo e o reto (ALBERTS *et al.*, 1997; ANG *et al.*, 2011 – ver figura 4). É o terceiro tumor maligno mais freqüente no mundo combinando ambos os sexos, e o segundo mais comum em países desenvolvidos (INCA, 2012). Além disso, é a principal causa de morte relacionada a cânceres no mundo quando neoplasias relacionadas ao fumo são excluídas (FRATTINI *et al.*, 2004; SCHALLY *et al.*, 2004).

Os tumores colorretais iniciam-se a partir de pólipos (SCHULTZ, 2005). Um pólipo é uma massa tumoral que se projeta para a luz do intestino e geralmente refere-se a lesões oriundas do epitélio da mucosa (COTRAN *et al.*, 2000). Essa massa protuberante do tecido revela um tumor benigno pequeno também chamado de pólipo adenomatoso ou adenoma (ALBERTS *et al.*, 1997).

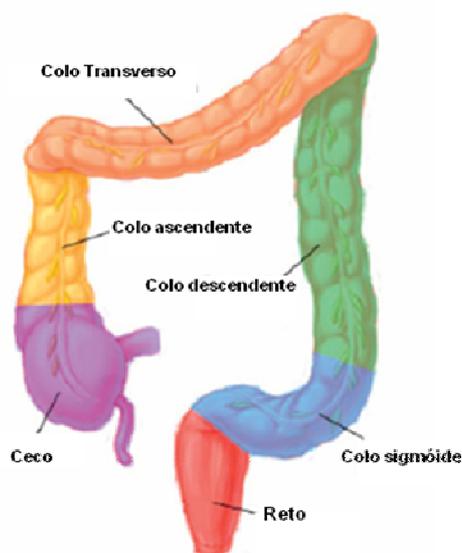


Figura 4. Anatomia do intestino grosso (Adaptado de ANG *et al.*, 2011).

Todas as lesões adenomatosas originam-se de displasia proliferativa epitelial, variando de leve a tão intensa constituindo um carcinoma *in situ*, e, muitos indícios mostram que estas lesões são precursoras dos adenocarcinomas colorretais invasivos (COTRAN *et al.*, 2000). Durante o estágio pré-neoplásico há mudanças hiperplásicas ou displásicas. Com o passar do tempo, há a formação de um adenoma que pode levar ao aparecimento de um carcinoma com metástases (SCHULTZ, 2005), como exemplificado na figura 5. Por isso, a remoção dos pólipos está associada à redução da incidência de câncer colorretal (DAVIES *et al.*, 2005; RAMSOEKH *et al.*, 2007).

Em pólipos maiores de 1 cm de diâmetro aumenta o risco de desenvolvimento de câncer, pois as células anormais indiferenciadas tendem a formar estruturas organizadas (ROSA *et al.*, 2012).

A incidência deste tumor é entre 60 e 79 anos de idade, e menos de 20% dos casos ocorrem antes dos 50 anos (COTRAN *et al.*, 2000) sendo que

geralmente nesta população há história familiar prévia. Nestes casos, a susceptibilidade está relacionada a uma combinação de fatores genéticos e ambientais, embora em uma pequena fração dos casos, os fatores genéticos tenham um papel dominante (LYNCH & CHAPELLE, 2003).

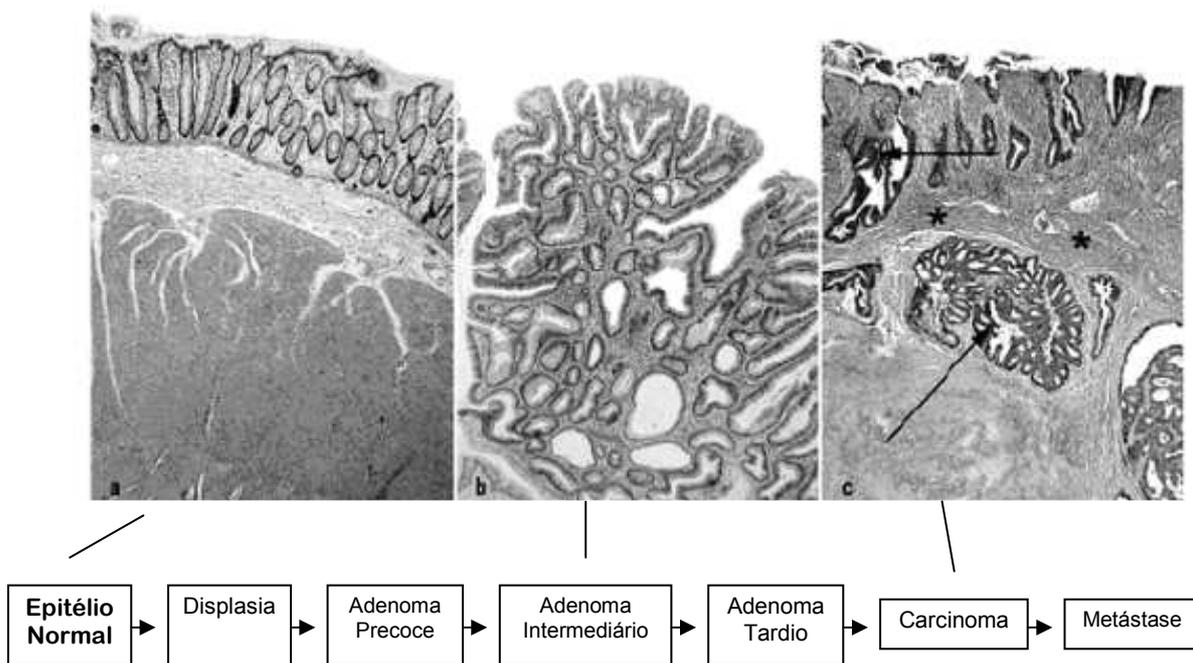


Figura 5. Estágios de desenvolvimento de câncer colorretal. As histologias mostram a mucosa normal (esquerda), um pólipo adenomatoso com displasia moderada (centro), e um adenocarcinoma invasivo com glândulas tumorais na submucosa (direita) (Adaptado de SCHULTZ, 2005).

1.2.1 Síndromes Hereditárias

As síndromes hereditárias aumentam o risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, dentre elas a Síndrome de Polipose Familiar (PAF), Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ), Pólipos Juvenis, Doença de Cowden e Carcinoma

Colônico Não Polipose Hereditária (CCNPH) ou também conhecida como Síndrome de Lynch (SL), como mostrado na tabela 1 (SCHULTZ, 2005; COTRAN *et al.*, 2000).

A Síndrome de Lynch é a mais prevalente em tumores colorretais, acometendo de 3% a 7% de todos os casos (ALTONEN *et al.*, 1998; HAMPEL *et al.*, 2008). Essa síndrome é caracterizada pelo desenvolvimento de câncer colorretal, câncer de endométrio, e, menos frequentemente, câncer do intestino delgado, estômago, trato urinário, ovários e cérebro, principalmente em idade precoce (VASEN, 2005).

A Síndrome de Lynch é uma doença autossômica dominante, de transmissão vertical e sem preferência por sexo, com penetrância ao redor de 80% (MENKO, 1998). Esta síndrome é causada por instabilidade de microsatélites (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*) (VASEN, 2005) e por mutações germinativas em genes de reparo de DNA (*DNA-mismatch repair*; MMR), como por exemplo MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 e PMS1 (VASEN *et al.*, 2001; QUEHENBERGER *et al.*, 2005; de JONG *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que a evolução de adenoma para adenocarcinoma em Síndrome de Lynch ocorre mais rapidamente em relação às lesões esporádicas, sendo que nas esporádicas a incidência de MSI acontece em menos de 20% dos casos (KUNKEL, 1993; JARVINEN *et al.*, 1995; MENKO, 1998).

A análise de mutações de DNA é realizada por técnicas que ainda possuem alto custo em diversos países, tais como sequenciamento de nucleotídeos. Por isso, utiliza-se uma ferramenta de rastreamento primário, que analisa os critérios clínicos e patológicos dos pacientes, tais como a presença de

neoplasias malignas associadas à Síndrome de Lynch, número de neoplasias e idade ao diagnóstico, antecedentes familiares, bem como características tumorais histológicas, como presença de anel de sinete ou tumor mucinoso (RAMSOEKH *et al.*, 2007; VAN LIER *et al.*, 2010). Estes critérios são denominados Amsterdam e Bethesda.

Síndrome	Sintomas Colônicos	Outros Tumores	Genes Afetados
Polipose Familiar	Pólipos adenomatosos múltiplos, carcinoma	Pólipos duodenais e estomacais, câncer e hiperplasia da retina	<i>APC</i> (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
Gardner	Pólipos adenomatosos múltiplos, carcinoma	Pólipos duodenais e estomacais, câncer e hiperplasia da retina, tumor desmóide e osteoma	<i>APC</i> (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
Polipose Familiar Atenuada	Alguns pólipos, aumento do risco de carcinomas		<i>APC</i> (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
Carcinoma Colônico Não-Polipose Hereditária (CCNPH) ou SL	Carcinoma, geralmente multifocal, com alguns pólipos	Câncer de endométrio, ovário, estômago, fígado, trato urinário superior, cérebro	<i>MSH2</i> , <i>MLH1</i> , <i>PMS2</i> , outros (2p21)
Doença de Cowden	Frequentes hamartomas, aumento do risco de carcinoma	Hamartomas em muitos órgãos, câncer de mama, tireóide e outros	<i>PTEN</i> (10q23.31)
Polipose Juvenil	Hamartomas ou pólipos, aumento do risco de carcinoma	Hamartomas, pólipos e aumento do risco de câncer de estômago	<i>SMAD4</i> (18q21.2)
Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)	Pólipos hamartomatosos, carcinoma	Pólipos hamartomatosos e carcinoma em todas as partes do trato gastrointestinal	<i>LKB1 (STK11)</i> (<i>serine/threonine kinase</i> – 19p13.3)

Tabela 1. Síndromes hereditárias relacionadas à pré-disposição de câncer colorretal (SCHULTZ, 2005). Para obter maiores detalhes destas síndromes, acessar OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

Os critérios Amsterdam foram propostos em 1991 para uniformizar a caracterização clínica de estudos multicêntricos de Síndrome de Lynch (ver tabela 2), onde as famílias devem, sempre, cumprir todos os itens (VAN LIER *et al.*, 2010).

Entretanto, os critérios Amsterdam poderiam estar excluindo pacientes com tumores extracolônicos, ou pacientes com indício de CCR hereditário, principalmente em idade jovem. Por isso, em junho de 1999 foram publicados os critérios Amsterdam II, que incluíram tumores extracolônicos de pelve renal e ureter, intestino delgado e endométrio, como descritos na tabela 3 (VAN LIER *et al.*, 2010).

Já os critérios Bethesda foram formulados em 1996 e atualizados em 2004 (RODRIGUEZ-BIGAS *et al.*, 1997; UMAR *et al.*, 2004). Esses critérios visam identificar os tumores que devem ser testados para MSI, e análise subsequente de mutações em MMR (ver tabela 4). Estes critérios são usados quando não há história familiar típica, mas há suspeita de hereditariedade.

Crítérios Amsterdam I
1. Deve haver pelo menos três parentes com CCR;
2. Um deles deve ser parente em primeiro grau dos outros dois;
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas;
4. Pelo menos um parente deve ser diagnosticado antes da idade de 50 anos;
5. A polipose adenomatosa familiar (PAF) deve ser excluída;
6. Tumores devem ser verificados através do exame patológico.

Tabela 2. Critério Amsterdam I. Adaptado de VAN LIER *et al.*, 2010.

Critérios Amsterdam II

1. Deve haver pelo menos três parentes com câncer associado à Síndrome de Lynch*;
2. Um deve ser um parente em primeiro grau dos outros dois;
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas;
4. Pelo menos um deve ser diagnosticado antes da idade de 50 anos;
5. A polipose adenomatosa familiar (PAF) deve ser excluída;
6. Tumores devem ser verificados através do exame patológico.

* CCR, câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pelve renal.

Tabela 3. Critério Amsterdam II. Adaptado de VAN LIER *et al.*, 2010.

Estudos recentes demonstram que a detecção de portadores de CCNPH utilizando os critérios Amsterdam foi de aproximadamente 40%, enquanto que a sensibilidade dos critérios Bethesda foi de aproximadamente 90% (SALOVAARA *et al.*, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2001; HAMPEL *et al.*, 2005).

Critérios Bethesda

1. Indivíduos com câncer em famílias que atendem aos critérios Amsterdam;
2. Indivíduos com 2 cânceres relacionados à SL (sincrônico, metacrônico ou extracolônicos);
3. Indivíduos com CCR e um parente de 1º grau com CCR e/ou câncer relacionado à SL extracolônico e/ou adenoma colorretal; em idade inferior a 45 anos, e/ou adenoma em idade inferior a 40 anos;
4. Indivíduos com CCR ou endometrial diagnosticado em idade inferior a 45 anos.
5. Indivíduos com CCR no lado direito com padrão indiferenciado ao exame histopatológico em idade inferior a 45 anos[‡].
6. Indivíduos com CCR com células em anéis de sinete $\geq 50\%$ e idade inferior aos 45 anos.
7. Indivíduos com adenomas em idade inferior a 40 anos.

* Câncer de ovário, endométrio, gástrico, hepato-biliar, intestino delgado ou carcinoma de células transicionais da pelve renal ou ureter. ‡ Sólido / cribriforme definido como pouco diferenciado ou indiferenciado, carcinoma irregulares, com células eosinofílicas contendo pequenos espaços tipo glândulas.

Tabela 4. Critério Bethesda. Adaptado de VAN LIER *et al.*, 2010.

Outros fatores de risco relacionados a câncer colorretal são importantes para o desenvolvimento de neoplasias esporádicas, e baseiam-se nos hábitos alimentares e inatividade física. Neste sentido, ressalta-se a obesidade, aumento dos níveis de insulina, o baixo consumo de fibras vegetais e ingestão de carne vermelha (COTRAN *et al.*, 2000; SCHALLY *et al.*, 2004).

No primeiro estágio da doença é possível atingir a cura completa por destruição ou remoção cirúrgica, e por isso pode-se considerar que este tipo de tumor possui um bom prognóstico (SCHULTZ *et al.*, 2005). Porém com o diagnóstico tardio e sem o tratamento adequado, o foco anormal pode desenvolver-se dando origem a um carcinoma maligno, cujas células rompem o epitélio atravessando a lâmina basal, expandindo através da camada muscular que cerca o intestino, e finalmente formando metástases para os linfonodos, fígado, pulmão e outros tecidos (ALBERTS *et al.*, 1997). Por isso o rastreamento deste tumor é de suma importância.

1.2.2 Rastreamento, Acompanhamento e Avaliação de Resposta

Os testes mais utilizados para o rastreamento de câncer colorretal são sangue oculto nas fezes e colonoscopia endoscópica (DAVIES *et al.*, 2005).

O sangue oculto nas fezes é um teste barato e não invasivo, entretanto serve apenas como uma ferramenta inicial de triagem, embora alguns estudos demonstrem que há diminuição da mortalidade em 25% dos casos quando há rastreamento bienal (HEWITSON *et al.*, 2007).

Já a colonoscopia endoscópica tem sensibilidade relatada de 97% e especificidade de 98% (DAVIES *et al.*, 2005), sendo o padrão ouro para detecção

precoce de câncer colorretal (ZOLG & LANGEN, 2004). No entanto, é uma técnica mais cara, invasiva, que exige pessoal altamente treinado e requer preparo intestinal desconfortável (DAVIES *et al.*, 2005; HUNDT *et al.*, 2007; ANG *et al.*, 2010).

Outros exames usuais para rastreamento, acompanhamento e avaliação de resposta ao tratamento são sigmoidoscopia flexível, colonoscopia virtual, tomografia computadorizada, e alguns marcadores moleculares, principalmente mutações dos códons 12 e 13 do gene KRAS, mutação V600E de BRAF e diversas mutações em p53 (RAMSOEKH *et al.*, 2007). Além disso, para identificação de MSI são utilizadas técnicas de imunohistoquímica para hMSH2 e hMLH1, PCR e sequenciamento de DNA (SCHALLY *et al.*, 2004, ANG *et al.*, 2011).

1.2.3 Estadiamento

O sistema de estadiamento TNM é o mais habitual em câncer colorretal, e baseia-se na extensão do tumor (**T**), na extensão da disseminação para os nódulos linfáticos (**N**) e na presença de metástase (**M**), e ainda, um número é adicionado a cada letra para indicar o tamanho ou a extensão do tumor e da disseminação (tabela 5; NCCN Guidelines, 2012).

1.2.4 Tratamento: quimioterápicos e anticorpos monoclonais

O tratamento normalmente consiste de uma combinação de cirurgia, quimioterapia e / ou radioterapia. O câncer colorretal localizado e sem metástase geralmente pode ser curado com cirurgia, embora, na maioria dos casos a

detecção ocorra em um estágio tardio, e por isso, quimioterapia sozinha ou combinada à radioterapia pode ser aplicada para atingir células tumorais remanescentes (SCHALLY *et al.*, 2004; TAKHAR *et al.*, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2005).

Tumor Primário (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (câncer inicial que não se espalhou para outros tecidos)
T1, T2, T3, T4	O tamanho ou extensão do tumor primário
Linfonodos Regionais (N)	
NX	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de gânglios linfáticos regionais
N1, N2, N3	Envolvimento de gânglios linfáticos regionais (quantidade e/ou extensão)
Metástase à Distância (M)	
MX	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância (câncer não se disseminou)
M1	Metástase à distância (câncer está em outra região do corpo)

Tabela 5. Sistema TMN – Adaptado de NCCN Guidelines (2012).

A quimioterapia convencional para o tratamento de câncer colorretal consiste de fármacos tais como Fluoracil (5-FU, usado a mais de 50 anos) (LABIANCA *et al.*, 1997), Capecitabina, Irinotecano, Oxaliplatina, além de anticorpos monoclonais, como bevacizumabe, cetuximabe e panitumumabe (BOYIADZIS *et al.*, 2007; NCCN Guidelines 2012), utilizados sozinhos ou em esquemas de combinação específicos.

A escolha da terapia baseia-se nos objetivos da terapêutica, o tipo e tempo de tratamento prévio, e diferentes perfis de toxicidade dos fármacos constituintes (NCCN Guidelines, 2012).

O 5-FU (5-deoxiflourouridina) é uma droga antineoplásica amplamente utilizada no tratamento do câncer colorretal. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da timidilato sintase (TS). Esta enzima é essencial para a síntese de DNA e, por conseguinte, também limitante para o crescimento celular (IQBAL & LENZ, 2001; JOHNSON & DIASIO, 2001).

A Capecitabina (N4-pentiloxicarbonilo-5-desoxi-5-fluorocytidine) é um pró-fármaco oral de 5-FU que é absorvido através da mucosa gastrointestinal como uma molécula intacta. Sequencialmente é ativado por uma cascata enzimática (carboxilesterase citidina desaminase e fosforilase de nucleosídeo de pirimidina, resultando na formação de 5-desoxi-5-fluorocytidine; 5-DFCR, 5-desoxi-5-fluorouridina; 5-DFUR) permitindo a liberação intratumoral final de 5-FU (HOFF *et al.*, 2001).

Já o Irinotecano é um derivado de camptotecina que inibe topoisomerase I e tem propriedades radiosensíveis (WADLOW & RYAN, 2010). Muitos ensaios clínicos randomizados têm demonstrado a sua atividade em câncer colorretal metastático como um agente único ou em combinação com 5-FU e leucovorina (DOUILLARD *et al.*, 2000; SALTZ *et al.*, 2000).

A Oxaliplatina é uma platina de 3^o geração caracterizada por possuir um ligante carreador de diaminociclohexano (DACH) (BLEIBERG & DE GRAMONT, 1998), gerando a formação de adutos de DNA que são letais às células (WEICKHARDT, *et al.*, 2011). Porém, estes danos podem ser removidos por vias de reparo de DNA, tais como excisão de nucleotídeos, excisão de bases ou através de genes de reparo de DNA (KWEEKEL *et al.*, 2009). A alta taxa de resposta (28-65%) em combinação com 5-FU e leucovorina tem sido relatada em

pacientes com câncer colorretal avançado tratados em primeira e segunda linha, indicando algum efeito sinérgico com fluoropirimidinas (RAYMOND *et al.*, 1998).

Além disso, mecanismos de angiogênese também são necessários para o crescimento e progressão tumoral, e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um regulador crucial deste processo. Portanto, um anticorpo anti-VEGF, Bevacizumabe, foi desenvolvido e já está sendo usado na clínica médica, demonstrando atividade promissora em pacientes com câncer colorretal metastático (WADLOW & RYAN, 2010).

Cetuximabe é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 (recombinante camundongo-humano) que se liga especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O EGFR é uma glicoproteína transmembrana que pertence à subfamília do tipo I de Receptores Tirosina Quinase (La TANGUE & KERR, 2011). É composto de homodímeros ou heterodímeros, tais como HER1 (ou EGFR ou ErbB1), HER2 (ou Erbb) HER3 e HER4. Estes receptores são compostos por um domínio extracelular, um segmento transmembrana e um domínio tirosina quinase intracelular (DI FIORI *et al.*, 2010).

Assim como cetuximabe, panitumumabe também é um anticorpo monoclonal anti-EGFR, no entanto, foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-EGFR totalmente humanizado (COHENURAM & SAIF, 2007). Estes agentes ligam-se ao domínio extracelular do EGFR (ErbB1) impedindo a dimerização do receptor. Esta ligação gera internalização do complexo receptor-anticorpo e impede a autofosforilação de EGFR-tirosina e conseqüentemente, a inativação da cascata de proteínas. Sendo assim, tais anticorpos monoclonais agem sobre a inibição da

proliferação celular e indução de apoptose (FREEMAN *et al.*, 2004), como mostrado na figura 6.

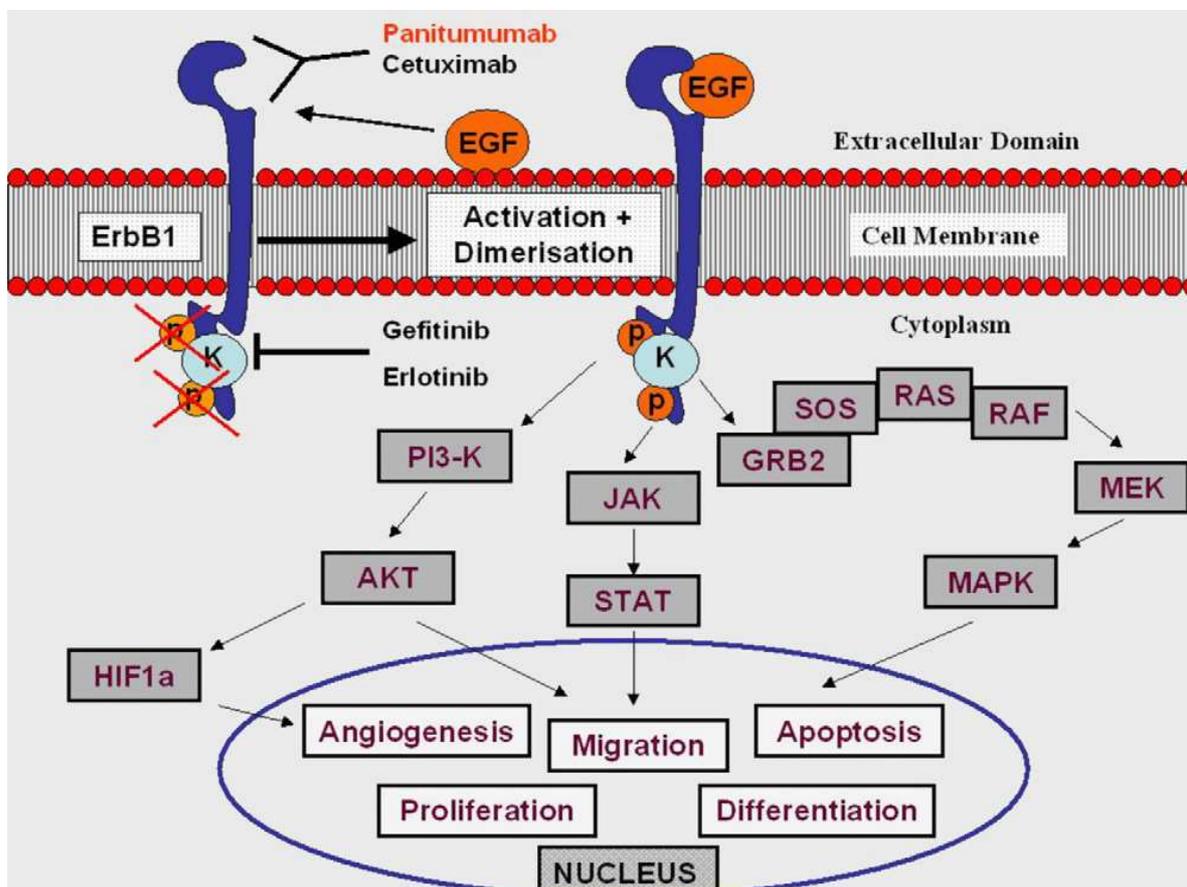


Figura 6. EGFR (ErbB1) e suas vias de sinalização (FREEMAN *et al.*, 2004).

Em câncer colorretal, cetuximabe prolongou o período de progressão de doença em pacientes com tumores KRAS de tipo selvagem. Neste estudo, um grupo de pacientes que não recebeu quimioterapia anteriormente, fez o tratamento com cetuximabe combinado à quimioterapia. Essa associação incluiu Irinotecano (o tempo médio até a progressão da doença foi de 9,9 meses, em comparação a 8,7 meses nos pacientes que não receberam o cetuximabe) e Oxaliplatina (o tempo médio até a progressão da doença foi de 7,7 meses, em

comparação com 7,2 meses nos pacientes que não receberam o anticorpo monoclonal) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2011).

Diferentes estudos sugerem que mutações do gene KRAS estão presentes em 30 a 50% dos adenocarcinomas colorretais. O estado de KRAS tem provado ser um importante indicador de eficácia a anticorpos monoclonais anti-EGFR, uma vez que pacientes com KRAS selvagem respondem melhor a este tipo de tratamento (FREEMAN *et al.*, 2008).

Estudos recentes buscam correlacionar mutações em alelos de KRAS a outros efetores intracelulares, como BRAF e PIK3CA, avaliando a resposta clínica com o tratamento com fármacos anti-EGFR. Neste sentido, um estudo retrospectivo de 113 pacientes que receberam cetuximabe ou panitumumabe analisou KRAS e mutações BRAF em exons 2 e 15 e foi verificado que a presença de mutações BRAF foi inversamente associada com a resposta à terapia (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008).

Entretanto, além dessas mutações, os principais mecanismos envolvidos na ativação e / ou resistência à terapia com cetuximabe e Panitumumabe parecem emergir da ativação constitutiva de outras sinalizações celulares vinculadas a EGFR.

De fato, além do EGF, outros ligantes podem ativar a sinalização de EGFR, como por exemplo, TGF- α , VGF, ou β -celulinas (DI FIORI, *et al.*, 2010).

Os receptores acoplados a proteína G (G protein-coupled receptors, GPCRs) representam a maior família de receptores de membrana e suas funções estão relacionadas a diversas atividades celulares, tais como regulação do metabolismo, secreção, contração, pressão sanguínea, e transmissão da dor. Em

contraste, receptores tirosina quinase (RTKs), outra família importante de receptores de membrana, dentre elas a família de EGFR, foram relacionados à proliferação celular, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular. Originalmente acreditava-se que essas famílias de receptores agiam de maneira individual, entretanto, nas duas últimas décadas, tornou-se cada vez mais claro que GPCRs também estão envolvidos em processos de proliferação celular e estão envolvidos na progressão e metástase de tumores, podendo haver transativação entre esses receptores (LIEBMANN, 2011; ver figura 7).

Vários estudos indicam um possível envolvimento de fatores de crescimento no desenvolvimento de câncer colorretal, dentre eles hormônios gastrointestinais, especialmente gastrina e bombesina / peptídeo liberador de gastrina (SCHALLY *et al.*, 2001; 2003).

ZHANG e colaboradores (2007) demonstraram que a combinação de um antagonista de GRPR ao inibidor da tirosina quinase de EGFR, Erlotinib, potencializou os efeitos antitumorais de ambos em câncer de cabeça e pescoço. Além disso, em células de câncer de pulmão, agonistas de GRPR aumentaram a fosforilação de EGFR (MOODY *et al.*, 2010; 2011).

Além disso, recentemente foi demonstrado que a combinação de antagonistas anti-bombesina / GRP a agentes citotóxicos tais como Irinotecano e 5-FU, produziram um efeito sinérgico em câncer colorretal (RICK *et al.*, 2012), sugerindo que antagonistas sintéticos para o receptor do peptídeo liberador de gastrina (Gastrin Releasing Peptide Receptor, GRPR) possam ter um valor clínico no tratamento de tumores colorretais (RADULOVIC *et al.*, 1991, CASANUEVA *et al.*, 1996; SZEPEHAZI *et al.*, 1997; CHATZISTAMOU *et al.*, 2001;

SCHWARTSMANN 2004; SCHWARTSMANN *et al.*, 2005; CORNELIO *et al.*, 2007; RICK *et al.*, 2012).

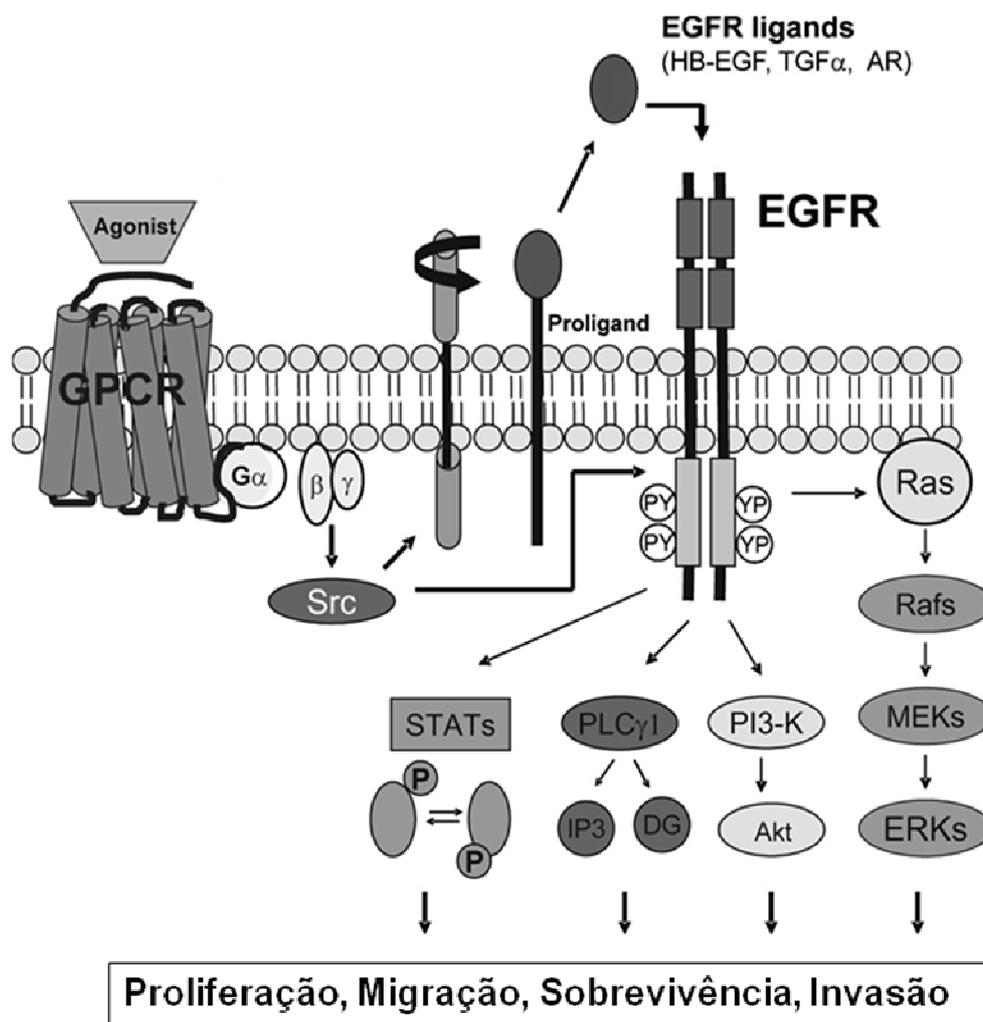


Figura 7. Mecanismo de transativação entre GPCRs e EGFR. Estimulação por agonistas de GPCRs resulta na produção de determinados ligantes da família de EGF, que por sua vez ativam EGFR e sua sinalização intracelular. Adaptado de LIEBMANN, 2011.

1.3 Peptídeo Liberador de Gastrina

O Peptídeo Bombesina foi originalmente isolado da pele da rã *Bombina bombina* (ANASTASI *et al.*, 1971). Outros peptídeos homólogos à Bombesina (como exemplificado na figura 8) foram subseqüentemente descobertos e classificados de acordo com a região COOH-terminal, dentre eles: o peptídeo liberador de gastrina (GRP), neuromedina B (NMB) e neuromedina C (NMC). (McDONALD *et al.*, 1979; KROOG *et al.*, 1995; PRESTON *et al.*, 1996). O GRP e NMC têm uma leucina como penúltimo resíduo da região C terminal enquanto NMB tem um fenilalanina como penúltimo resíduo (SHIN *et al.*, 2006).

Em humanos, três subtipos de receptores que se ligam aos peptídeos da família da Bombesina foram identificados: receptor preferencial ao peptídeo liberador de gastrina (GRPR), receptor preferencial a neuromedina B (NMBR) e receptor para o subtipo 3 de bombesina (BRS-3) (CASSANO *et al.*, 2001). De acordo com Patel e colaboradores (2006), o GRP se liga a GRPR com alta afinidade e a BRS3 com baixa afinidade.

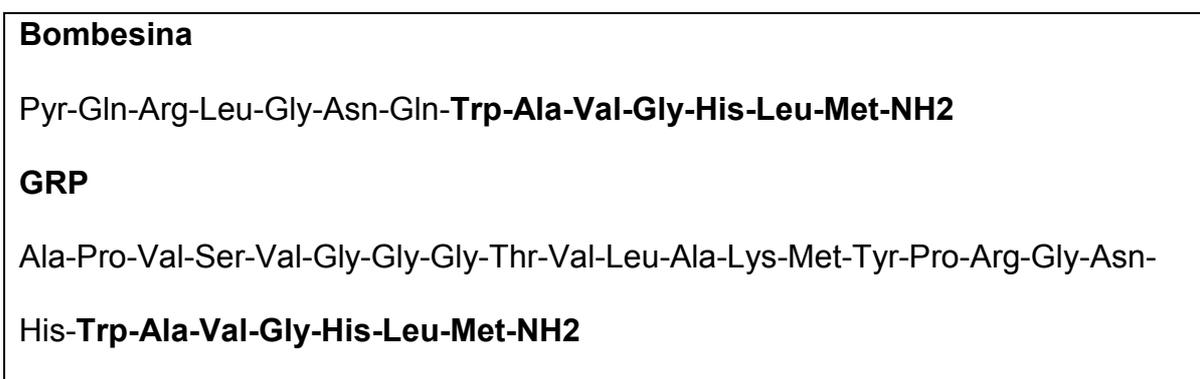


Figura 8. Seqüências de bombesina e GRP. As porções C-terminais de bombesina e GRP, marcadas em negrito, são idênticas (SUNDAY *et al.*, 1988).

Análises imunohistoquímicas usando anticorpos contra Bombesina, GRP e NMB revelaram a existência de peptídeos similares no cérebro e em tecidos gástricos de várias espécies (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005).

O GRPR é um receptor transmembrana com 384 aminoácidos, é codificado no cromossomo X no intervalo Xp11-q11 (MASLEN & BOYD, 1993) e, pertence à família dos receptores acoplados a proteína G heptahelical (BENYA *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2001) (Figura 9).

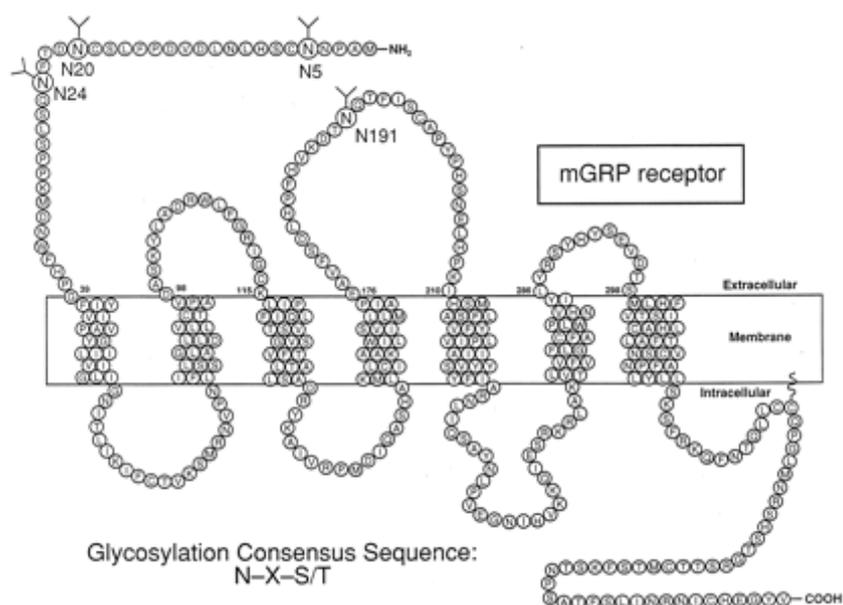


Figura 9. Estrutura molecular do GRPR (BENYA *et al.*, 2000).

GRP liga-se a GRPR ativando uma proteína G α_q que aciona fosfolipase C- β que cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), resultando na produção de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), elevando os níveis de cálcio intracelular e deste modo ativando cascatas de proteínas quinases, como proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), proteína quinase C (PKC) e quinase de adesão focal (FAK) (GILADI *et al.*, 1993; SHUMYATSKY *et al.*, 2002; ROESLER

et al., 2003; MOODY & MERALI, 2004; ROESLER *et al.*, 2004a; 2004b; PATEL *et al.*, 2004; OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005; ROESLER *et al.*, 2006) (Figura 10).

Além de promover crescimento e proliferação, estes receptores também estão envolvidos na migração celular e angiogênese, pois estimulam a pequena GTPase Rho, que tem um papel central na migração celular através do estímulo da ROCK (MARINISSEN & GUTKIND, 2001). E ainda, ativam a fosfolipase A2 (PLA2) e cicloxigenase 2 (COX2), aumentando a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (ROZENGURT *et al.*, 2002) (Figura 11).

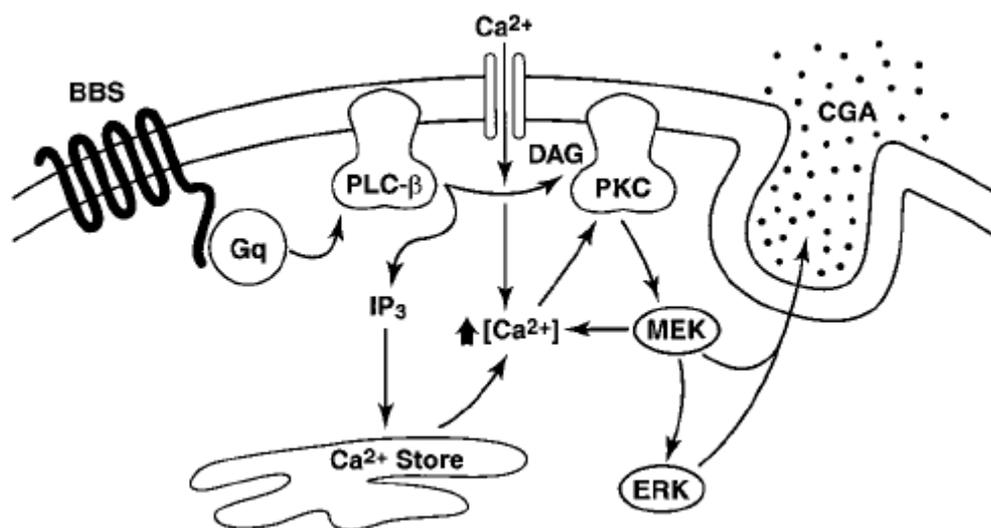


Figura 10. Modelo de via de sinalização de receptores de GRPR (HELLMICH *et al.*, 1999).

Bombesina e GRP são importantes na regulação de vários processos fisiológicos normais (CARROLL *et al.*, 1999), sendo o papel destes peptídeos relacionado a diversos efeitos no sistema nervoso central, sistema imune, pulmonar e gastrointestinal, dentre eles na indução da secreção de hormônios e ácidos gástricos, secreção da mucosa, regulação da contração do músculo esquelético, promoção de quimiotaxia, modulação neuronal, controle da

temperatura corporal, comportamento e formação da memória (LIEBOW *et al.*, 1994 *apud* ROZENGURT *et al.*, 1983; CASSANO *et al.*, 2001; CASANUEVA *et al.*, 1996; ROESLER *et al.*, 2006; CARROLL *et al.*, 2000; DORSAM *et al.*, 2007).

O GRP possui 27 aminoácidos e é codificado no cromossomo 18 (SCOTT *et al.*, 2004). Este peptídeo atua como um hormônio gastrointestinal estimulando o crescimento epitelial intestinal (RADULOVIC *et al.*, 1991), a liberação de gastrina através de células G antrais, a secreção exócrina pancreática e a modulação da motilidade gastrointestinal (SCOTT *et al.*, 2004). Tem uma atividade mitogênica potente, atuando em vias autócrinas promovendo o crescimento do tecido normal e tumoral (FRUCHT *et al.*, 1991; CASANUEVA *et al.*, 1996; CASSANO *et al.*, 2001; SCOTT *et al.*, 2004).

No tecido normal a distribuição de GRP é restrita ao sistema nervoso central, células neuroendócrinas do pulmão de fetos, fibras nervosas no plexo mientérico do trato gastrointestinal, mucosa intestinal e glândulas mamárias (SZEPESHAZI *et al.*, 1991; CHU *et al.*, 1995^a; 1995^b; PRESTON *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 2004).

Além disso, GRP e seu receptor são expressos durante o desenvolvimento do intestino e contribuem para o crescimento das vilosidades (CARROLL *et al.*, 2002), porém, após este período, as células epiteliais que revestem o colo humano normalmente não expressam GRP nem seu receptor (FERRIS *et al.*, 1997; CARROLL *et al.*, 1999).

Em contraste, alguns estudos têm mostrado que tanto o GRP quanto GRPR são expressos de forma aberrante em câncer gastrointestinal como colo e estômago, câncer de próstata, câncer de pequenas células de pulmão, de

pâncreas, de mama e câncer de cabeça e pescoço (PRESTON *et al.*, 1996; CARROLL *et al.*, 1999; 2000; KIM *et al.*, 2002; XIAO *et al.*, 2001; JENSEN *et al.*, 2001; PATEL *et al.*, 2006).

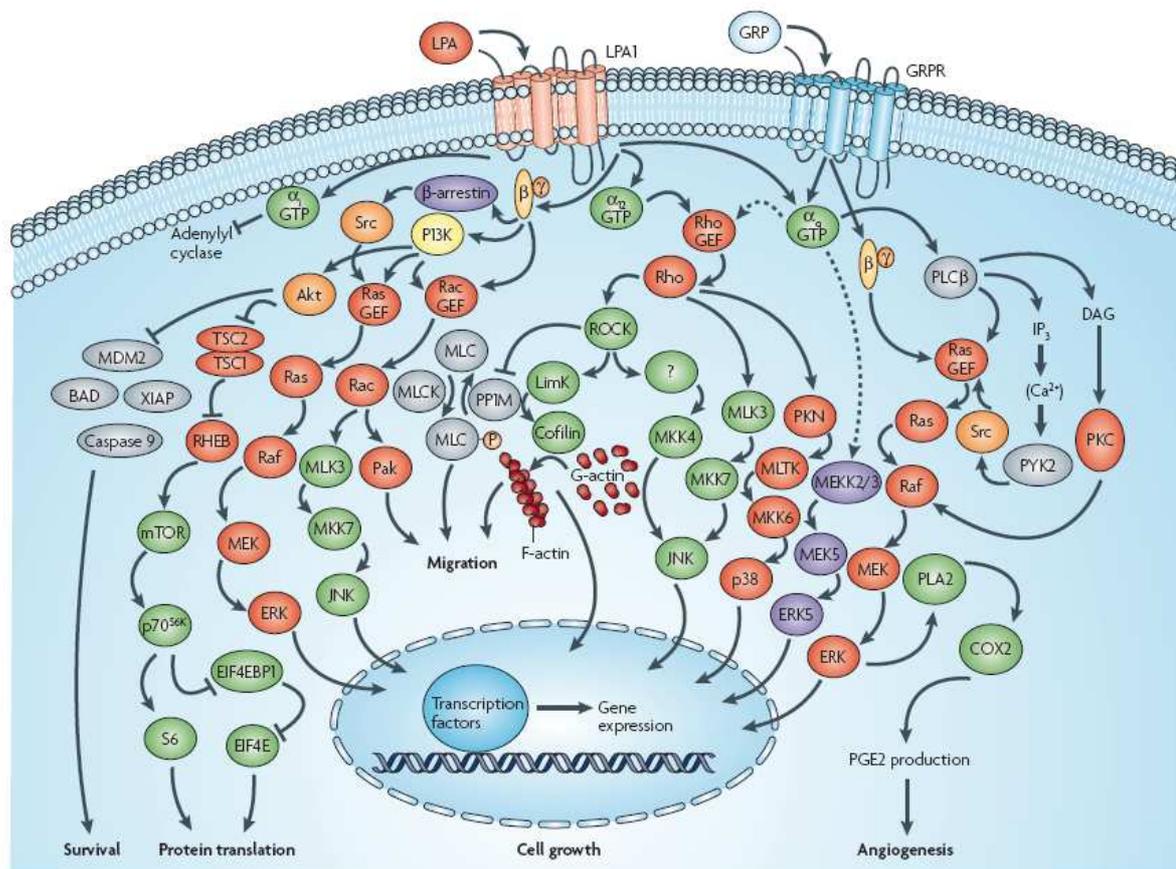


Figura 11. Vias de sinalização ativadas pelo GRPR (DORSAM & GUTKIND, 2007).

Essa superexpressão também pode estar vinculada a características invasivas em tumores do colo bem como no desenvolvimento e progressão da doença (CARROLL *et al.*, 2000; PATEL *et al.*, 2004).

Scott e colaboradores (2004) sugerem que a expressão aberrante do receptor de GRP pode ser suficiente para dirigir a proliferação celular em adenocarcinomas gástricos e colônicos e que o aumento da síntese de GRP pode estar envolvido na estimulação autócrina e parácrina de alguns carcinóides.

Além disso, algumas mutações em aminoácidos de GRPR são comuns no trato gastrointestinal e se distribuem difusamente na região codificadora desse receptor, possivelmente contribuindo também para o desenvolvimento e progressão de câncer do colo e reto (CARROLL *et al.*, 2000).

O peptídeo liberador de gastrina parece ser um importante fator de crescimento autócrino e parácrino (CUTTITA *et al.*, 1985; PRESTON *et al.*, 1996; KROOG *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2002), pois afeta a proliferação e diferenciação celular pela ligação ao seu receptor (SCOTT *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004; MOODY & MERALI, 2004; OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2006; ROESLER *et al.*, 2006), promovendo ainda aderência das células tumorais na matriz extracelular (GLOVER *et al.*, 2004).

Casanueva e colegas (1996) demonstraram que Bombesina induz proliferação celular na linhagem de câncer colorretal humana HT-29, indicando diferença na sinalização iônica e estimulação da divisão celular pela ativação de receptores.

A linhagem celular HT-29 foi originalmente isolada de um adenocarcinoma de colo humano e retém certas características da célula de origem, por isso é um modelo adequado para estudar mecanismos moleculares de tumorigênese colônica, bem como a influência de manipulações hormonais no crescimento do tumor (TRAINER *et al.*, 1988; RADULOVIC *et al.*, 1991; CASSANO *et al.*, 2001; RUGINIS *et al.*, 2006). HT-29 tem GRP funcional e a ativação do receptor induz proliferação celular (CASSANO *et al.*, 2001).

Pelo fato de Bombesina e GRP promoverem o crescimento de alguns tipos de cânceres e possuir função autócrina estimulante, isso indica que antagonistas para estes peptídeos poderiam inibir o crescimento de certos tumores.

Um pseudononapeptídeo antagonista do receptor de Bombesina/GRP, RC-3095, foi sintetizado (LIEBOW *et al.*, 1994) e pode ser considerado como um potencial agente para o tratamento de câncer colorretal (RADULOVIC *et al.*, 1991).

De fato, o efeito proliferativo de GRP em linhagens celulares de câncer colorretal e o efeito reverso do antagonista de GRPR foram confirmados (SAURIN *et al.*, 1999; CASSANO *et al.*, 2001). E experimentos pré-clínicos com RC-3095 indicaram que o bloqueio de GRPR inibe drasticamente o volume tumoral em modelos de enxertos xenográficos com a linhagem celular HT-29 em camundongos *nudes* (RADULOVIC *et al.*, 1991), sugerindo que o bloqueio de GRPR possa representar uma estratégia eficiente para o tratamento de câncer colorretal.

Embora GRP / GRPR exerçam papéis importantes para funções fisiológicas no sistema respiratório, nervoso, urogenital e gastrointestinal (BATTEY *et al.*, 1994; FERRIS *et al.*; 1997; XIAO *et al.*, 2001; SHINGYOJI *et al.*, 2003), estudos de fase I utilizando o antagonistas de GRPR demonstraram toxicidade tolerável (SCHWARTSMANN *et al.*, 2005) e estudos de fase II ainda estão em andamento.

A interação entre GRP e outros mitógenos potenciais pode ocorrer em nível de membrana celular pela modulação de receptores GRP (PRESTON *et al.*, 1996). E estudos dirigidos por Patel e colegas (2004) sugerem que múltiplos

fatores de crescimento possam atuar em conjunto para a progressão de neoplasias. Entretanto, até o presente momento, não foram descritos estudos mostrando a interação de GRPR / EGFR e neurotrofinas.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo geral avaliar o papel de BDNF / TrkB em câncer colorretal investigando interações funcionais com GRPR e EGFR.

Visando ordenar os assuntos abordados, o trabalho será apresentado na forma de capítulos, como descrito abaixo:

O Capítulo 1 trata da avaliação da expressão de BDNF / TrkB em amostras de pacientes diagnosticados com câncer colorretal, bem como interações entre BDNF aos efeitos antitumorais induzidos pelo antagonista de GRPR, RC-3095, em linhagens celulares de câncer colorretal humanas, HT-29 e SW-620.

O Capítulo 2 trata da sinalização via BDNF / TrkB em mecanismos de proteção e resistência à cetuximabe em células de câncer colorretal humanas, HT-29.

O Capítulo 3 versa sobre a associação da expressão de TrkB e GRPR em tecidos tumorais e tecidos adjacentes não neoplásicos oriundos de blocos de parafina de pacientes diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com câncer colorretal esporádico e hereditário.

E, o Capítulo 4 aborda o tema da sinalização de BDNF / TrkB como alvo anti-tumoral, e foi motivado pelos resultados obtidos nos demais capítulos. Trata-se de um Editorial na revista *Expert Reviews of Anticancer Therapy*.

3 CAPÍTULO 1**BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer**

Situação: Publicado

Revista: Oncology

Ano: 2010

Volume: 79

Páginas: 430-439

BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer

Caroline Brunetto de Farias^{a, m, n} Denis Broock Rosemberg^d Tiago Elias Heinen^a
Patricia Koehler-Santos^b Ana Lucia Abujamra^{a, m, n} Flávio Kapczinski^{c, f, n}
Algemir Lunardi Brunetto^{a, g, m, n} Patricia Ashton-Prolla^{b, j} Luise Meurer^k
Maurício Reis Bogo^{n, o} Daniel C. Damin^{h, l} Gilberto Schwartzmann^{a, i, n}
Rafael Roesler^{a, e, n}

Laboratories of ^aCancer Research, ^bGenomic Medicine and ^cMolecular Psychiatry, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), ^dDepartment of Biochemistry, and ^eLaboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Departments of ^fPsychiatry, ^gPediatrics, ^hSurgery and ⁱInternal Medicine, School of Medicine, ^jDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, and ^kDepartment of Pathology and ^lDivision of Coloproctology, University Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, ^mChildren's Cancer Institute (ICI-RS), ⁿNational Institute for Translational Medicine (INCT-TM), and ^oLaboratory of Genomic and Molecular Biology, School of Biosciences, Pontifical Catholic University, Porto Alegre, Brazil

Key Words

Brain-derived neurotrophic factor · TrkB · Gastrin-releasing peptide receptor · Epidermal growth factor receptor · HT-29 cells · Colorectal cancer

Abstract

Objective: Neurotrophin and neuropeptide pathways are emerging targets in cancer. Here we show that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, TrkB, are present in colorectal cancer and that BDNF levels are increased in tumors compared to nontumor tissue. In addition, we investigate the role of BDNF in influencing the response of colorectal cancer cells to inhibition of gastrin-releasing peptide receptors (GRPR). **Methods:** Fresh-frozen sporadic colorectal adenocarcinoma specimens and adjacent non-

neoplastic tissue from 30 patients, as well as paraffin-embedded colorectal cancer samples from 21 patients, were used in this study. Cell proliferation and mRNA and protein levels were examined in HT-29 or SW620 cells treated with a GRPR antagonist, human recombinant BDNF (hrBDNF), a Trk antagonist K252a, or cetuximab. **Results:** Expression of BDNF and TrkB was detected in tumor samples and cell lines. BDNF levels were higher in tumor samples compared to non-neoplastic tissue. BDNF expression and secretion were increased by GRPR blockade in HT-29 cells through a mechanism dependent on epidermal growth factor receptors. Treatment with hrBDNF prevented the effect of GRPR blockade on cell proliferation, whereas a Trk inhibitor reduced proliferation. **Conclusions:** BDNF and TrkB are present in colorectal cancer and might contribute to resistance to GRPR antagonists.

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel
0030-2414/10/0796-0430\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ocl

Dr. R. Roesler
Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS)
90050-070 Porto Alegre, RS (Brazil)
Tel. +55 51 3308 3183, E-Mail rroesler@terra.com.br

© Free Author Copy – for personal use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

Introduction

In spite of major advances in the treatment of colorectal cancer with the introduction of chemotherapy combinations and targeted agents (bevacizumab, cetuximab, and panitumumab), new treatment options are warranted to further increase survival and reduce resistance to therapies. An increase in our knowledge of the cellular signaling mechanisms involved in regulating tumor growth and resistance to antiproliferative agents might enable the identification and characterization of novel molecular targets upon which to focus drug discovery efforts [1, 2].

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are cell surface proteins that constitute major targets for cancer treatment. Upon activation by growth factors, RTKs stimulate intracellular pathways controlling cellular survival and proliferation [3]. Tropomyosin receptor kinase (Trk) receptors constitute a family of RTKs activated by neurotrophins. TrkA, TrkB, and TrkC are respectively the receptors for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and neurotrophin-3 (NT-3) [4]. Emerging evidence indicates that Trk signaling might play a role in cancer progression. Thus, several studies have reported altered expression of Trks in different tumor types, and possible correlations between receptor expression and prognosis have been investigated. For instance, patients with neuroblastoma whose tumors have increased levels of TrkA and TrkC have a better prognosis, whereas those whose tumors expressing increased TrkB and its primary ligand, BDNF, have a poor prognosis [5–7].

Evidence that the BDNF/TrkB pathway might be involved in cancer growth, metastasis, and resistance to therapy has been recently extended to several other types of cancer, including tumors arising from nonneural tissues [7, 8]. Trk activation by BDNF was shown to enhance the proliferation and survival of transitional cell carcinoma cell lines [9]; conversely, a TrkB antibody induced cytotoxicity and suppressed the migration and invasion of transitional cell carcinoma cells [10]. Although mutations of the TrkB gene have been reported in colorectal cancer [8, 11], previous studies have not analyzed the expression and function of TrkB and BDNF in colorectal cancer cell lines or tumor samples.

Mechanisms regulating the expression and secretion of BDNF include G protein-coupled receptors (GPCRs) and downstream signaling pathways and transcription factors [12, 13]. GPCRs play a crucial role in cancer growth and represent important targets for anticancer drug development [14]. GPCRs involved in cancer progression

include the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), whose primary ligand in mammals is GRP, a bombesin-like neuropeptide. GRPR is overexpressed in a variety of human cancers and plays a role in stimulating cancer cell proliferation [15, 16]. The possible interplay between GRPR and BDNF/TrkB signaling in cancer has not been investigated in previous studies.

In the present study, we examined whether BDNF and TrkB could be detected in colorectal cancer samples and cell lines. BDNF levels were higher in tumor samples compared to nonneoplastic tissue. In addition, we found that BDNF expression and secretion were increased by GRPR blockade in colorectal cancer cells through a mechanism dependent on epidermal growth factor receptors (EGFR). Treatment with BDNF prevented the effect of GRPR blockade on cell proliferation, whereas a Trk inhibitor reduced proliferation. Our findings provide the first evidence that BDNF/TrkB might play a role in the progression of colorectal cancer and resistance to antitumor drugs acting at GPCRs.

Patients and Methods

Ethical Aspects

All experimental protocols were approved by the Institutional Research Ethics Committee (CEP-HCPA), and written informed consent was obtained for tissue specimens (document No. CEP-HCPA 07-520 and 08-081).

Tumor and Nonneoplastic Tissue Samples

A set of fresh-frozen sporadic colorectal adenocarcinoma specimens and adjacent nonneoplastic tissue isolated by microdissection were obtained from samples from 30 patients who underwent surgery at the local university hospital (HCPA, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil). These 30 samples were analyzed for BDNF mRNA expression and BDNF protein quantification. BDNF levels were also measured in samples of nonneoplastic colon tissue, located at least 10 cm away from the tumor, removed from the same patients. Paraffin-embedded colorectal cancer samples from a subset of 21 of the same patients were used for immunohistochemical analysis.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from HT-29 and SW620 cells or tumor samples using TRIzol reagent (Invitrogen, USA), in accordance with the manufacturer's instructions, and reverse transcribed with SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix® (Invitrogen). The human GRPR, BDNF, and EGFR primers were designed according to the corresponding Gene Bank sequence. The forward and reverse primers used for reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification are shown in table 1.

Semiquantitative RT-PCR conditions were optimized to determine the number of cycles that would allow product detection

Table 1. Forward and reverse primers used for RT-PCR amplification

Gene	Primer sequences	PCR product size, bp
GRPR	forward: 5'-GTCAAGTCCATGCCAAACG-3' reverse: 5'-GGGTGTCTGTCTTCACT-3'	190
BDNF	forward: 5'-GCGTGAATGGGCCCAAGGCAGG-3' reverse: 5'-TGTGACCGTCCCGCCGACATG-3'	362
EGFR	forward: 5'-TAACAAGCTCACGCAGTTGG-3' reverse: 5'-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3'	190
β -Actin	forward: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAG-3' reverse: 5'-GCTACAGCTTACCAGCAG-3'	190

within the linear phase of mRNA transcript amplification. Experiments were performed with 1.5 mM MgCl₂, 0.1 μ M for each primer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 M betaine, 1 U Taq Platinum® (Invitrogen), and 2 μ l cDNA template. The expression of β -actin was measured as an internal control. The PCR conditions for β -actin, GRPR, and EGFR experiments were: 2.5 mM MgCl₂, 0.1 μ M for each primer, 0.2 mM dNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen), and 1 μ l cDNA template. All assays were carried out in a total volume of 20 μ l using 35 cycles for amplification that consisted of 1 min at 95°C, denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension of primers at 72°C for 45 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. The products of BDNF (362 bp), GRPR (190 bp), EGFR (190 bp), and β -actin (190 bp) were electrophoresed through 1.0% agarose gels containing GelRed™ 10 \times (Biotium, USA) and visualized with ultraviolet light [17–19]. The fragments' length was confirmed using a Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen) and the relative expression of the BDNF gene was determined by densitometry using freeware ImageJ 1.37 for Windows®. Each experiment was performed in replicate using RNA isolated from independent cell cultures, and representative findings are shown. For each set of PCR reactions, a negative control was included. Semiquantitative data are shown as percentage changes compared to controls (the lowest value among replicates in the control group was taken as 100%).

Immunohistochemistry

Expression of TrkB and GRPR in HT-29 and SW620 cells and colorectal tumor samples was analyzed with immunohistochemistry following the general methods described in previous studies [20, 21]. The primary antibodies used were a rabbit polyclonal antibody against GRPR (OPA1-15619; Affinity Bioreagents, Golden, Colo., USA), corresponding to the second extracellular loop of human GRPR, and a mouse monoclonal antibody raised against an extracellular domain of the human TrkB receptor (ab51190; Abcam plc, Cambridge, UK), corresponding to the portion near the site of phosphorylation of tyrosine 515. The samples were lightly counterstained with hematoxylin-eosin (HE) as a control.

For immunohistochemical analysis in cell lines, the cells were seeded in flasks of 25 cm². The cells which grew the least were confluent and they were detached with a trypsin/EDTA solution. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 3 ml of

formol and embedded into paraffin wax [17, 19, 22]. For analysis in tumor samples, 4- μ m-thick sections were mounted on organosilane-coated slides and dried overnight at 37°C. Sections were deparaffinized in a stove, rehydrated in graded alcohols, and washed with distilled water. The procedure for antigenic recuperation was performed in a microwave, inactivation of the endogenous peroxidase through immersion in hydrogen peroxide, and blocking cross-reaction with normal serum. The primary antibody diluted in solution (1:50) was incubated for 12 h at 4°C, followed by application of the complex biotin streptavidin-biotin-peroxidase (LSAB; Dako) and revelation with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Kit, Dako). Cell nuclei were lightly counterstained with HE as a control [20, 21].

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Quantification of BDNF

Forty-eight hours after treatment, the supernatant was removed and BDNF levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ChemiKine™, CYT306; Millipore, Billerica, Mass., USA) according to the manufacturer's instructions. Colorectal cancer cell medium or tissue samples were homogenized in phosphate-buffered solution with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid. Supernatants were added to microtiter plates for 24 h. The standard curve, ranging from 7.8 to 500 pg/ml of BDNF, was prepared with samples diluted 1:2 in sample diluent. Plates were then washed 4 times with wash buffer before addition of anti-BDNF monoclonal antibody diluted 1:1,000 in sample diluent and incubated for 3 h at room temperature. After washing, wells were incubated with 1:1,000 anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody for 1 h at room temperature. After addition of streptavidin enzyme, substrate, and stop solution, BDNF concentrations were determined at 450 nm. The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density and BDNF concentration. BDNF was expressed as picograms of BDNF per milliliter of protein homogenate. Total protein was measured using Bradford's method with bovine serum albumin as a standard.

Cell Lines and Cell Culture

The HT-29 and SW620 human colorectal cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA) in 2000. Cells were seeded (7×10^3 cells per well) in

96-well polystyrene tissue culture-treated flat-bottom microtiter plates (TPP, Switzerland) in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Soral, Brazil), gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Brazil), and Fungizone (250 mg/kg; Invitrogen, São Paulo, Brazil). Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

Cell Proliferation Assays and Treatments

The cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/well in RPMI/10% FBS into 24-well plates and allowed to grow for 24 h. The medium was replaced and cells were treated with RC-3095 (0.001, 1, or 1,000 nM; Aeterna Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany), human recombinant BDNF (hrBDNF; 0.01, 0.1, 1, or 10 ng/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), K252a (1, 10, 100, or 1,000 nM; Sigma-Aldrich), and cetuximab (Erbix, C225; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), alone or combined, added to the culture medium. The doses of RC-3095 and the other agents were chosen on the basis of previous studies [15, 18, 19].

For measuring cell proliferation, cell counting was carried out as previously described [18, 19]. Briefly, the medium was removed, cells were washed with Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen), and 100 μ l of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocytometer. Proliferation was also measured by MTT assay as previously described [17, 22]. The cells were washed with Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen), 11 μ l of MTT (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) was added to each well, and they were then incubated for 4 h at 37°C. The plate was left at room temperature until it was completely dry. Dimethyl sulfoxide was added and the absorbance was read at 492 nm in a multiplate reader.

Colony Formation Assay

HT-29 cells were seeded into 6-well plates (400 cells/well) after treatment with RC-3095 for 48 h. After incubation for 10–14 days, the cells were fixed with 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet. Only colonies containing 50 or more cells were scored under a microscope as previously described [18]. The radiation-surviving fraction was then calculated as:

$$SF = \frac{\text{Number of colonies in treatment cells}}{\text{Number of colonies in control}} \times 100$$

Statistics

Data are shown as means \pm SEM. Differences between mean values were evaluated by 1-way analysis of variance followed by Tukey post hoc tests when appropriate. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Expression of BDNF and TrkB in Tumor Samples from Patients with Colorectal Cancer

We analyzed BDNF mRNA expression in tumor samples from a set of 30 patients (14 males, median age 67 years; 16 female, median age 62 years) with colorectal ad-

enocarcinoma. BDNF mRNA was detected in 28 of 30 cases (93.3%; fig. 1a). Quantification of BDNF protein by ELISA revealed that tumors had significantly higher levels of BDNF compared to nonneoplastic adjacent tissue obtained from the same patients (fig. 1b).

We also used immunohistochemistry to confirm the expression of TrkB in a panel of 21 colorectal adenocarcinoma samples from a subset of patients (9 males, median age 67 years; 12 females, median age 64 years). Immunoreactivity for TrkB was detected in 20 (95.24%) samples (fig. 1c). These findings indicate that BDNF and TrkB are expressed in most colorectal tumors, and BDNF levels are increased in colorectal cancers compared to nonneoplastic colorectal tissue.

BDNF Prevents the Inhibitory Effect of GRPR Blockade on the Proliferation of HT-29 Colorectal Cancer Cells

To examine the possible role of BDNF/TrkB in colorectal cancer, we treated HT-29 human colorectal cancer cells with hrBDNF. Because BDNF/TrkB might interact with GRPR signaling in cancer, we also investigated the effect of hrBDNF combined with the GRPR antagonist RC-3095, an experimental anticancer drug that produces antiproliferative effects in HT-29 cells [23]. Consistent with previous studies [23, 24], RC-3095 induced significant inhibition of cell proliferation measured either by MTT assay or by cell counting (data not shown). It is worth pointing out that we were able to find significant effects of RC-3095 in colorectal cancer cells at lower doses compared to those described in previous studies [23]. Treatment with hrBDNF alone at doses ranging from 0.01 to 10 ng/ml did not significantly affect the proliferation of HT-29 cells (data not shown). However, cotreatment with hrBDNF prevented the decrease in proliferation produced by RC-3095 (fig. 2a). In fact, a significant increase in proliferation was observed in cells treated with hrBDNF combined with 1 nM RC-3095. Conversely, treatment with the Trk receptor antagonist, K252a, resulted in a dose-dependent decrease in proliferation (fig. 2b). Expression of mRNA for BDNF and GRPR and protein for TrkB and GRPR in HT-29 cells was confirmed with RT-PCR and immunohistochemistry (data not shown). The results suggest that increased BDNF/TrkB signaling might be associated with a compensatory response aimed to restore normal levels of survival and proliferation in cells submitted to inhibition of GRPR signaling.

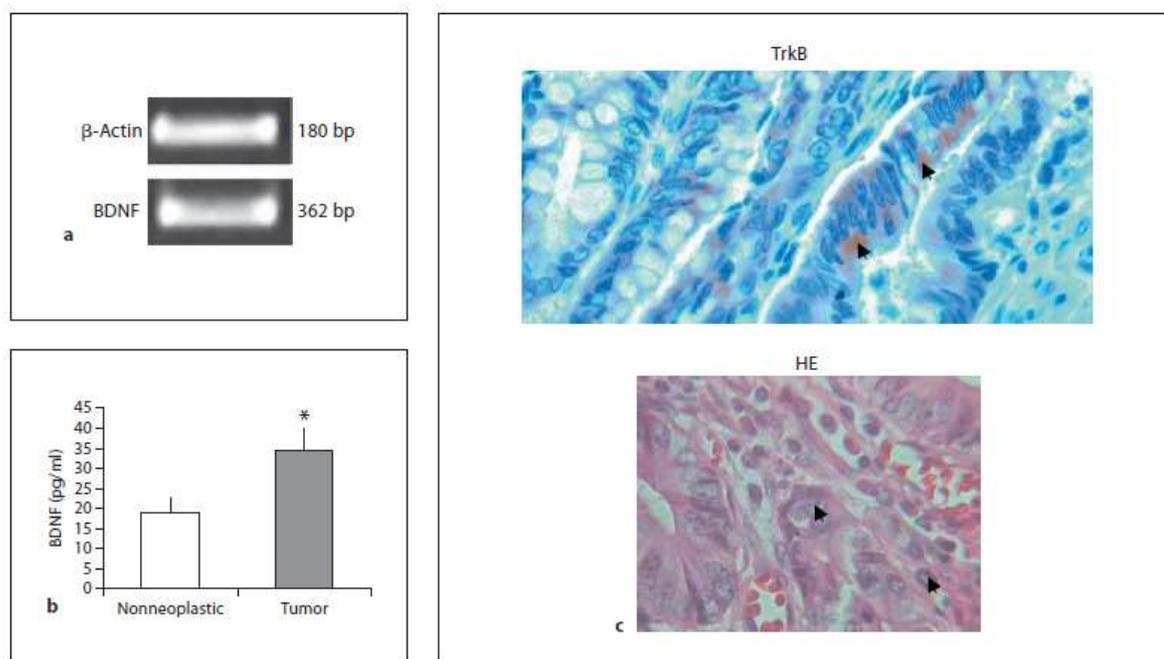


Fig. 1. Expression of BDNF and TrkB in colorectal cancer samples. **a** BDNF mRNA was detected by RT-PCR in tumor samples from 28 of 30 patients with colorectal cancer. A transcript size of 362 bp representing a fragment of GRPR was identified. **b** Increased levels of BDNF in colorectal tumors. The levels of BDNF protein in samples of tumors and nonneoplastic colon tissue from patients with colorectal cancer were measured with ELISA as described in Patients and Methods. Data are the mean \pm SEM BDNF levels (picograms/milliliter) of 1 tumor sample per patient

and 1 sample of nonneoplastic tissue per patient obtained from 30 patients; experiments were performed in duplicate; * $p < 0.05$ compared to nonneoplastic tissue. **c** Immunoreactivity for TrkB in a representative sample from a panel of 21 colorectal tumors. TrkB was detected in 20 of 21 samples. TrkB expression on the membranes is indicated by arrowheads ($\times 1,000$). Cell nuclei were lightly counterstained with HE as a control (bottom panel, 2 cells indicated by arrowheads, $\times 1,000$).

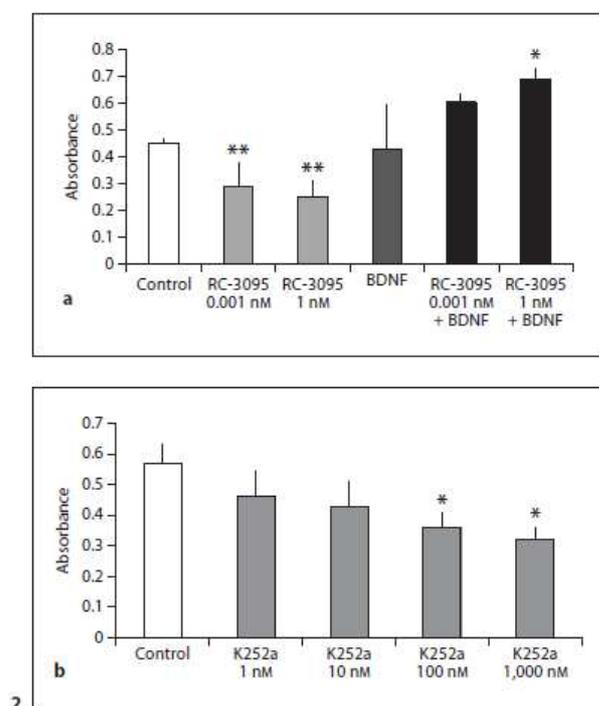
Expression and Secretion of BDNF in HT-29 Colorectal Cancer Cells Are Increased by GRPR Blockade

Treatment with RC-3095 resulted in a significant increase in mRNA levels for BDNF measured with semi-quantitative RT-PCR (fig. 3a). RC-3095 at 1 nM also produced a significant increase in BDNF levels measured by ELISA in the cell culture supernatant, indicating an increase in BDNF secretion from HT-29 cells (fig. 3b). It is important to note that the dose of RC-3095 that produced a significant increase in BDNF secretion failed to influence cell survival measured with the colony-forming assay (fig. 3c). Moreover, one can speculate that an increased release of cellular BDNF might contribute to the BDNF-induced blockade of the effects of RC-3095 on proliferation shown in figure 2. These results are consistent with

the possibility that increased expression and secretion of BDNF might represent a compensatory response to the antiproliferative effects of RC-3095.

The Increase in BDNF Expression Induced by GRPR Antagonism in Colorectal Cancer Cells Depends on EGFR

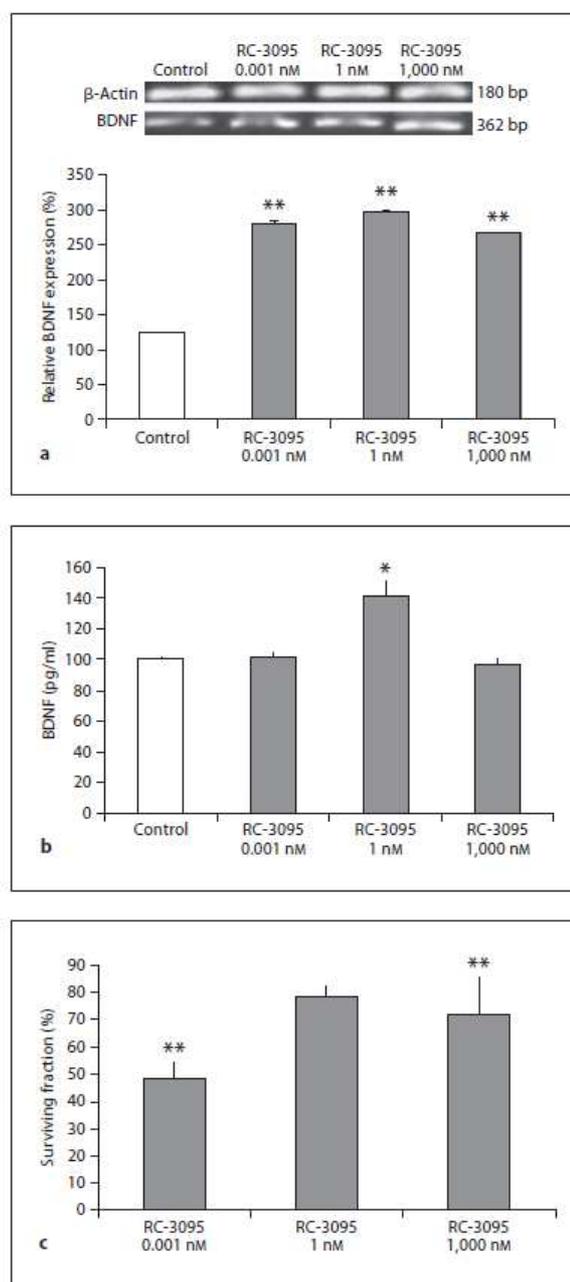
We then aimed to explore the possible signaling mechanisms involved in mediating the alterations in BDNF expression induced by GRPR blockade. Several GPCRs utilize EGFR activation as a signaling intermediate in cancer cells [25]. In addition, EGF has been shown to up-regulate BDNF mRNA and protein levels in neurons [26]. Moreover, EGFR cross-talks with both TrkB [27] and GRPR [28–33]. We thus wondered whether EGFR was involved in RC-3095-induced alterations in BDNF levels.



2

Fig. 2. BDNF prevents the inhibition of colorectal cancer cell proliferation induced by GRPR antagonism. **a** BDNF blocked the inhibitory effect of the GRPR antagonist RC-3095 on cell proliferation. HT-29 cells were treated with RC-3095, hrBDNF (10 ng/ml), or RC-3095 combined with hrBDNF as described in Patients and Methods. Cell proliferation was measured via MTT assay 48 h after treatment. Data are the means \pm SEM absorbance (492 nm) of 3 different experiments, each performed in sextuple wells; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control cells. **b** Trk inhibition reduces the proliferation of HT-29 cells. Treatment with different doses of the Trk antagonist K252a was performed as described in Patients and Methods. Data are the mean \pm SEM absorbance (492 nm) of 5 different experiments, each performed in sextuple wells; * $p < 0.05$ compared to control cells.

Fig. 3. GRPR blockade increases the expression and secretion of BDNF in human colorectal cancer cells. **a** The GRPR antagonist RC-3095 increases the expression of mRNA for BDNF in HT-29 cells. Cells were treated with RC-3095 as described in Patients and Methods. Transcripts for β -actin (180 bp, upper lanes) and BDNF (362 bp, bottom lanes) were identified. Representative results for control cells and cells treated with different doses of RC-3095 are shown in the 4 different lanes. Results in the graph are shown as the mean \pm SEM percentage alteration in BDNF mRNA levels for 4 different experiments; ** $p < 0.01$ compared to control cells. **b** RC-3095 produced an increase in BDNF secretion by HT-29 cells. BDNF levels were assessed by ELISA as described in Patients and Methods. Data are the mean \pm SEM BDNF levels (pg/ml) for 5 different experiments; * $p < 0.05$ compared to control cells. **c** The only dose of RC-0395 (1 nM) that induced a significant increase in BDNF secretion was also the only dose in which cell



3

survival was not inhibited by RC-3095. Cells were seeded and treated with RC-3095 as described in Patients and Methods. Colony formation was scored under a microscope 48 h after treatment. The results are shown as the mean \pm SEM percentage surviving fraction for 4 different experiments; ** $p < 0.01$ compared to control cells.

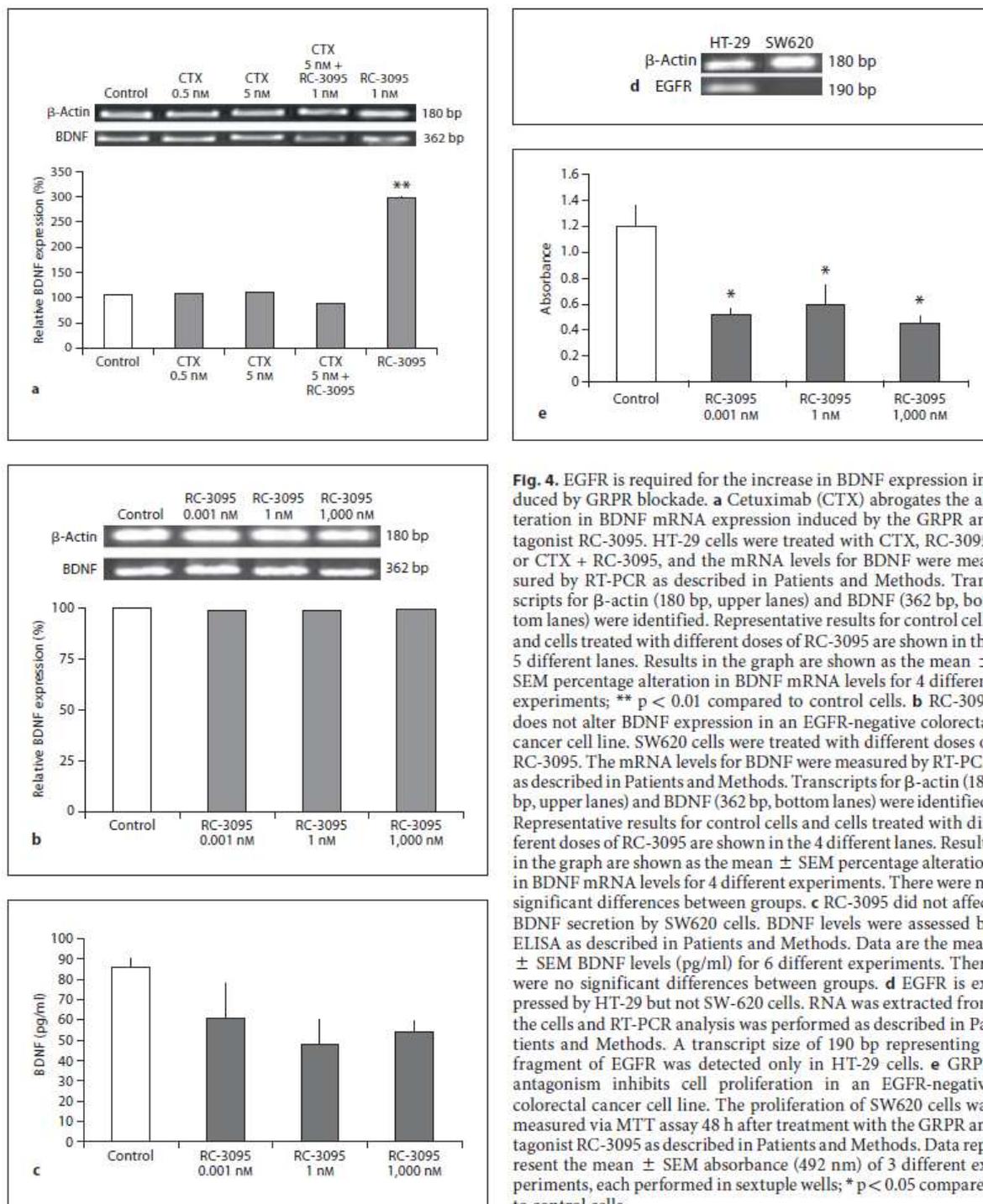


Fig. 4. EGFR is required for the increase in BDNF expression induced by GRPR blockade. **a** Cetuximab (CTX) abrogates the alteration in BDNF mRNA expression induced by the GRPR antagonist RC-3095. HT-29 cells were treated with CTX, RC-3095, or CTX + RC-3095, and the mRNA levels for BDNF were measured by RT-PCR as described in Patients and Methods. Transcripts for β -actin (180 bp, upper lanes) and BDNF (362 bp, bottom lanes) were identified. Representative results for control cells and cells treated with different doses of RC-3095 are shown in the 5 different lanes. Results in the graph are shown as the mean \pm SEM percentage alteration in BDNF mRNA levels for 4 different experiments; ** $p < 0.01$ compared to control cells. **b** RC-3095 does not alter BDNF expression in an EGFR-negative colorectal cancer cell line. SW620 cells were treated with different doses of RC-3095. The mRNA levels for BDNF were measured by RT-PCR as described in Patients and Methods. Transcripts for β -actin (180 bp, upper lanes) and BDNF (362 bp, bottom lanes) were identified. Representative results for control cells and cells treated with different doses of RC-3095 are shown in the 4 different lanes. Results in the graph are shown as the mean \pm SEM percentage alteration in BDNF mRNA levels for 4 different experiments. There were no significant differences between groups. **c** RC-3095 did not affect BDNF secretion by SW620 cells. BDNF levels were assessed by ELISA as described in Patients and Methods. Data are the mean \pm SEM BDNF levels (pg/ml) for 6 different experiments. There were no significant differences between groups. **d** EGFR is expressed by HT-29 but not SW-620 cells. RNA was extracted from the cells and RT-PCR analysis was performed as described in Patients and Methods. A transcript size of 190 bp representing a fragment of EGFR was detected only in HT-29 cells. **e** GRPR antagonism inhibits cell proliferation in an EGFR-negative colorectal cancer cell line. The proliferation of SW620 cells was measured via MTT assay 48 h after treatment with the GRPR antagonist RC-3095 as described in Patients and Methods. Data represent the mean \pm SEM absorbance (492 nm) of 3 different experiments, each performed in sextuple wells; * $p < 0.05$ compared to control cells.

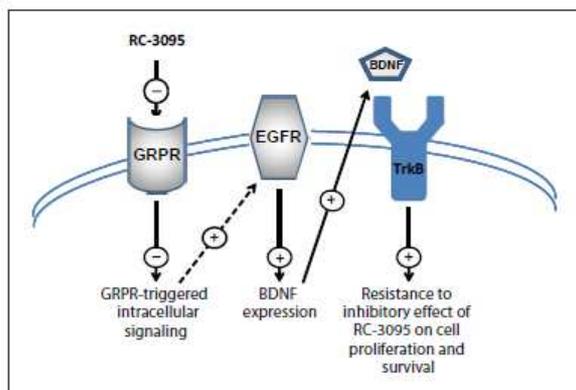


Fig. 5. Schematic diagram of a model of interaction between GRPR blockade and BDNF signaling in colorectal cancer cells. The GRPR antagonist RC-3095 can inhibit GRPR-triggered cellular signaling and lead to an EGFR-dependent increase in the expression and secretion of BDNF. Released BDNF might act on TrkB receptors to partially counteract the inhibitory effects of GRPR blockade on cell proliferation and survival.

Cotreatment with the monoclonal antibody against human EGFR, cetuximab, completely abrogated the increase in BDNF mRNA levels by RC-3095 in HT-29 cells (fig. 4a). In addition, RC-3095 did not alter BDNF mRNA expression (fig. 4b) or BDNF secretion (fig. 4c) in the EGFR-negative [28] human colorectal cancer cell line SW620. Analysis using RT-PCR confirmed that HT-29 cells, but not SW620 cells, expressed mRNA for EGFR (fig. 4d). As with HT-29 cells, the EGFR-negative SW620 cell line expressed both mRNA and protein for GRPR (data not shown). EGFR was not required for the antiproliferative effect of RC-3095; treating SW620 cells with RC-3095 resulted in a significant decrease in cell proliferation measured via either MTT (fig. 4e) or cell counting (data not shown). It is not possible to make a direct comparison between the antiproliferative effects of RC-3095 on HT-29 and SW620 cells because independent experiments were performed for each cell line. However, it is worth pointing out that, whereas RC-3095 produced a maximal inhibitory response of 44.44% in HT-29 cells (fig. 2a), the same dose of RC-3095 produced a reduction of 62.5% in the proliferation of SW620 cells (fig. 4e). It is possible that the apparent higher sensitivity of SW620 cells to the inhibitory effects of RC-3095 is related to the lack of RC-3095-induced increase in BDNF levels in these cells, which would be consistent with the possibility that BDNF contributes to resistance to GRPR blockade. To-

gether, these results indicate that EGFR is critical in mediating the alterations in BDNF levels produced by GRPR antagonism.

Discussion

The biological functions of BDNF/TrkB signaling were first characterized in the central nervous system, where BDNF secretion from neurons is critical for the formation of synaptic connections during central nervous system development as well as for synaptic plasticity [34, 35]. More recently, BDNF has also been shown to promote tumor cell proliferation, survival, and metastasis, and it has been shown to increase resistance to chemotherapy, thus emerging as a novel target in different types of cancer [7, 8]. The present study is the first to demonstrate the expression of BDNF and TrkB in colorectal cancer tumor samples and cell lines and to examine a possible role for BDNF/TrkB signaling in colorectal cancer. The finding that BDNF levels are increased in colorectal tumors from patients is consistent with the possibility that BDNF acts as a growth factor involved in colorectal cancer progression.

We also found that BDNF expression and secretion in cultured colorectal cancer cells are increased in response to GRPR blockade. A significant increase in BDNF secretion was produced only by an intermediate concentration of RC-3095, whereas lower and higher doses were ineffective. Similar dose-response patterns for the effects of RC-3095 in cancer cells have been observed in previous studies [19, 23]. The role of GRPR activation in promoting cancer cell proliferation has been described in several models of experimental tumors, and peptidergic GRPR antagonists such as RC-3095 have been developed as potential anticancer agents [15, 16, 36, 37]. Preclinical experiments have indicated that pharmacological GRPR blockade inhibits tumor growth in experimental colorectal cancer. Thus, in HT-29 xenografts in nude mice, treatment with RC-3095 administered via subcutaneous injections or infusion with osmotic minipumps resulted in a pronounced decrease in tumor volume [38]. This evidence suggests that GRPR antagonism might represent an efficient antitumor strategy in colorectal cancer. Although we recently provided preliminary evidence that RC-3095 can enhance nerve growth factor levels in HT-29 cells [39], functional interactions between the GRPR and neurotrophins in cancer have not been characterized in previous studies. In the present study, the inhibitory effect of RC-3095 on the proliferation of

colorectal cancer cells was prevented by cotreatment with hrBDNF, and RC-3095 failed to reduce cell survival at a dose that significantly stimulated BDNF secretion. These findings indicate that increased BDNF expression and secretion might represent a mechanism of resistance against the antitumor effect of RC-3095. The lack of effect of treatment with BDNF alone might indicate that BDNF could display a more pronounced effect under conditions in which basal cell proliferation or viability is reduced by an inhibitory treatment. Moreover, it is possible that alterations such as an upregulation of TrkB by RC-3095 are involved in the effects we observed. This possibility remains to be examined by future studies. Consistent with the possibility that TrkB activation by BDNF acts as a prosurvival and proliferative signal, inhibiting Trk receptors in HT-29 cells reduced cell proliferation. The enhancement of BDNF expression induced by RC-3095 was prevented by cetuximab and did not occur in the EGFR-negative cell line, suggesting that the effect is mediated by EGFR. Figure 5 shows a schematic diagram of a proposed model of interaction between GRPR blockade and BDNF signaling in EGFR-positive colorectal cancer cells. It would be worth examining whether an increase in BDNF is induced only by GPRR antagonists or represents a more general response of colorectal cancer cells to other GPCR antagonists or other classes of antitumor agents. The latter possibility is supported by evidence indicating that higher BDNF levels increase the survival of neuroblastoma cells under conditions of reduced growth factor availability or exposure to cytotoxic agents [6, 7, 40].

Although we have not verified whether BDNF inhibition has additive effects along with GRPR antagonism in inhibiting cell proliferation, our findings that BDNF prevented, while the Trk antagonist K252a mimicked, the antiproliferative effect of RC-3095 suggest that a greater inhibition of cell proliferation *in vitro* and of tumor

growth *in vivo* may occur by the combined inhibition of GRPR and TrkB. This possibility should be evaluated by future studies. Moreover, our findings provide a rationale for the investigation of combinations of agents inhibiting BDNF/TrkB plus GPCR antagonists and EGFR inhibitors in experimental *in vivo* models of colorectal cancer.

In summary, the present study provides the first evidence that BDNF and TrkB are expressed and might play a role in regulating tumor progression and drug response in colorectal cancer. Studies evaluating the effects of TrkB inhibitors, combined with other targeted therapies such as GPCR antagonists or with standard chemotherapy, should be extended to colorectal cancer.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant No. 303703/2009-1 to R.R.), the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), the University Hospital Research Fund (FIPE/HCPA), the South American Office for Anticancer Drug Development, and the Children's Cancer Institute (ICI-RS). The authors thank Bruno Kilpp Goulart for his excellent technical assistance, Dr. Nadja Schröder and Dr. Maria Noêmia Martins de Lima for their assistance in preparing the manuscript, and Dr. Iduna Fichtner for her comments on an early version of the manuscript.

Disclosure Statement

R.R. is a cofounder, partner and board member of NeuroAssay Ltd. He has served as a consultant to Eurofarma and has been remunerated for talks and travel expenses by Janssen-Cilag. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

- 1 Arnold D, Seufferlein T: Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut* 2010;59:838–858.
- 2 Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N: Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375:1030–1047.
- 3 Krause DS, Van Etten RA: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005;353:172–187.
- 4 Barbacid M: The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994;25:1386–1403.
- 5 Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM: Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993;328:847–854.
- 6 Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM: Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14:759–767.
- 7 Thiele CJ, Li Z, McKee AE: On Trk – the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 2009;15:5962–5967.
- 8 Desmet CJ, Peeper DS: The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:755–759.
- 9 Huang YT, Lai PC, Wu CC, Hsu SH, Cheng CC, Lan YF, Chiu TH: BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010;36:1469–1476.

- 10 Huang YT, Lai PC, Wu CC, Cheng CC, Chiu TH: TrkB antibody elicits cytotoxicity and suppresses migration/invasion of transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010;37:943–949.
- 11 Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Saha S, Markowitz S, Willson JK, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949.
- 12 Hutchinson AJ, Chou CL, Israel DD, Xu W, Regan JW: Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int* 2009;54:439–446.
- 13 Martinowich K, Manji H, Lu B: New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* 2007;10:1089–1093.
- 14 Dorsam RT, Gutkind JS: G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:79–94.
- 15 Cornelio D, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007;18:1457–1466.
- 16 Patel O, Shulkes A, Baldwin GS: Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:23–41.
- 17 de Farias CB, Lima RC, Lima LO, Flores DG, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R: Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 2008;75:27–31.
- 18 de Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, Santos DG, Meurer L, de Castro CG Jr, Brunetto AL, Schwartzmann G, Battastini AM, Lenz G, Roesler R: Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol* 2009;93:191–201.
- 19 Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, Di Leone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R: Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 2008;5:99–105.
- 20 Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology* 2007;73:340–345.
- 21 Flores DG, Meurer L, Uberti AF, Macedo BR, Lenz G, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R: Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull* 2010;82:95–98.
- 22 Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, Kapczinski F, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R: BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 2010;40:303–310.
- 23 Casanueva FF, Perez FR, Casabiell X, Camiña JP, Cai RZ, Schally AV: Correlation between the effects of bombesin antagonists on cell proliferation and intracellular calcium concentration in Swiss 3T3 and HT-29 cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1406–1411.
- 24 Fernando A, Brunetto de Farias C, Roesler R, Schwartzmann G: Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: a potential therapeutic role for gastrin-releasing peptide receptor antagonists. *Oncology* 2007;72:160–161.
- 25 Liebmann C: EGF receptor activation by GPCRs: a universal pathway reveals different versions. *Mol Cell Endocrinol* 2011;331:222–231.
- 26 Tirassa P, Triaca V, Amendola T, Fiore M, Aloe L: EGF and NGF injected into the brain of old mice enhance BDNF and ChAT in proliferating subventricular zone. *J Neurosci Res* 2003;72:557–564.
- 27 Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, Kouttab N, Chu W, Wan Y: Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int J Oncol* 2006;29:1003–1011.
- 28 Balin-Gauthier D, Delord JP, Rochoix P, Mallard V, Thomas F, Hennebelle I, Bugat R, Canal P, Allal C: In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different levels of EGFR. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57:709–718.
- 29 Chao C, Ives K, Hellmich HL, Townsend CM Jr, Hellmich MR: Gastrin-releasing peptide receptor in breast cancer mediates cellular migration and interleukin-8 expression. *J Surg Res* 2009;156:26–31.
- 30 Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, Groot K, Hebert F, Arencibia JM: Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett* 2001;171:37–45.
- 31 Liu X, Carlisle DL, Swick MC, Gaither-Davis A, Grandis JR, Siegfried JM: Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res* 2007;313:1361–1372.
- 32 Thomas SM, Grandis JR, Wentzel AL, Gooding WE, Lui VW, Siegfried JM: Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia* 2005;7:426–431.
- 33 Zhang Q, Bhola NE, Lui VW, Siwak DR, Thomas SM, Gubish CT, Siegfried JM, Mills GB, Shin D, Grandis JR: Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1414–1424.
- 34 Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ: Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. *Neuroscientist* 2005;11:323–333.
- 35 Thomas K, Davies A: Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF. *Curr Biol* 2005;15:R262–R264.
- 36 Hohla F, Schally AV: Targeting gastrin releasing peptide receptors: new options for the therapy and diagnosis of cancer. *Cell Cycle* 2010;9:1738–1741.
- 37 Schally AV: New approaches to the therapy of various tumors based on peptide analogues. *Horm Metab Res* 2008;40:315–322.
- 38 Radulovic S, Miller G, Schally AV: Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res* 1991;51:6006–6009.
- 39 de Farias CB, Stertz L, Lima RC, Kapczinski F, Schwartzmann G, Roesler R: Reduced NGF secretion by HT-29 human colon cancer cells treated with a GRPR antagonist. *Protein Pept Lett* 2009;16:650–652.
- 40 Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ: Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res* 2002;62:6756–67563.

© **Free Author Copy – for personal use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS ARTICLE WITHOUT WRITTEN CONSENT FROM S. KARGER AG, BASEL IS A VIOLATION OF THE COPYRIGHT.

Written permission to distribute the PDF will be granted against payment of a permission fee, which is based on the number of accesses required. Please contact permission@karger.ch

4 CAPÍTULO 2

BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition

Situação: Aceito

Revista: Biochemical and Biophysical Research Communications

Data de aceite: 17 de julho de 2012.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition

Caroline Brunetto de Farias^{a,b,c,d}, Tiago Elias Heinen^{a,c,d}, Rafael Pereira dos Santos^{a,c,d},
Ana Lucia Abujamra^{a,b,d}, Gilberto Schwarstmann^{a,d,e}, Rafael Roesler^{a,b,c,d,*}

^a Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^d National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^e Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2012

Available online xxx

Keywords:

Brain-derived neurotrophic factor

TrkB

Cetuximab

Epidermal growth factor receptor

Colorectal cancer

ABSTRACT

The clinical success of targeted treatment of colorectal cancer (CRC) is often limited by resistance to anti-EGFR therapy. The neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB have recently emerged as anticancer targets, and we have previously shown increased BDNF levels in CRC tumor samples. Here we report the findings from *in vitro* experiments suggesting that BDNF/TrkB signaling can protect CRC cells from the antitumor effects of EGFR blockade. The anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab reduced both cell proliferation and the mRNA expression of BDNF and TrkB in human HT-29 CRC cells. The inhibitory effect of cetuximab on cell proliferation and survival was counteracted by the addition of human recombinant BDNF. Finally, the Trk inhibitor K252a synergistically enhanced the effect of cetuximab on cell proliferation, and this effect was blocked by BDNF. These results provide the first evidence that increased BDNF/TrkB signaling might play a role in resistance to EGFR blockade. Moreover, it is possible that targeting TrkB could potentiate the anticancer effects of anti-EGFR therapy.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted monoclonal antibodies poses a limitation for the therapy of colorectal cancer (CRC). Much recent research has focused on characterizing the molecular mechanisms of acquired resistance to the anti-EGFR antibody cetuximab. In CRC, these mechanisms include mutations in the *KRAS*, *BRAF*, or *NRAS* genes, which might compensate for EGFR blockade by stimulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [1–4]. It is also likely that resistance can be mediated by amplification of other receptor tyrosine kinases (RTKs), as has been demonstrated for other members of the HER (ErbB) family such as HER2 [5–7]. The identification of additional resistance mechanisms may reveal new avenues to increase the effectivity of EGFR inhibitors.

Signaling mediated by the prototypical neurotrophin, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which acts by activating the RTK TrkB, has recently emerged as an anticancer target [8–10]. In CRC, mutations have been found in two sites of the TrkB kinase domain

[11], and we [12] and others [13] have recently described increased levels of BDNF in CRC tumor samples and cultured cells. Interestingly, our previous findings indicated that BDNF/TrkB signaling might play a role in resistance against an antitumor peptide that blocks gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), through a mechanism dependent on EGFR [12]. Here, we show for the first time that cetuximab treatment in cultured human colon cancer cells *in vitro* is associated with a reduction in the expression of both BDNF and TrkB. Importantly, BDNF could protect from the effects of cetuximab on cell growth, and inhibiting TrkB increased the sensitivity to cetuximab. These findings provide the first evidence that BDNF/TrkB signaling might play a role in resistance to EGFR blockade, and that TrkB inhibition can potentiate the antitumor effects of anti-EGFR therapy.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

The HT-29 human colorectal cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA) in 2000. Cells were seeded (7×10^3 cells per well) in 96-well polystyrene tissue culture-treated flat-bottom microtiter plates (TPP, Switzerland) in RPMI 1640 (LGC Biotechnology, Cotia, Brazil) medium

* Corresponding author at: Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil, Fax: +55 51 33083121

E-mail address: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler).

2

C.B. de Farias et al. / Biochemical and Biophysical Research Communications xxx (2012) xxx–xxx

79 supplemented with 10% fetal bovine serum (Soral, Campinas,
80 Brazil), gentamicin (4 mg/ml; Nova Pharma, Jardim Anápolis, Bra-
81 zil), ampicillin (50 mg/ml; Nova Pharma, Jardim Anápolis, Brazil),
82 and fungizone (250 mg/kg; GIBCO, Grand Island, USA). Cells were
83 kept at a temperature of 37 °C, a minimum relative humidity of
84 95%, and an atmosphere of 5% CO₂ in air. The cells were seeded
85 at a density of 1 × 10⁴ cells/well in RPMI 10% FBS into 24-well (cell
86 counting experiments) or 7 × 10³ cells per well in 96-well (MTT as-
87 say experiments) plates and allowed to grow for 24 h [12].

88 The medium was replaced and cells were treated with cetux-
89 imab (0.1, 1.0, or 10 nM; C225; Merck, Darmstadt, Germany) or
90 medium for 24 h, after which, in the cells in the BDNF co-treatment
91 groups, human recombinant BDNF (10 ng/ml; Sigma-Aldrich, St.
92 Louis, Mo., USA) was added for 48 h. For the evaluation of the co-
93 treatment between cetuximab (0.1 nM) and K252 (10 nM; Sig-
94 ma-Aldrich, St Louis, USA) cells were seeded in RPMI 1640 10%
95 FBS for 24 h, followed by the treatment for 72 h. The doses of
96 agents were chosen on the basis of pilot dose curves previous
97 experiments [12].

98 2.2. Cell proliferation and survival assays

99 For trypan blue cell counting, the medium was removed, cells
100 were washed with Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen), and
101 100 µl of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells,
102 which were counted immediately in a hemocytometer [12,14]. Prolif-
103 eration was also measured by MTT assay. MTT was added to each
104 well (11 µl; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, USA), and they were
105 then incubated for 4 h at 37 °C. The plate was left at room tempera-
106 ture until it was completely dry. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was
107 added and the absorbance was read at 492 nm in a multiplate reader
108 [12,15].

109 Cell survival was measured with a colony formation assay as pre-
110 viously described [12]. Cells were seeded into 6-well plates (400
111 cells/well) after treatment with cetuximab (0.1 or 10 nM) and BDNF
112 (10 ng/ml), alone or combined, for 48 h. After incubation, the cells
113 were replaced in RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal
114 Bovine Serum for 7–10 days. Cells were then fixed with 70% ethanol
115 and counterstained with 0.5% crystal violet. Only colonies contain-
116 ing 50 or more cells were scored under a microscope. The radiation-
117 surviving fraction was then calculated as:

$$120 SF = \frac{\text{Number of colonies in treatment cells}}{\text{Number of colonies in controls}} \times 100$$

121 2.3. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

122 HT-29 cells were cultured in the presence of cetuximab (0.1 or
123 10 nM) for 10 h for RT-PCR reaction, followed by total RNA extrac-
124 tion using Trizol reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil), in accor-
125 dance with the manufacturer's instructions, and reverse
126 transcribed with superscript III First-Strand Synthesis supermix
127 (Invitrogen). The human β-actin, BDNF, and TrkB primers were de-
128 signed according to the corresponding GeneBank sequence. The for-
129 ward and reverse primers used for RT-PCR amplification were as
130 follows: BDNF, 5'-GCCTATGTGGAGTTGGCATT-3' (forward) and 5'-
131 CTTTCAGAGGCCITTCGTTTTC-3' (reverse); TrkB, 5'-TGGTGCATTCCAT
132 TCACTGT-3' (forward) and 5'-CGTGGTACTCCGTGTGATTG-3' (re-
133 verse); β-actin, 5'-GAGACCTTCAACACCCAG-3' (forward) and 5'-GC
134 TACAGCTTACCAGCAG-3' (reverse). All product sizes were 190 bp.

135 Semiquantitative RT-PCR conditions were optimized to deter-
136 mine the number of cycles that would allow product detection
137 within the linear phase of mRNA transcript amplification. Experi-
138 ments were performed with 1.5 mM MgCl₂, 0.1 µM for each primer,
139 0.2 mM DNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen), and 2 µl
140 cDNA template. The expression of β-actin was measured as an

141 internal control. The PCR conditions for β-actin, BDNF, and TrkB
142 experiments were: 2.5 mM MgCl₂, 0.1 µM for each primer,
143 0.2 mM DNTPs, 1U Taq Platinum (Invitrogen), and 1 µl cDNA tem-
144 plate. All assays were carried out in a total volume of 15 µl using
145 35 cycles for amplification that consisted of 1 min at 95 °C, dena-
146 turation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension
147 of primers at 72 °C for 45 s, followed by a final extension at 72 °C
148 for 10 min. The products of β-actin (190 bp), BDNF (190 bp), and
149 TrkB (190 bp) were electrophoresed through 1.0% agarose gels con-
150 taining ethidium bromide (Biotium, Hayward, USA) and visualized
151 with ultraviolet light [12]. The fragments' length was confirmed
152 using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) and the relative expres-
153 sion of the BDNF and TrkB gene was determined by densitometry
154 using freeware ImageJ 1.37 for Windows. Each experiment was
155 performed in replicate using RNA isolated from independent cell
156 cultures, and representative findings are shown. For each set of
157 PCR reactions, a negative control was included. Semiquantitative
158 data are shown as percentage changes relative to β-actin (the low-
159 est value among replicates in the control group was taken as 100%).

2.4. Statistics

161 Data are shown as means ± SEM; n = 3–6 independent experi-
162 ments. The lowest value among replicates in the control group
163 was taken as 100%. Differences between mean values were evalu-
164 ated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey
165 post hoc tests when appropriate. In all comparisons, P < 0.05 was
166 considered statistically significant.

3. Results

3.1. The anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab dose-dependently reduces the proliferation of HT-29 human CRC cells

170 The first experiment examined the effects of cetuximab on the
171 proliferation of HT-29 CRC cells. The expression of EGFR in HT-29
172 cells was confirmed in a previous report [12]. Treatment with
173 cetuximab at 10, but not 0.1 or 1.0 nM, significantly reduced the
174 proliferation of HT-29 cells assessed by MTT assays (P < 0.001 com-
175 pared to controls; Fig. 1), indicating that EGFR blockade by cetux-
176 imab dose-dependently inhibits the proliferation of CRC cells.

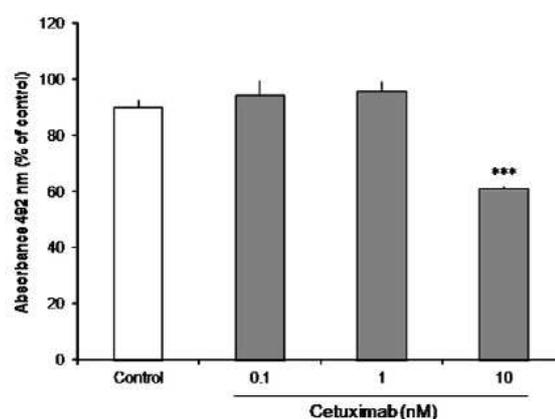


Fig. 1. EGFR blockade by cetuximab dose-dependently reduces CRC cell proliferation. Cells from the HT-29 human CRC cell line were cultured and treated with cetuximab (0.1, 1.0, or 10 nM) as described in Materials and methods. Cell proliferation was measured with MTT assays. Data are mean ± SEM absorbance (the lowest value among replicates in the control group was taken as 100%); n = 4 independent experiments; ***P < 0.001 compared to controls.

177 3.2. The inhibitory effect of cetuximab on CRC cells is associated with a
178 decreased mRNA expression of BDNF and TrkB

179 The dose of cetuximab shown to inhibit the proliferation of HT-
180 29 cells in the previous experiment also produced reductions of
181 55.3% and 48.7%, respectively, in the mRNA expression of BDNF
182 ($P < 0.001$ compared to controls; Fig. 2A) and TrkB ($P < 0.001$
183 compared to controls; Fig. 2B) assessed by RT-PCR. Cetuximab at
184 0.1 nM, on the other hand, produced reductions of only about 3-
185 4% in the expression of BDNF and TrkB mRNA, although these
186 reductions also were significant different from controls (BDNF,
187 $P < 0.01$; TrkB, $P < 0.001$). The results suggest that the antiproliferative
188 effect of EGFR blockade in CRC cells involves, and possibly re-
189 quires, an inhibition of BDNF/TrkB signaling.

190 3.3. BDNF protects CRC cells from the inhibitory effects of cetuximab

191 The addition of human recombinant BDNF (10 ng/ml) blocked
192 the effects of cetuximab at 10 nM on HT-29 cell proliferation as-
193 sessed by trypan blue cell counting (Fig. 3A). Again, treatment with
194 10 nM cetuximab resulted in a significant reduction of cell prolifera-
195 tion ($P < 0.05$). However, proliferation was not inhibited, and was

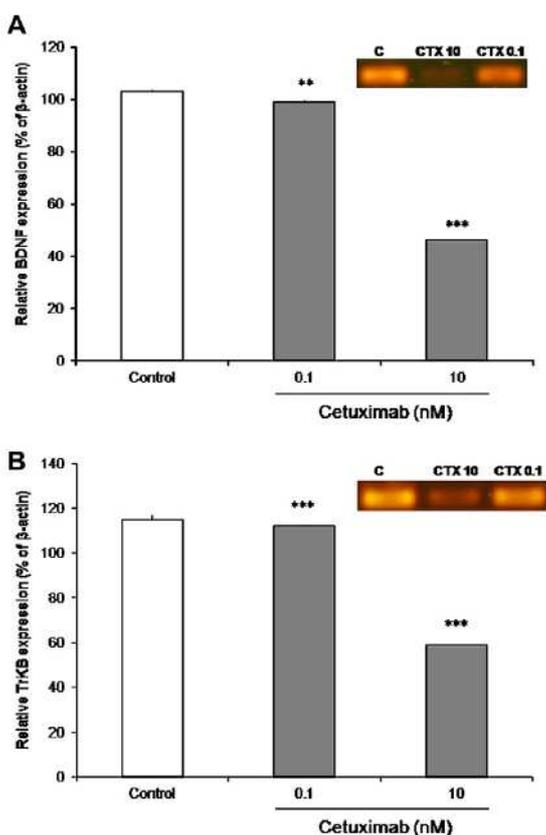


Fig. 2. Cetuximab reduces BDNF and TrkB mRNA expression in CRC cells. HT-29 cells were cultured and treated with cetuximab (CTX, 0.1 or 10 nM) as described in Materials and methods. The mRNA expression of BDNF (A) and TrkB (B) was measured by RT-PCR. Data are mean \pm SEM relative expression (% of β -actin). Representative results are shown on the top of the graphs; $n = 3$ independent experiments; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to controls.

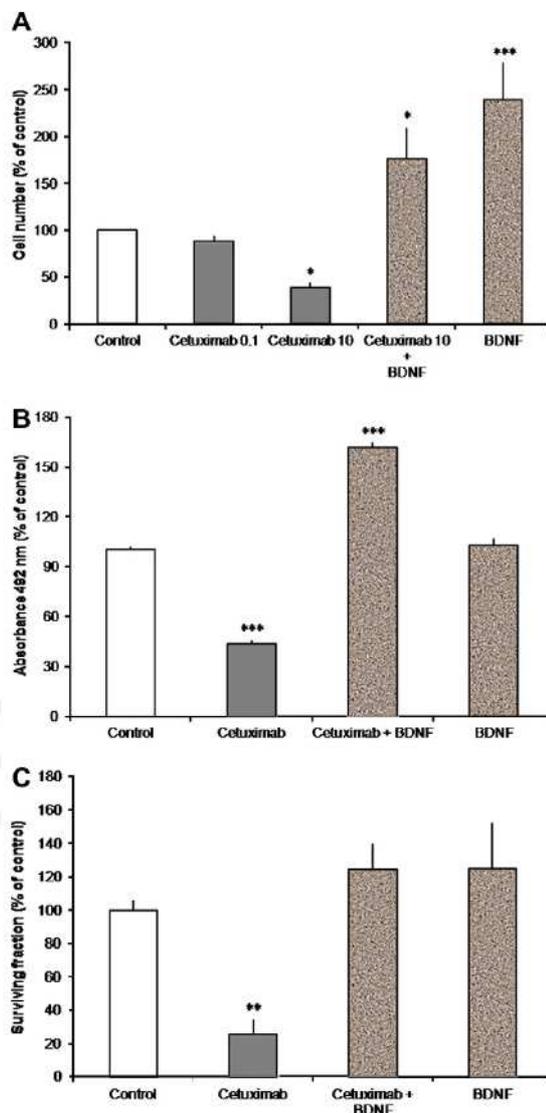


Fig. 3. BDNF protects CRC cells from the antitumor effects of cetuximab. HT-29 cells were cultured and treated with cetuximab (0.1 or 10 nM), human recombinant BDNF (10 ng/ml), or 10 nM cetuximab followed by 10 ng/ml BDNF, as described in Materials and methods. (A) Cetuximab at 10 nM produced a significant reduction in cell proliferation measured by cell counting, while treatment with cetuximab plus BDNF or BDNF alone led to an increase in proliferation. Data are mean \pm SEM cell number (% of control); $n = 5$ independent experiments. (B) Cetuximab at 10 nM also reduced cell proliferation measured with MTT assays. BDNF had no effect by itself, but proliferation was increased in cells treated with cetuximab followed by BDNF. Data are mean \pm SEM absorbance (the lowest value among replicates in the control group was taken as 100%); $n = 4$ independent experiments. (C) Cell survival assessed with a colony-forming assay was inhibited by cetuximab (10 nM), and this effect was completely blocked by BDNF. Treatment with BDNF alone had no effect. Data are mean \pm SEM of the surviving fraction (the lowest value among replicates in the control group was taken as 100%); $n = 4$ independent experiments; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ compared to controls.

in fact enhanced compared to controls, in cells treated with 10 nM cetuximab followed with BDNF ($P < 0.05$) or BDNF alone ($P < 0.001$). When the MTT assay was used as a measure of cell

196
197
198

4

C.B. de Farias et al. / Biochemical and Biophysical Research Communications xxx (2012) xxx–xxx

proliferation (Fig. 3B), again cetuximab inhibited cell proliferation ($P < 0.001$), and this effect was completely reversed by BDNF. Again, proliferation was increased compared to controls in cells treated with cetuximab plus BDNF ($P < 0.001$), while BDNF alone had no effect. Cell survival measured with a colony formation assay was significantly reduced by BDNF ($P < 0.01$ compared to controls). BDNF by itself did not affect survival, but completely protected the cells from the effect of cetuximab (Fig. 3C). The results suggest that BDNF can promote CRC cell proliferation and rescue from the reduction in cell proliferation and survival produced by EGFR blockade.

3.4. TrkB inhibition synergistically enhances the antiproliferative effect of cetuximab in CRC cells

The previous experiments indicated that the antitumor effect of cetuximab on HT-29 CRC cells was associated with a reduction in BDNF and TrkB expression and blocked by the addition of exogenous BDNF. In the last experiment, we examined whether, conversely, blocking TrkB could potentiate the effect of cetuximab. Cells were treated with a low, ineffective dose of cetuximab (0.1 nM), the Trk inhibitor K252a (10 nM), BDNF (10 ng/ml), cetuximab combined with K252a, or cetuximab combined with both BDNF and K252a. Cell proliferation was measured with the MTT assay. The results are shown in Fig. 4. Neither cetuximab nor K252a affected proliferation when given alone. However, proliferation was reduced when the cells were treated with cetuximab combined with K252a ($P < 0.001$). Although K252a is not a selective TrkB inhibitor and acts also on other Trk receptors, the effect of cetuximab plus K252a was completely abolished by BDNF, which alone did not affect proliferation. This result suggests that TrkB inhibition can potentiate the inhibitory effect of cetuximab on CRC cell growth.

4. Discussion

Resistance to cetuximab in patients with metastatic CRC is currently thought to be associated primarily with mutant *KRAS* [1,2,16,17]. However, other mechanisms are likely to be important as well, since up to 65% of patients bearing wild-type tumors are

resistant to anti-EGFR antibodies [16]. Other activating mutations in downstream effectors of EGFR signaling, such as *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* (which encodes a catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, *PI3 K*) have been implicated [2–4,18,19].

Trk was originally described as an oncogene present in a human colon carcinoma [20]. However, neurotrophins and Trks have been for many years investigated mainly by neurobiologists as brain molecules involved in neuronal survival and synaptic plasticity [21], while their role in cancer has remained less explored. The function of neurotrophin/Trk signaling in cancer has been mostly characterized in neural tumors, particularly neuroblastoma. BDNF and TrkB are preferentially expressed in aggressive neuroblastomas and might stimulate tumor growth, invasion, and metastasis [reviewed in [8–10]]. BDNF/TrkB may also promote resistance to chemotherapy in neuroblastoma. Thus, treatment with BDNF protected neuroblastoma cells from etoposide toxicity *in vitro*, and high TrkB expression in experimental neuroblastoma in mice was associated with less sensitivity to etoposide in a xenograft mouse model [22].

In human CRC, TrkB has been found mutated on two different sites in its kinase domain, *TRKB*^{T695I} and *TRKB*^{D751N} [11,23], but experiments using rat epithelial cells and human tumor cell lines have failed to provide evidence for a gain-of-function effect of the mutations [23]. Still, it is possible that increased BDNF/TrkB signaling plays an important role in CRC. We have recently shown that BDNF and TrkB are expressed in CRC cell lines and sporadic CRC specimens, and BDNF levels were increased in tumor samples compared to non-neoplastic tissue. In addition BDNF/TrkB stimulation was associated with resistance to the antitumor effects of GRPR blockade in HT-29 CRC cells, through an EGFR-dependent mechanism [12]. Another recent study confirmed BDNF and TrkB expression in CRC and showed that BDNF stimulated cell proliferation and had an anti-apoptotic effect mediated through TrkB [13]. Moreover, high TrkB expression in tumors has recently been associated with poor prognosis in patients with CRC, and proliferation, migration, and invasion in CRC cells were inhibited by TrkB knockdown [24]. However, previous studies have not provided evidence that BDNF/TrkB can be a mechanism of resistance to anti-EGFR therapy in cancer. The present results provide early *in vitro* evidence suggesting that (1) the effects of cetuximab might require a reduction in BDNF and TrkB expression, (2) increased BDNF signaling might counteract the effects of cetuximab, and (3) combined targeting of EGFR and TrkB might increase sensitivity to anti-EGFR therapy in CRC cells.

Further experiments will be required to identify the intracellular signaling mechanisms underlying the functional interaction between cetuximab treatment and BDNF in CRC cells. EGFR and TrkB share common downstream effectors, including the Ras/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)/MAPK and the *PI3 K*/*AKT* cascades [9,21,25]. It is possible that increased BDNF/TrkB activity in CRC compensates for EGFR blockade by stimulating those shared intracellular protein kinase pathways.

Our findings raise the possibility that, under conditions in which BDNF/TrkB activity is up-regulated, as is likely the case in CRC [12,13,24], it may contribute to cetuximab resistance. *In vivo* studies aimed at investigating whether the combined targeting of EGFR and BDNF/TrkB might be a novel strategy to overcome cetuximab resistance in CRC are warranted.

Acknowledgments

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant number 303703/2009-1 to RR); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); FAPERGS/CNPq Grant number 10/0044-3-PRONEX; the University Hospital Institutional Research Fund

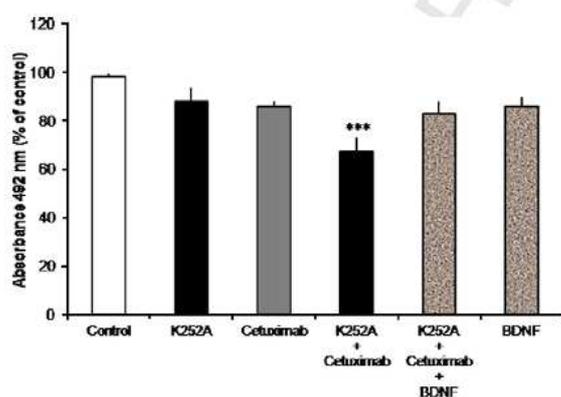


Fig. 4. The antiproliferative effect of cetuximab in CRC cells is synergistically enhanced by TrkB inhibition. HT-29 cells were cultured and treated with cetuximab (10 nM), the Trk inhibitor K252a (10 nM), BDNF (10 ng/ml), cetuximab combined with K252a, or cetuximab combined with both BDNF and K252a, as described in Materials and methods. Cell proliferation was measured with MTT assays. Data are mean \pm SEM absorbance (the lowest value among replicates in the control group was taken as 100%); $n = 6$ independent experiments; *** $P < 0.001$ compared to controls.

299 (FIPE/HCPA); the South American Office for Anticancer Drug Devel-
300 opment; and the Children's Cancer Institute (ICI-RS).

301 References

302 [1] C.S. Karapetis, S. Khambata-Ford, D.J. Jonker, C.J. O'Callaghan, D. Tu, N.C.
303 Tebbutt, R.J. Simes, H. Chalchal, J.D. Shapiro, S. Robitaille, T.J. Price, L. Shepherd,
304 H.J. Au, C. Langer, M.J. Moore, J.R. Zalberg, K-ras mutations and benefit from
305 cetuximab in advanced colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 1757–
306 1765.
307 [2] A. Bardelli, S. Siena, Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and
308 panitumumab in colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1254–1261.
309 [3] A. Bardelli, P.A. Jänne, The road to resistance. EGFR mutation and cetuximab,
310 *Nat. Med.* 18 (2012) 199–200.
311 [4] L.A. Diaz Jr, R.T. Williams, J. Wu, I. Kinde, J.R. Hecht, J. Berlin, B. Allen, I. Bozic,
312 J.G. Reiter, M.A. Nowak, K.W. Kinzler, K.S. Oliner, B. Vogelstein, The molecular
313 evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal
314 cancers, *Nature* 486 (2012) 537–540.
315 [5] D.L. Wheeler, S. Huang, T.J. Kruser, M.M. Nechrebecki, E.A. Armstrong, S.
316 Benavente, V. Gondi, K.T. Hsu, P.M. Harari, Mechanisms of acquired resistance
317 to cetuximab: role of HER (ErbB) family members, *Oncogene* 27 (2008) 3944–
318 3956.
319 [6] K. Yonesaka, K. Zejnullahu, I. Okamoto, T. Satoh, F. Cappuzzo, J. Souglakos, D.
320 Ercan, A. Rogers, M. Roncalli, M. Takeda, Y. Fujisaka, J. Philips, T. Shimizu, O.
321 Maenishi, Y. Cho, J. Sun, A. Destro, K. Taira, K. Takeda, T. Okabe, J. Swanson, H.
322 Itoh, M. Takada, E. Lifshits, K. Okuno, J.A. Engelman, R.A. Shivdasani, K. Nishio,
323 M. Fukuoka, M. Varella-Garcia, K. Nakagawa, P.A. Jänne, Activation of ERBB2
324 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody
325 cetuximab, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011), 99ra86.
326 [7] A. Bertotti, G. Migliardi, F. Galimi, F. Sassi, D. Torti, C. Isella, D. Corà, F. Di
327 Nicolantonio, M. Buscarino, C. Petti, D. Ribero, N. Russolillo, A. Muratore, P.
328 Massucco, A. Pisacane, L. Molinaro, E. Valtorta, A. Sartore-Bianchi, M. Risio, L.
329 Capussotti, M. Gambacorta, S. Siena, E. Medico, A. Sapino, S. Marsoni, P.M.
330 Comoglio, A. Bardelli, L. Trusolino, A molecularly annotated platform of
331 patient-derived xenografts ("xenopatiens") identifies HER2 as an effective
332 therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer, *Cancer Discov.* 1
333 (2011) 508–523.
334 [8] C.J. Desmet, D.S. Peeper, The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-
335 cancer therapy?, *Cell Mol. Life Sci.* 63 (2006) 755–759.
336 [9] C.J. Thiele, Z. Li, A.E. McKee, On Trk – the TrkB signal transduction pathway is
337 an increasingly important target in cancer biology, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009)
338 5962–5967.
339 [10] R. Roesler, C.B. de Farias, A.L. Abujamra, A.L. Brunetto, G. Schwartzmann, BDNF/
340 TrkB signaling as an anti-tumor target, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11 (2011)
341 1473–1475.
342 [11] A. Bardelli, D.W. Parsons, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, S. Saha, S. Markowitz, J.K.
343 Willson, G. Parmigiani, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, Mutational
344 analysis of the tyrosine kinase in colorectal cancers, *Science* 300 (2003) 949.
345 [12] C.B. de Farias, D.B. Rosemberg, T.E. Heinen, P. Koehler-Santos, A.L. Abujamra, F.
346 Kapczinski, A.L. Brunetto, P. Ashton-Prolla, L. Meurer, M.R. Bogo, D.C. Damin, G.
347 Schwartzmann, R. Roesler, BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-
348 releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer, *Oncology* 79 (2010)
349 430–439.

[13] H. Aki, A. Perraud, C. Mélin, M.O. Jauberteau, M. Mathonnet, Fine-tuning roles
350 of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in
351 colorectal cancer cell survival, *PLoS One* 6 (2011) e25097.
352 [14] D.G. Flores, C.B. de Farias, J. Leites, M.S. de Oliveira, R.C. Lima, A.S. Tamajusuku,
353 L.P. Di Leone, L. Meurer, A.L. Brunetto, G. Schwartzmann, G. Lenz, R. Roesler,
354 Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells
355 through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism, *Curr.*
356 *Neurovasc. Res.* 5 (2008) 99–105.
357 [15] C.B. de Farias, R.C. Lima, L.O. Lima, D.G. Flores, L. Meurer, A.L. Brunetto, G.
358 Schwartzmann, R. Roesler, Stimulation of proliferation of U138-MG
359 glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents
360 that enhance cAMP signaling, *Oncology* 75 (2008) 27–31.
361 [16] C.J. Allegra, J.M. Jessup, M.R. Somerfield, S.R. Hamilton, E.H. Hammond, D.F.
362 Hayes, P.K. McAllister, R.F. Morton, R.L. Schilsky, American Society of Clinical
363 Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in
364 patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-
365 epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy, *J. Clin. Oncol.*
366 27 (2009) 2091–2096.
367 [17] S. Misale, R. Yaeger, S. Hobor, E. Scala, M. Janakiraman, D. Liska, E. Valtorta, R.
368 Schiavo, M. Buscarino, G. Siravegna, K. Bencardino, A. Cercek, C.T. Chen, S.
369 Veronese, C. Zanon, A. Sartore-Bianchi, M. Gambacorta, M. Gallicchio, E.
370 Vakiari, V. Boscaro, E. Medico, M. Weiser, S. Siena, F. Di Nicolantonio, D. Solit,
371 A. Bardelli, Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR
372 therapy in colorectal cancer, *Nature* 486 (2012) 532–536.
373 [18] A. Sartore-Bianchi, M. Martini, F. Molinari, S. Veronese, M. Nichelatti, S. Artale,
374 F. Di Nicolantonio, P. Saletti, S. De Dosso, L. Mazzucchelli, M. Frattini, S. Siena,
375 A. Bardelli, PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical
376 resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 69 (2009)
377 1851–1857.
378 [19] W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilias,
379 K.T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P.
380 Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari,
381 P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J.
382 Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A.O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C.
383 Quortrup, T.P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M.
384 Delorenzi, S. Tejpar, Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the
385 efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory
386 metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis, *Lancet*
387 *Oncol.* 11 (2010) 753–762.
388 [20] D. Martin-Zanca, G. Mitra, L.K. Long, M. Barbacid, Molecular characterization of
389 the human trk oncogene, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (Pt 2) (1986)
390 983–992.
391 [21] E.J. Huang, L.F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction,
392 *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 609–642.
393 [22] Z. Li, D.Y. Oh, K. Nakamura, C.J. Thiele, Perifosine-induced inhibition of akt
394 attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance
395 in neuroblastoma *in vivo*, *Cancer* 117 (2011) 5412–5422.
396 [23] T.R. Geiger, J.Y. Song, A. Rosado, D.S. Peeper, Functional characterization of
397 human cancer-derived TRKB mutations, *PLoS One* 6 (2011) e16871.
398 [24] H. Fujikawa, K. Tanaka, Y. Toiyama, S. Saigusa, Y. Inoue, K. Uchida, M. Kusunoki,
399 High TrkB expression levels are associated with poor prognosis and EMT
400 induction in colorectal cancer cells, *J. Gastroenterol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-012-0532-0>.
401 [25] J.P. Spano, R. Fagard, J.C. Soria, O. Rixe, D. Khayat, G. Milano, Epidermal growth
402 factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic
403 perspectives, *Ann. Oncol.* 16 (2005) 189–194.
404
405

5 CAPÍTULO 3

Interações entre TrkB e GRPR em Câncer Colorretal Esporádico e Hereditário

5.1 Pacientes e Métodos

Foram analisadas 67 amostras de tecido colônico tumoral e tecido adjacente não tumoral de pacientes diagnosticados com câncer colorretal, sendo 30 delas oriundas de tumores esporádicos sem pré-disposição familiar e 37 amostras de pacientes com câncer colorretal hereditário, destes, 15 classificados de acordo com os critérios Amsterdam I e 22 selecionados pelos critérios Bethesda. Todos os pacientes foram tratados e acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) durante o período de 1970 a 1993. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA (GPPG # 07-009).

5.2 Imuno-histoquímica

A expressão dos receptores TrkB e GRPR foi realizada através da técnica de imuno-histoquímica. O anticorpo primário anti-TrkB correspondeu a porção próxima a fosforilação da tirosina 515 (ab51190, Abcam plc., Cambridge, K), e o anticorpo anti-GRPR correspondente a segunda alça extra celular de GRPR humano (OPA1-15619, Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA).

Brevemente, cortes de 4 µm de espessura foram realizados e mantidos *overnight* a 37°C. Os cortes foram desparafinizados em estufa, hidratados em álcool e lavados com água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em

forno de microondas, a inativação da peroxidase endógena através da imersão em peróxido de hidrogênio e o bloqueio das reações inespecíficas com soro normal. Os anticorpos primários foram diluídos em solução (1:50) e incubados por 12 horas, a 4°C, seguido pela aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako). A revelação ocorreu com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). As células foram contra coradas com hematoxilina-eosina como controle. A avaliação da coloração imuno-histoquímica foi realizada de forma cega por dois patologistas.

A análise qualitativa da expressão de TrkB e GRPR foi realizada considerando-se intensidade e distribuição de marcação, onde 0 = negativo e 1 = positivo.

5.3 Análise Estatística

Comparações entre tecido tumoral e tecido adjacente não tumoral, bem como comparações entre os grupos hereditários e esporádicos, foram realizadas através do Teste Qui-Quadrado de Pearson, ou Teste Exato de Fisher. Para análise de sobrevida global foi utilizada curva de Kaplan-Meier. E para análise de correlação entre as expressões de TrkB e GRPR nos tecidos adjacente não tumoral ou tumoral foi utilizado o Coeficiente de Spearman. A sobrevida global foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data de óbito ou *follow-up*. As comparações foram consideradas significativas se $p < 0.05$.

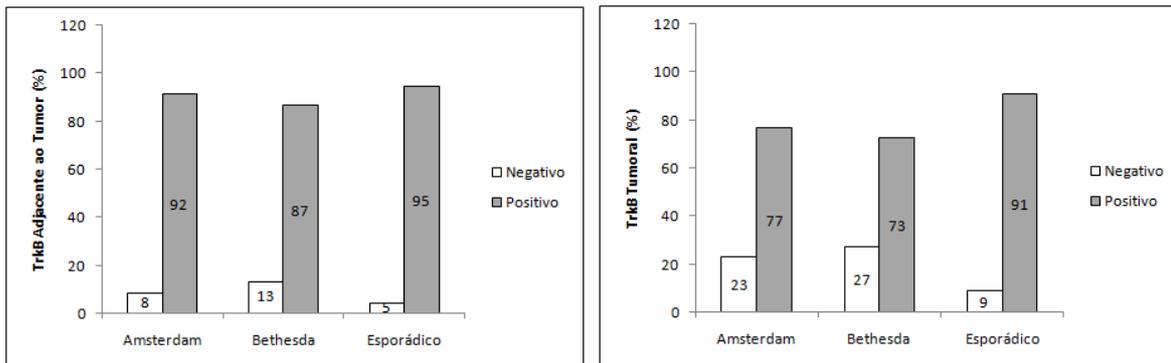
5.4 Resultados

5.4.1 Expressão de TrkB e GRPR em câncer colorretal esporádico e hereditário

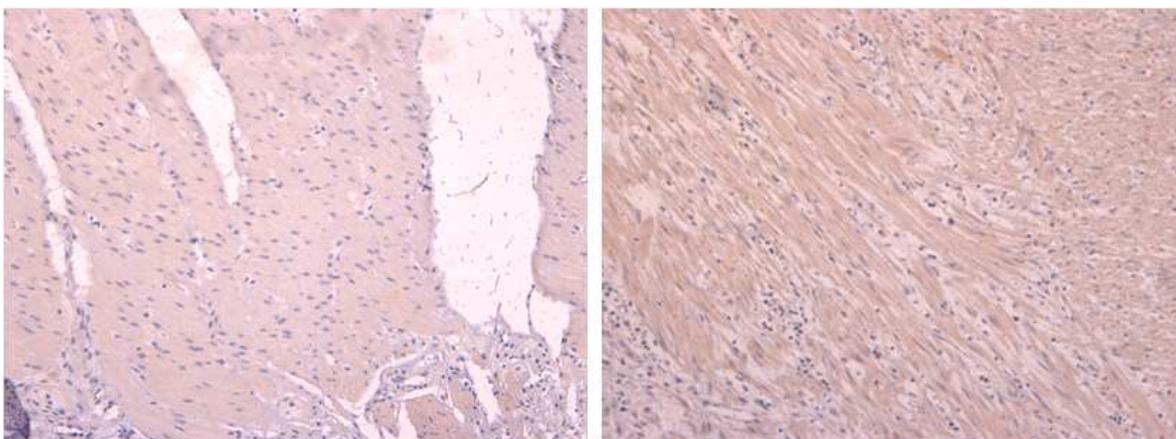
As análises imuno-histoquímicas utilizando anticorpo anti-TrkB não demonstraram diferenças significativas no tecido tumoral ou no tecido adjacente não tumoral em relação aos grupos de pacientes diagnosticados com câncer colorretal classificados de acordo com os critérios Amsterdam I e Bethesda, ou esporádico (Grupo Amsterdam I: 8% de expressão negativa X 92% de expressão positiva no tecido adjacente e 23% de expressão negativa X 77% de expressão positiva no tecido tumoral; grupo Bethesda: 13% de expressão negativa X 87% de expressão positiva no tecido adjacente e 27% de expressão negativa X 73% de expressão positiva no tecido tumoral; e grupo esporádico: 5% de expressão negativa X 95% de expressão positiva no tecido adjacente e 9% de expressão negativa X 91% de expressão positiva no tecido tumoral como mostrado no gráfico da figura 1 e nas fotos representativas na figura 1B).

Entretanto, a análise da expressão de GRPR no tecido adjacente não tumoral, nos mesmos grupos demonstrou um padrão de distribuição distinto no grupo Amsterdam I em relação aos demais (7% de expressão negativa X 93% de expressão positiva), como mostrado no gráfico da figura 1C e foto representativa na figura 1D. Os grupos Bethesda e esporádico tiveram distribuição uniforme (Bethesda: 44% negativo X 56% positivo; e esporádico: 24% negativo e 76% positivo). A avaliação de GRPR no tecido tumoral não apresentou diferenças significativas (Amsterdam I: 20% de expressão negativa X 80% de expressão positiva; grupo Bethesda: 33% de expressão negativa X 67% de expressão positiva e; grupo esporádico: 33% de expressão negativa X 67% de expressão positiva), como mostrado no gráfico da figura 1C e nas fotos representativas na figura 1E.

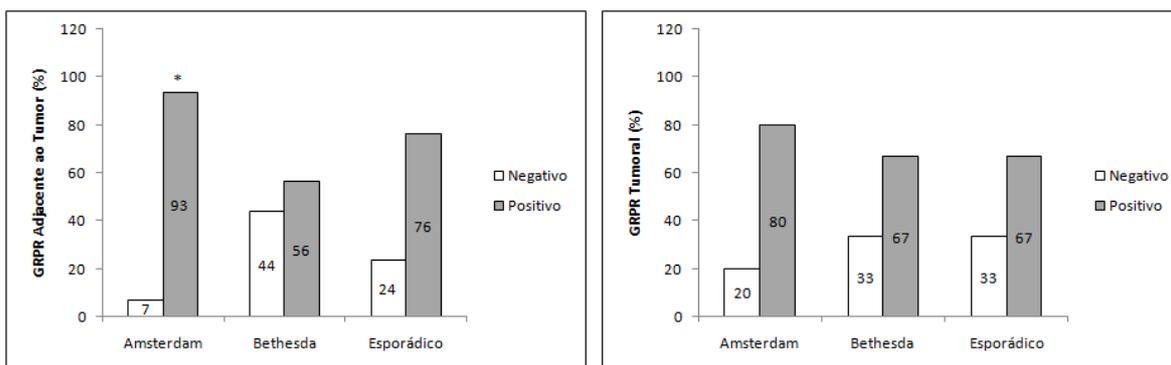
Figura 1A)



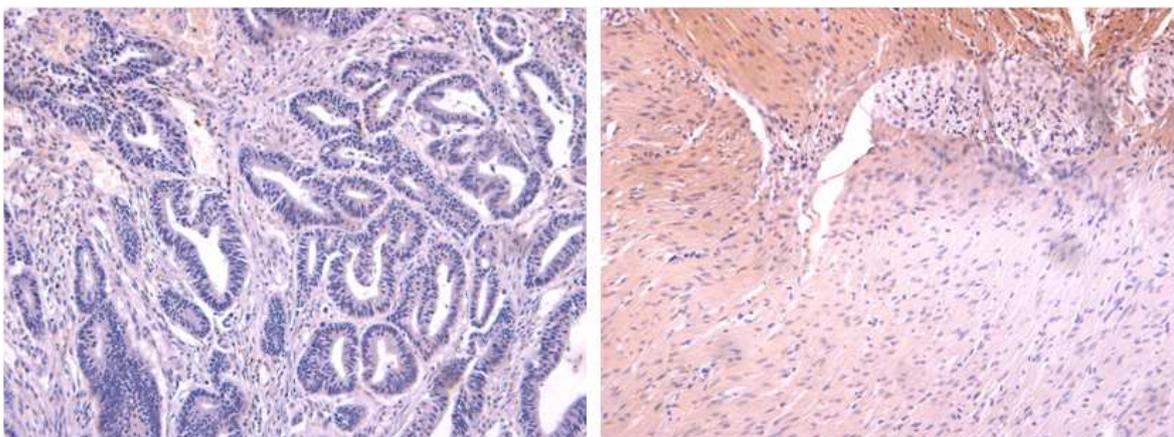
1B)



1C)



1D)



1E)

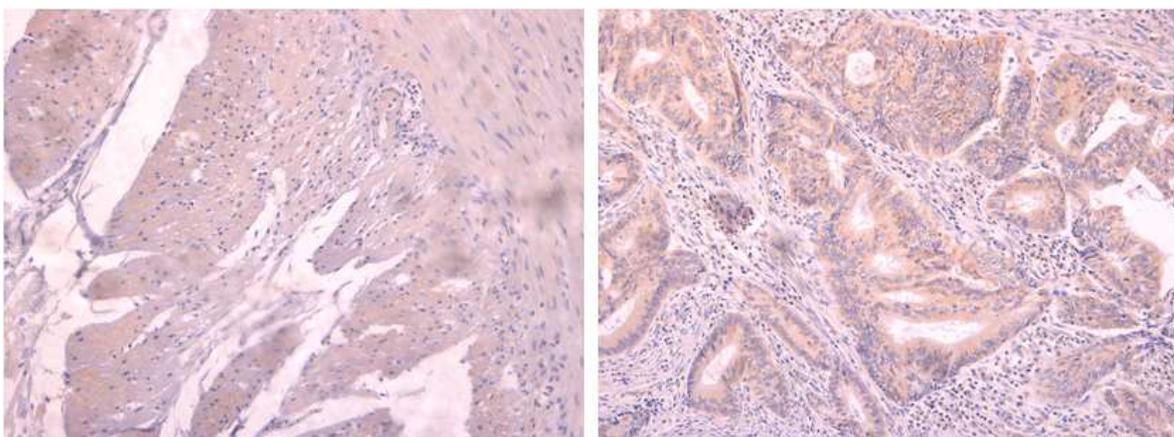


Figura 1: **A)** Porcentagem de expressão de TrkB no tecido adjacente não-tumoral e tecido tumoral nos grupos Amsterdam I, Bethesda e Esporádico. **B)** Foto representativa da expressão de TrkB nos grupos analisados. **C)** Porcentagem de expressão de GRPR no tecido adjacente não tumoral e tecido tumoral nos grupos Amsterdam I, Bethesda e Esporádico. **D)** Foto representativa da expressão de GRPR no grupo Amsterdam I. **E)** Foto representativa da expressão de GRPR nos grupos Bethesda e esporádico (100X).

5.4.2 Avaliação de critérios clínico-patológicos

Para avaliação dos critérios clínico-patológicos foram desconsideradas as classificações pelos critérios Amsterdam I, Bethesda ou câncer esporádico. Todas

as análises, a partir deste momento, serão denominadas de acordo com o tipo de tecido: adjacente não tumoral ou tumoral, levando-se em conta que todas as amostras são de câncer colorretal.

Não houve diferença significativa entre a expressão de TrkB e GRPR no tecido adjacente não tumoral (tabela 1) ou no tecido tumoral (tabela 2) em relação ao sexo, idade, metástase em linfonodos, metástase à distância, estadiamento da doença ou recidiva.

Variáveis	TRKB Positivo / Negativo	<i>p</i> (valor)	GRPR Positivo / Negativo	<i>p</i> (valor)
Sexo				
Masculino	21 / 9	0,160	18 / 10	0,582
Feminino	33 / 5		28 / 10	
Idade (anos)	47,5 (39,5 - 69) / 42,5 (35,75 - 53)	0,202	45 (37 - 67,25) / 50 (40,5 - 69)	0,534
Metástase em Linfonodos		1,000		0,118
Ausência				
Presença	25 / 3 32 / 3		18 / 12 29 / 7	
Metástase à Distância		1,000		0,834
Ausência	7 / 1		5 / 3	
Presença	49 / 5		41 / 15	
Estágio da Doença (Dukes)		0,729		0,087
Inicial				
Tardio	28 / 2 28 / 4		26 / 5 21 / 13	
Recidiva		1,000		0,082
Ausência	36 / 2		30 / 10	
Presença	15 / 1		8 / 9	

Relação entre a expressão de TrkB e GRPR e parâmetros clínico-patológicos no tecido não tumoral adjacente.

Tabela 1. Características clínico-patológicas de amostras de câncer colorretal e expressão de TrkB e GRPR por imuno-histoquímica no tecido adjacente não tumoral.

Variáveis	TRKB Positivo / Negativo	<i>p</i> (valor)	GRPR Positivo / Negativo	<i>p</i> (valor)
Sexo				
Masculino	21 / 9	0,160	18 / 10	0,582
Feminino	33 / 5		28 / 10	
Idade (anos)	47,5 (39,5 - 69) / 42,5 (35,75 - 53)	0,202	45 (37 - 67,25) / 50 (40,5 - 69)	0,534
Metástase em Linfonodos				
Ausência		0,750		0,683
Presença	26 / 5 28 / 8		18 / 10 26 / 10	
Metástase à Distância				
Ausência	7 / 1	0,838	5 / 3	0,968
Presença	44 / 12		38 / 16	
Estágio da Doença (Dukes)				
Inicial	24 / 7	0,807	23 / 8	0,468
Tardio	29 / 6		20 / 12	
Recidiva				
Ausência	34 / 8	0,891	30 / 10	0,291
Presença	12 / 4		9 / 7	

Relação entre a expressão de TrkB e GRPR e parâmetros clínico-patológicos em tecido tumoral.

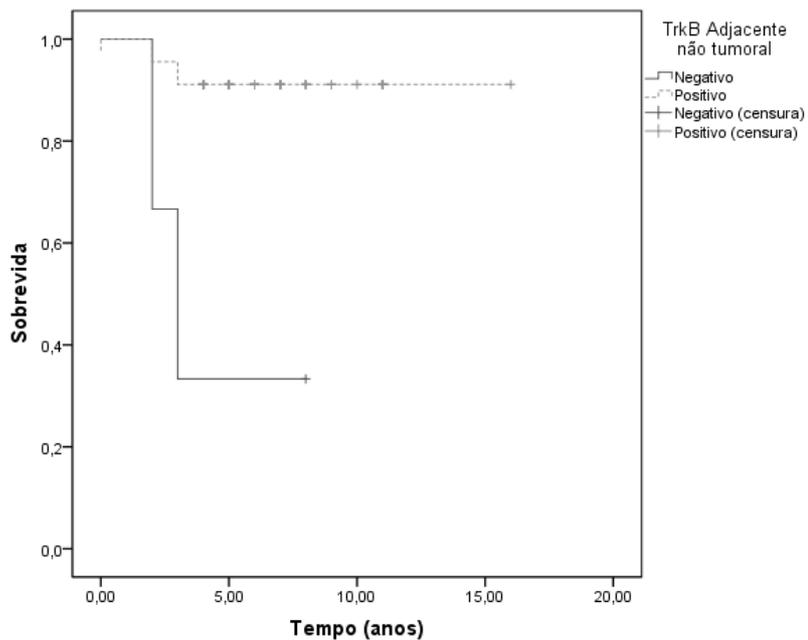
Tabela 2. Características clinicopatológicas de amostras de câncer colorretal e expressão de TrkB e GRPR por imuno-histoquímica no tecido tumoral.

5.4.3 Curva de sobrevida

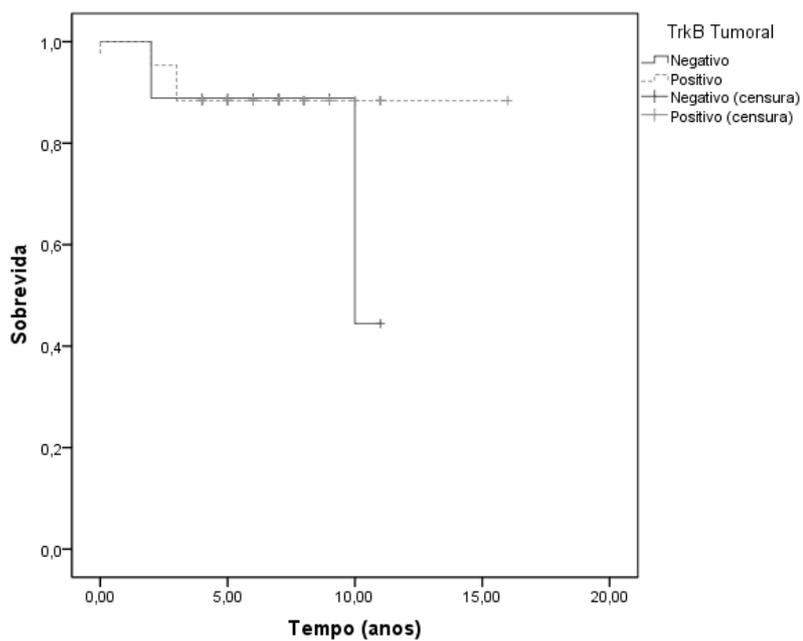
A expressão de TrkB e GRPR também foi associada a sobrevida global, onde considerou-se o tempo entre a data do diagnóstico até o *follow-up* ou data de óbito. Observou-se diferença significativa entre sobrevida global e expressão de TrkB no tecido adjacente não tumoral ($p=0,002$; figura 2A). Pacientes que não expressaram TrkB no tecido adjacente não tumoral tiveram pior prognóstico. A expressão de TrkB no tecido tumoral não apresentou diferenças significativas em relação ao mesmo parâmetro ($p=0,465$, figura 2B), assim como a expressão de

GRPR nos tecidos adjacente não tumoral ($p=0,806$, figura 2C) e tumoral ($p=0,823$, figura 2D).

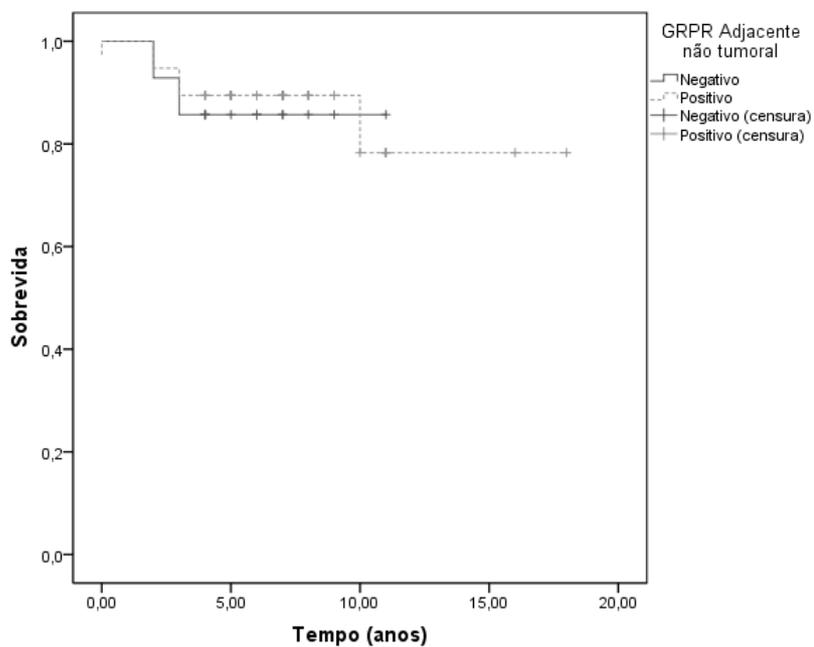
Figura 2A)



2B)



2C)



2D)

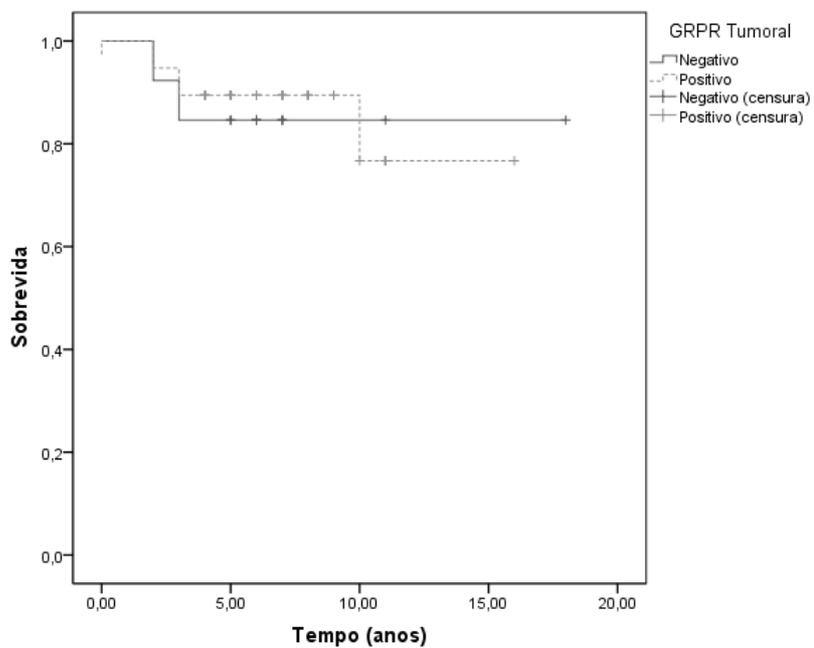


Figura 2: A) Curva de sobrevida global em relação à expressão de TrkB no tecido adjacente não tumoral (na população de pacientes que estão vivos, 40 expressaram TrkB e 1 não expressou, e

na população de pacientes que foram a óbito, 5 pacientes expressaram TrkB e 3 não expressaram). **B)** Curva de sobrevida global em relação à expressão de TrkB no tecido tumoral (na população de pacientes que estão vivos, 37 expressaram TrkB e 7 não expressaram, e na população de pacientes que foram a óbito, 5 pacientes expressaram TrkB e 3 não expressaram). **C)** Curva de sobrevida global em relação à expressão de GRPR no tecido adjacente não tumoral (na população de pacientes que estão vivos, 33 expressaram GRPR e 12 não expressaram, e na população de pacientes que foram a óbito, 5 pacientes expressaram GRPR e 3 não expressaram). **D)** Curva de sobrevida global em relação à expressão de GRPR no tecido tumoral (na população de pacientes que estão vivos, 33 expressaram GRPR e 12 não expressaram, e na população de pacientes que foram a óbito, 6 pacientes expressaram GRPR e 3 não expressaram).

5.4.4 Correlação entre TrkB e GRPR nos Tecidos Adjacente não Tumoral e Tumoral

A avaliação da correlação entre TrkB nos tecidos adjacente não tumoral e tumoral não apresentou diferença significativa, embora uma tendência tenha sido encontrada ($p=0,051$). A mesma correlação foi realizada para GRPR nos diferentes tipos de tecidos, mas não foi encontrada diferença entre eles ($p=0,374$). Foi realizada ainda, a correlação entre a expressão de TrkB e GRPR. Houve uma correlação entre TrkB e GRPR no tecido adjacente não tumoral ($p=0,000$), entretanto não houve correlação entre a expressão de TrkB e GRPR no tecido tumoral ($p=0,088$).

6 CAPÍTULO 4**BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target**

Situação: Publicado

Revista: Expert Reviews Anticancer Therapy

Ano de publicação: 2011

Volume: 11 (10)

Páginas: 1473 - 1475

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target

Expert Rev. Anticancer Ther. 11(10), 1473–1475 (2011)

Rafael Roesler

Author for correspondence:
University Hospital Research Center (CPE-HCPA),
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
Institute for Basic Health Sciences, Federal
University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto
Alegre, RS, Brazil
and
National Institute for Translational Medicine,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
Tel.: +55 513 308 3183
Fax: +55 513 308 3121
rafael.roesler@pq.cnpq.br

Caroline Brunetto de Farias

University Hospital Research Center (CPE-HCPA),
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology
Unit, Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Ana Lucia Abujamra

University Hospital Research Center (CPE-HCPA),
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology
Unit, Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Algemir Lunardi Brunetto

University Hospital Research Center (CPE-HCPA),
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology
Unit, Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Gilberto Schwartzmann

University Hospital Research Center (CPE-HCPA),
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology
Unit, Federal University of Rio Grande do Sul,
90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
and
School of Medicine, Federal University of Rio
Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

"...the function of neurotrophins and tropomyosin receptor kinases in cancer has been largely characterized in neural tumors, particularly neuroblastoma."

Several examples of molecularly targeted anticancer therapies successfully translated from the laboratory bench to the clinical setting, including imatinib, gefitinib, trastuzumab, erlotinib and cetuximab, illustrate the potential therapeutic usefulness of targeting growth factors or their cell surface receptors. Among growth factor signaling pathways, neurotrophins and their receptors represent emerging targets for the development of novel anticancer therapies. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a prototypical member of the neurotrophin family of growth factors, was first identified and isolated from pig brains by Ivens Barde and colleagues in the early 1980s, and cloned by the same group in 1989 (for a recent review, see [1]). In 1991, BDNF was identified as a ligand for TrkB, a member of the tropomyosin receptor kinase (Trk) family of cell membrane receptors. Trks are receptor tyrosine kinases activated by neurotrophins and other growth factors. TrkA, TrkB and TrkC are the preferred receptors for the neurotrophins NGF, BDNF and neurotrophin-3 (NT-3), respectively [1,2]. Trk was first identified by Dionisio Martin-Zanca and colleagues as an oncogene, present in a human colon carcinoma and capable of mediating transformation of fibroblasts (reviewed in [3]), and several research laboratories have since focused on examining the role of Trks in cancer. Still, over the years, neurotrophins and Trks have been characterized primarily in the field of neurobiology as molecules involved in CNS development, neuronal survival and synaptic plasticity, while their role in cancer has remained relatively less explored.

To date, the function of neurotrophins and Trks in cancer has been largely characterized in neural tumors, particularly neuroblastoma. High levels of TrkA and TrkC expression in neuroblastoma are associated with better prognosis, whereas BDNF and TrkB are preferentially expressed in aggressive tumors, and increased BDNF/TrkB signaling in neuroblastoma cells might represent an autocrine system to promote tumor growth, invasion and metastasis. In addition, TrkB activation by BDNF promotes resistance to chemotherapy in neuroblastoma cells through a mechanism mediated by PI3K and Akt (see [3–5] for reviews). A recent study showed that, in neuroblastoma cells with high TrkB expression, treatment with BDNF protected from etoposide-induced cell death *in vitro*, and neuroblastomas with high TrkB expression were less sensitive to etoposide treatment *in vivo* than tumors with low TrkB expression in a xenograft mouse model [6]. In medulloblastoma, a neural tumor that is the most common brain cancer of childhood, TrkC expression correlates with a better response to therapy, while TrkB probably promotes cell survival (reviewed in [5]). However, we have recently found that, at least in some human medulloblastoma cell lines, human recombinant BDNF decreases cell viability, suggesting that stimulation of BDNF/TrkB signaling might also inhibit medulloblastoma growth [7].

Recent evidence for a role of BDNF/TrkB in cancer has also come from studies on non-neurogenic tumors [3–5]. For example, human lung adenocarcinomas have been shown to express TrkB, and treating A549

EXPERT
REVIEWS

lung adenocarcinoma cells with BDNF stimulated the prosurvival Akt pathway, while the Trk inhibitor K252a inhibited cell growth and induced apoptotic cell death [8]. *TrkB* mutations have been identified in non-small-cell lung cancer; however, these mutations did not result in enhanced cell transformation and migration [9]. Both BDNF and TrkB are overexpressed in human bladder cancer specimens [10], and BDNF enhanced cell proliferation and survival [11], whereas a TrkB antibody induced cytotoxicity and suppressed migration and invasion, in transitional cell carcinoma cells [12]. Two recent studies have also suggested a role for BDNF/TrkB signaling in breast cancer. Expression of BDNF and TrkB was detected in breast cancer cell lines and tumor specimens. BDNF induced resistance to apoptosis in breast cancer cells, while injection of an anti-BDNF antibody reduced the growth of breast tumors xenografted in immunodeficient mice [13]. BDNF expression was shown to be higher in breast cancer samples compared with normal tissue, and higher levels of BDNF transcripts were significantly associated with unfavorable pathological parameters and adverse clinical outcomes including poor prognosis and death from breast cancer [14]. The expression of BDNF and TrkB mRNA was also higher in human cervical cancer cell lines and squamous cell carcinoma of the uterine cervix than in normal tissues, and was related to clinicopathological parameters related to early-stage squamous cell carcinoma [15]. Other solid tumors in which TrkB expression is elevated and might be associated with a poorer disease outcome include Wilm's tumor, ovarian cancer and pancreatic ductal adenocarcinoma (reviewed in [4]).

“Brain-derived neurotrophic factor expression was shown to be higher in breast cancer samples compared with normal tissue, and higher levels of brain-derived neurotrophic factor transcripts were significantly associated with unfavorable pathological parameters and adverse clinical outcomes including poor prognosis and death from breast cancer.”

Cancer types in which BDNF/TrkB signaling possibly plays a stimulatory role also include gastrointestinal and hepatic tumors. For example, high mRNA and protein levels of BDNF were associated with the development and recurrence of tumors in a rat model of hepatocellular carcinoma, and treatment with BDNF promoted hepatocellular carcinoma cell proliferation [16]. In human colorectal cancer, two different sites of the TrkB kinase domain (TRKB^{T695I} and TRKB^{D751N}) have been found to be mutated [17], although the functional significance of these mutations remains unclear [18]. We have recently found that BDNF and TrkB were expressed in samples of sporadic colorectal adenocarcinoma, and BDNF protein levels were higher in colorectal tumor samples compared with non-neoplastic adjacent tissue. We went on to investigate the function of BDNF/TrkB in colorectal cancer cells. Treating human HT-29 cells with human recombinant BDNF prevented the antiproliferative effect of RC-3095, a synthetic peptide with anti-tumor activity that acts by blocking

gastrin-releasing peptide receptors. Conversely, treatment with K252a resulted in a dose-dependent decrease in proliferation. Moreover, HT-29 cells showed an increase in both BDNF mRNA expression and BDNF protein secretion in response to treatment with RC-3095. This increase, which was likely mediated by a mechanism requiring EGF receptors, was associated with resistance to RC-3095-induced reduction of cell survival. These findings suggest that increased BDNF/TrkB may play a role in the progression of colorectal cancer and contribute to resistance to anti-tumor agents targeting other growth factor receptors [19]. This possibility should be further investigated.

“...small-molecule compounds that act as tropomyosin receptor kinase-B antagonists, or monoclonal antibodies against either brain-derived neurotrophic factor or tropomyosin receptor kinase-B, could be developed as promising novel therapies for the treatment of some types of cancer.”

At the cellular level, the pro-oncogenic actions of TrkB may involve a variety of mechanisms, including downstream activation of protein kinase pathways that are established targets in cancer, such as PI3K, MAPK and PKC [1-5]. TrkB has been shown to suppress anoikis (apoptosis resulting from loss of cell-matrix interactions) through a mechanism dependent on PI3K/Akt in nonmalignant epithelial cells, an effect associated with the formation of rapidly growing and invasive tumors in mice (reviewed in [4]). One possibility that should be further explored is that BDNF/TrkB signaling stimulates angiogenesis. Recent evidence supporting this possibility includes the findings by Lam *et al.* that endothelial cells overexpressing BDNF contributed to tumor angiogenesis and growth in a mouse model of liver cancer [20].

Taken together, the evidence suggests that small-molecule compounds that act as TrkB antagonists, or monoclonal antibodies against either BDNF or TrkB, could be developed as promising novel therapies for the treatment of some types of cancer. Phase I clinical trials of Trk inhibitors have already been carried out, and Phase II trials are currently underway [3,4]. However, further understanding of the role of BDNF/TrkB in cancer, as well as of the effects of pharmacological blockade of BDNF signaling, is clearly needed. Although Phase I trials of Trk inhibitors have suggested that they were well tolerated, given the crucial roles of BDNF in normal nervous system function, it remains to be established whether blocking this pathway in an individual would be clinically acceptable. On the biological aspect, it will be crucial to understand how TrkB cross-talks with other growth factor receptors and interacts with downstream protein kinase pathways in regulating cell proliferation and transformation. As BDNF/TrkB signaling is one among many examples of molecular links between cancer progression and neural development and plasticity, studies on BDNF biology in the normal nervous system will contribute to elucidate its role in cancer.

Financial & competing interests disclosure

The authors are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CONPq; grant number 303703/2009-1 to Rafael Roesler), the National Institute for Translational Medicine, the South American Office for Anticancer Drug Development and the Children's

Cancer Institute. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

- Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev. Neurobiol.* 70, 304–322 (2010).
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642 (2003).
- Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk – the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin. Cancer Res.* 15, 5962–5967 (2009).
- Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 755–759 (2006).
- Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 169, 107–114 (2001).
- Li Z, Oh DY, Nakamura K, Thiele CJ. Perifosine-induced inhibition of AKT attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma *in vivo*. *Cancer* DOI: 10.1002/cncr.26133 (2011) (Epub ahead of print).
- Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL *et al*. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J. Mol. Neurosci.* 40, 303–310 (2010).
- Perez-Pinera P, Hernandez T, García-Suárez O *et al*. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol. Cell Biochem.* 295, 19–26 (2007).
- Harada T, Yatabe Y, Takeshita M *et al*. Role and relevance of *TrkB* mutations and expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 2638–2645 (2011).
- Lai PC, Chiu TH, Huang YT. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol. Rep.* 24, 1265–1270 (2010).
- Huang YT, Lai PC, Wu CC *et al*. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 36, 1469–1476 (2010).
- Huang YT, Lai PC, Wu CC, Cheng CC, Chiu TH. TrkB antibody elicits cytotoxicity and suppresses migration/invasion of transitional cell carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 37, 943–949 (2010).
- Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S *et al*. 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, 1741–1752 (2011).
- Patani N, Jiang WG, Mokbel K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell. Int.* 11(1), 23 (2011).
- Moon A, Won KY, Lee JY, Kang I, Lee SK, Lee J. Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology* 43, 453–458 (2011).
- Yang ZF, Ho DW, Lam CT *et al*. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 65, 219–225 (2005).
- Bardelli A, Parsons DW, Silliman N *et al*. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 300, 949 (2003).
- Geiger TR, Song JY, Rosado A, Peeper DS. Functional characterization of human cancer-derived *TrkB* mutations. *PLoS One* 6, e16871 (2011).
- de Farias CB, Rosemberg DB, Heinen TE *et al*. BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 79, 430–439 (2010).
- Lam CT, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, Fan ST, Poon RT. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 3123–3133 (2011).

7 DISCUSSÃO

Receptores Tirosina Quinase (RTKs) são proteínas de superfície celular que constituem importantes alvos antitumorais. Após a ativação de fatores de crescimento, RTKs estimulam vias intracelulares que controlam a sobrevivência e proliferação celular (KRAUSE & VAN ETTEN, 2005). Receptores Tropomiosina Quinase constituem uma família de RTKs ativados por neurotrofinas. TrkA, TrkB e TrkC são, respectivamente, os receptores para NGF, BDNF, NT 4/5 e NT-3 (BARBACID, 1994).

As funções biológicas da sinalização de neurotrofinas, principalmente, BDNF / TrkB, foram primeiramente caracterizadas no sistema nervoso central, onde a secreção de BDNF a partir de neurônios é conhecida por ser essencial tanto para a formação de conexões sinápticas quanto para a plasticidade neuronal (YOSHI & CONSTANTINE-PATON, 2010). Mais recentemente, algumas evidências têm indicado que a sinalização ativada por neurotrofinas e seus receptores também pode desempenhar um papel importante na proliferação e sobrevivência de células tumorais, metástases e mecanismos de resistência à quimioterapia, emergindo como um novo alvo terapêutico em diferentes tipos de câncer.

Mecanismos que regulam a expressão e secreção de BDNF incluem a sinalização de GPCRs e fatores de transcrição (HUTCHINSON *et al.*, 2009). GPCRs desempenham um papel crucial no crescimento tumoral e representam importantes alvos para o desenvolvimento de drogas anticâncer (DORSAM & GUTKIND, 2007).

Dentre a superfamília de GPCRs está o receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR), cujo principal ligante em mamíferos é o GRP, um neuropeptídeo da família da Bombesina. GRPR é profuso em uma gama de cânceres humanos e desempenha papel fundamental na proliferação de células cancerosas (CORNELIO *et al.*, 2007). E, por isso, antagonistas de GRPR, tal como RC-3095 e RC-3940 II têm sido desenvolvidos como potenciais agentes anticancerígenos (HOHLA & SCHALLY, 2010).

Recentemente mostramos que o RC-3095 aumentou os níveis de NGF na linhagem celular de câncer colorretal, HT-29 (FARIAS *et al.*, 2009; apêndice 1), entretanto relações entre GRPR e neurotrofinas ainda precisavam ser melhores estudadas nesta neoplasia. Aliás, embora mutações do gene TrkB tenham sido relatadas em câncer colorretal (BARDELLI *et al.*, 2003; DESMET & PEEPER, 2006), estudos anteriores não haviam analisado a expressão e função de TrkB e BDNF em linhagens celulares de câncer colorretal ou em amostras de tumores humanos.

A possível interação entre a sinalização de GRPR e BDNF / TrkB em câncer colorretal foi pela primeira vez investigada pelo nosso grupo (FARIAS *et al.*, 2011, Capítulo 1), onde avaliamos a expressão de BDNF e TrkB em amostras de pacientes diagnosticados com câncer colorretal bem como em linhagens celulares humanas deste tumor. Vimos que os níveis de BDNF foram superiores em amostras tumorais quando comparadas ao tecido não neoplásico dos mesmos pacientes. Tal constatação sugere que BDNF possa atuar como um fator de crescimento envolvido na progressão de câncer colorretal e que este mecanismo possa ainda interferir com resistência aos tratamentos.

Neste estudo verificamos também que o tratamento com o antagonista de GRPR, RC-3095, aumentou a expressão e secreção de BDNF na linhagem celular de câncer colorretal, HT-29. Este aumento foi visto apenas na concentração intermediária de RC-3095 (1 nM), enquanto que outras doses de RC-3095 (0,001 e 1000 nM) não apresentaram tal resultado. Efeitos similares de dose-resposta usando RC-3095 em células tumorais têm sido observados em estudos anteriores (CASANUEVA *et al.*, 1996; FLORES *et al.*, 2008). Cabe ressaltar, que o RC-3095 na dose de 1 nM também não foi capaz de reduzir a sobrevivência celular, quando avaliado pelo ensaio Clonogênico, diferentemente das demais doses analisadas (RC-3095 0,001 e 1000 nM), indicando que BDNF possa interferir em mecanismos de proteção tumoral.

No presente estudo, BDNF sozinho não apresentou nenhum efeito sobre as células, todavia, o efeito inibitório de RC-3095 sobre a proliferação de HT-29 foi prevenido pelo cotratamento com BDNF, sugerindo que BDNF haja de forma mais pronunciada em condições onde a proliferação ou a viabilidade celular estejam sendo afetadas.

Consistente com a possibilidade de que a ativação de TrkB através de BDNF esteja relacionada a proliferação celular, o tratamento com um inibidor de Trks, K252a, reduziu de forma significativa o número de células quando comparado ao controle não tratado.

Akil e colaboradores (2011) também demonstraram que K252a suprimiu proliferação e sobrevivência de células de câncer colorretal, enquanto BDNF induziu proliferação celular. Além disso, evidenciaram que BDNF era sintetizado

em condições de estresse nestas células e que havia superexpressão de TrkB nesta neoplasia.

Corroborando com nossos resultados, experimentos *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer colorretal (Caco-2, DLD1, HT-29 e SW480), demonstraram que a inibição de TrkB diminuiu migração, invasão e proliferação celular (FUJIKAWA *et al.*, 2012).

Além disso, em nosso trabalho, houve um aumento na expressão de mRNA de BDNF induzido por RC-3095, em células HT-29, mas não em SW-620. A linhagem celular de câncer colorretal humana, SW-620 é EGFR-negativa enquanto que HT-29 é EGFR-positiva. Por isso, avaliamos o papel de um anticorpo monoclonal anti-EGFR, cetuximabe, sobre a expressão de mRNA de BDNF sozinho ou combinado com RC-3095 em HT-29. Vimos que o cetuximabe foi capaz de prevenir o aumento da expressão de mRNA induzido por RC-3095, sugerindo que esse efeito seja mediado por EGFR.

Nossos resultados demonstrando que BDNF previne, e que o antagonista de Trks, K252a, mimetiza o efeito antiproliferativo de RC-3095, sugerem que a inibição da proliferação celular *in vitro* ou do crescimento tumoral *in vivo* devem acontecer através do bloqueio combinado entre GRPR e TrkB. Além disso, nossos resultados indicam que BDNF pode participar de mecanismos de resistência tumoral.

Baseado nisso, propomos um modelo de interação entre o bloqueio de GRPR e a sinalização de BDNF em células EGFR positivas em câncer colorretal.

De fato, na última década tem sido demonstrado que GPCRs são capazes de utilizar tanto o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) quanto seu receptor

(EGFR) como sinalização intermediária para regular o crescimento, diferenciação e migração celular. Neste contexto, a ativação de GPCR gera uma liberação subsequente de membros da família de EGF ou ativação de EGFR de maneira autócrina ou parácrina, em uma variedade de tipos celulares, incluindo câncer. E por isso, a transativação de EGFR tem emergido como um novo alvo terapêutico (LIEBMANN, 2011).

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço há superexpressão de EGFR, porém a monoterapia contra EGFR não tem demonstrado efeitos antitumorais significativos. Entretanto, os efeitos combinados com um antagonista de GRPR a um inibidor de EGFR demonstraram um efeito antitumoral mais pronunciado neste tipo de tumor (ZHANG *et al.*, 2007).

Além disso, muitos estudos tem abordado ao longo dos anos, o papel de Bombesina / GRP com EGF em muitos tipos tumorais, mostrando que Bombesina estimula o crescimento tumoral pela amplificação da fosforilação de EGFR (LIEBOW *et al.*, 1994), assim como em células de câncer de pulmão, onde GRP induziu a ativação de EGFR (THOMAS *et al.*, 2005) e, Neuromedina B (NMB) também causou transativação a EGFR (MOODY *et al.*, 2010).

Os nossos resultados forneceram a primeira evidência de que BDNF / TrkB possa desempenhar um papel na progressão de câncer colorretal e esteja envolvido em mecanismos de resistência a drogas antitumorais atuando em conjunto a GPCRs.

Nos últimos anos os estudos concentraram-se em caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na resistência adquirida ao tratamento com anticorpos monoclonais anti-EGFR. Em câncer colorretal, estes mecanismos

incluem mutações em KRAS e BRAF que podem compensar o bloqueio de EGFR, através do estímulo de MAPK (BARDELLI & JÄNNE, 2012). Mas é provável que tal resistência também possa ser mediada por RTKs, como por exemplo, HER2 (BERTOTTI *et al.*, 2011).

A identificação dos mecanismos adicionais de resistência pode revelar novos caminhos para aumentar a efetividade de inibidores de EGFR, e fornecem uma base racional para a investigação de combinações de agentes inibindo BDNF / TrkB em conjunto com um inibidor de EGFR, cetuximabe (capítulo 2).

Investigamos então a expressão de mRNA de BDNF e TrkB após 10 h de tratamento com cetuximabe. Vimos que a dose de cetuximabe capaz de inibir a proliferação das células HT-29 (10 nM) reduziu cerca de 50 % as expressões de mRNA de BDNF e TrkB, enquanto que a dose de cetuximabe 0,1 nM não demonstrou o mesmo resultado, sugerindo que o efeito inibitório de cetuximabe em células de câncer colorretal possivelmente envolva a inibição de BDNF / TrkB.

Outros estudos haviam evidenciado que níveis elevados de BDNF aumentam a sobrevivência de células de neuroblastoma sob condições de redução de fatores de crescimento ou sob a exposição a agentes citotóxicos (NAKAGAWARA, *et al.*, 2001; THIELE *et al.*, 2009). Assim como demonstrado em feocromocitomas, onde células que expressaram apenas TrkA apresentaram resistência à Doxorubicina e Cisplatina *in vivo*, mas células que coexpressaram TrkA e p75^{NTR} demonstraram maior sensibilidade ao tratamento (BASSILI *et al.*, 2010).

Em nosso trabalho avaliamos ainda a adição de BDNF humano recombinante (10 ng / ml) a cetuximabe em células HT-29, e identificamos que

BDNF não só foi capaz de bloquear o efeito induzido por cetuximabe (10 nM) quanto também foi capaz de induzir proliferação celular, quando avaliado pelas técnicas de contagem celular por exclusão com azul de Tripán, MTT ou ensaio clonogênico. Os resultados evidenciam que BDNF protege as células de câncer colorretal dos efeitos inibitórios de cetuximabe.

Com os achados anteriores que reforçaram a ideia de que haja uma relação entre EGFR e Trks, examinamos se o bloqueio de TrkB poderia potencializar o efeito de cetuximabe. Para tanto, as células HT-29 foram tratadas com uma dose não efetiva de cetuximabe (0,1 nM) ou uma dose ineficaz de um inibidor não seletivo de Trks, K252a (10 nM) ou ambos, seguido pela adição de BDNF (10 ng / ml), através da técnica de MTT. Cetuximabe ou K252a isolados não afetaram a proliferação celular, porém quando administrados em combinação reduziram a proliferação celular. Entretanto, este efeito foi completamente abolido pela adição de BDNF, que por si só não afetou a proliferação. Este resultado sugere que a inibição de TrkB pode potencializar o efeito inibitório de cetuximabe em câncer colorretal.

Nossos resultados forneceram a primeira evidência de que a resistência a cetuximabe em câncer colorretal, pode estar relacionada com a sinalização BDNF / TrkB / EGFR, sugerindo que BDNF / TrkB possa se tornar um potente agente antitumoral, assim como muitos alvos moleculares que emergiram de estudos laboratoriais, incluindo imatinibe, gefitinibe, trastuzumabe e cetuximabe, que ilustram a potencialidade terapêutica de fatores de crescimento e seus receptores.

Em neuroblastoma, mecanismos de quimioresistência e aumento na expressão de BDNF e TrkB são marcadores de pior prognóstico. Nesta neoplasia,

BDNF protegeu as células do tratamento com Etoposide *in vitro*, assim como tumores que superexpressavam TrkB foram menos sensíveis ao tratamento com Etoposide *in vivo* (LI *et al.*, 2011). Além disso, as vias de MAPK e PI3K estiveram envolvidas na proteção de BDNF contra a morte celular induzida por Paclitaxel, enquanto que PI3K predominantemente mediou a proteção de BDNF ao tratamento com Etoposide e Cisplatina em células de neuroblastoma, indicando que diferentes quimioterápicos induzem vias de sinalização distintas e utilizam diferentes fatores de crescimento para modular efeitos de quimioterapia (LI *et al.*, 2007).

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, houve um aumento da regulação de BDNF / TrkB, e a estimulação de BDNF exógeno levou a um aumento da expressão de proteínas envolvidas em mecanismos anti-apoptóticos e de resistência a fármacos (LEE *et al.*, 2012).

Estas evidências sugerem que compostos de pequenas moléculas que atuem como antagonistas de TrkB, ou anticorpos monoclonais contra BDNF ou TrkB, poderiam ser desenvolvidas como promissores novos alvos para o tratamento de alguns tipos de câncer. Ensaios clínicos de fase I utilizando inibidores Trk já foram realizados, e ensaios de fase II estão atualmente em andamento (DESMET & PEEPER, 2006; THIELE *et al.*, 2009).

Embora muito se falasse de uma possível dificuldade de administração de inibidores de neurotrofinas em pacientes, devido às inúmeras funções que esta família de fatores de crescimento desempenha, principalmente na plasticidade e sobrevivência de neurônios, os ensaios clínicos de fase I demonstram que os

inibidores Trks foram bem tolerados, e não causaram mudanças neuronais e cognitivas nos indivíduos (HONDERMARCK, 2012).

Uma gama de compostos anti neurotrofinas e seus receptores, como por exemplo, tanezumab, anti-NGF da Pfizer ou lestaurtinibe, anti-Trks da Cephalon tem sido desenvolvidos e testados, e parecem emergir como promissoras drogas analgésicas e terapêuticas (HONDERMARCK, 2012). No entanto, é necessária uma melhor compreensão do papel do BDNF / TrkB em câncer, bem como seus efeitos farmacológicos (ROESLER *et al.*, 2011).

Além disso, HONDERMARCK (2012) sugere uma potencial aplicação clínica de neurotrofinas e seus receptores como biomarcadores diagnósticos e prognósticos em câncer de mama, onde há superexpressão de neurotrofinas no tecido tumoral, mas não no tecido sem alterações.

Sendo assim, a avaliação de TrkB e também de GRPR, e uma possível correlação entre estes receptores, em pacientes com câncer colorretal esporádico e hereditário, tornou-se importante. Nossos resultados (capítulo 3) não demonstraram diferenças cruciais entre os grupos Amsterdam I, Bethesda e grupo esporádico. Além disso, a expressão de TrkB ou GRPR nos tecidos adjacente não neoplásico e tumoral não apresentaram relações com os aspectos clínico-patológicos. Isso pode ter ocorrido devido ao número amostral utilizado para a realização do estudo, onde apenas 67 amostras foram analisadas. Entretanto, observamos diferença significativa entre sobrevida global e expressão de TrkB no tecido adjacente não tumoral, onde os pacientes que não expressaram TrkB tiveram pior prognóstico.

Foi realizada neste estudo ainda, a análise da correlação entre a expressão de TrkB e GRPR, onde encontramos uma correlação positiva entre TrkB e GRPR no tecido adjacente não tumoral mas não no tecido tumoral. Tal dado pode indicar que um desequilíbrio no tecido tumoral entre a expressão de TrkB e GRPR possa ser fundamental para o início e desenvolvimento da neoplasia. Portanto, pretendemos investigar a expressão de TrkB e GRPR em uma população maior de pacientes com câncer colorretal.

Fujikawa e colegas (2012) investigaram também, a associação da expressão de receptores Trks com aspectos clínicos de pacientes com câncer colorretal, avaliando a participação de moléculas de transição epitélio-mesenquimal (E-caderina). Relataram que altos níveis de TrkB estiveram relacionados a piores prognósticos em contraste a pacientes com baixos níveis de TrkB (avaliação realizada em 102 amostras pelas técnicas de imunohistoquímica e PCR). E encontraram ainda, uma correlação inversa entre os níveis de E-caderina e a expressão protéica e de mRNA de TrkB.

Nossos resultados em câncer colorretal, até o presente momento, indicam que BDNF / TrkB estão associados à proliferação, viabilidade e sobrevivência tumoral, assim como em mecanismos de resistência ao tratamento de cetuximabe. Por isso, anticorpos contra BDNF / TrkB podem representar uma nova estratégia ao tratamento desta neoplasia.

8 CONCLUSÕES

- BDNF e TrkB são expressos em amostras de câncer colorretal e em linhagens celulares;
- Tecidos de câncer colorretal apresentaram níveis mais elevados de BDNF em relação aos tecidos adjacentes não-neoplásicos dos mesmos pacientes;
- Expressão e secreção de BDNF aumentaram em resposta ao bloqueio de GRPR em linhagens celulares de câncer colorretal;
- RC-3095 inibiu a proliferação celular de HT-29, e este efeito foi prevenido pelo cotratamento com BDNF;
- RC-3095 aumentou a expressão de mRNA de BDNF, e este efeito foi prevenido por cetuximabe apenas em células EGFR-positivas;
- O tratamento com K252a diminuiu a proliferação celular;
- RC-3095 não afetou a secreção de BDNF de células EGFR-negativas (SW-620);
- RC-3095 pode inibir a sinalização celular de GRPR e levar a um aumento da expressão e secreção de BDNF por um mecanismo dependente de EGFR;
- O tratamento com cetuximabe reduziu a expressão de mRNA de BDNF e TrkB na linhagem celular de HT-29;

- BDNF protegeu os efeitos antitumorais de cetuximabe em células HT-29;
- Cetuximabe combinado a K252a inibiu sinergicamente a proliferação celular de HT-29;
- Pacientes que não expressaram TrkB no tecido adjacente não tumoral tiveram pior prognóstico, em relação a análise de sobrevida global;
- Houve correlação positiva entre TrkB e GRPR no tecido adjacente não tumoral, entretanto não observou-se esta correlação entre a expressão de TrkB e GRPR no tecido tumoral de pacientes com câncer colorretal;
- E, RC-3095 aumentou os níveis de NGF em células HT-29.

9 PERSPECTIVAS

O presente trabalho impulsiona a continuidade de estudos do papel de neurotrofinas em câncer colorretal, buscando uma possível aplicação translacional destes achados no futuro.

Como perspectivas desta linha de pesquisa, pretendemos avaliar a interação de BDNF/TrkB ao Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF da sigla em inglês de Vascular Endothelial Growth Factor), pois estudos recentes sugerem que a estimulação de angiogênese pode ser importante para a sinalização de neoplasias. Lam e colegas (2011) demonstraram que células endoteliais que superexpressavam BDNF tiveram maior capacidade de angiogênese tumoral. Além disso, em câncer de ovário, NGF aumentou a expressão de VEGF, sugerindo que o bloqueio de neurotrofinas possa ter valor clínico neste tipo de neoplasia (CAMPOS *et al.*, 2007).

Para o melhor entendimento da biologia de câncer colorretal, torna-se fundamental o estudo da interação de BDNF/TrkB a fármacos com mecanismos de ação distintos. Por exemplo, sabe-se que enquanto cetuximabe bloqueia a ligação de EGF ao seu receptor, impedindo a ativação da cascata de sinalização celular, oxaliplatina é um agente alquilante, que impede a síntese de DNA. Por isso, pretendemos avaliar o papel de neurotrofinas a oxaliplatina.

Além disso, a função de células-tronco tumorais tem sido cada vez mais investigada. Geralmente, estas células exibem maior capacidade de proliferação, maior potencial de diferenciação e especialmente, maior habilidade de tumorigênese, além de possuírem quiescência relativa e maior resistência a

fármacos e radioterapia (WILLIAMS 2012). Algumas destas características foram demonstradas em nossos estudos através da sinalização de BDNF/TrkB, indicando um racional para avaliação de neurotrofinas em células tronco tumorais, tanto de linhagens celulares quanto em células isoladas a partir de biópsias de pacientes diagnosticados com câncer colorretal. Onde, ainda, o silenciamento de BDNF pode representar uma ferramenta terapêutica útil para estes tumores.

Cabe ressaltar, que nossos resultados forneceram evidências para submissão de dois pedidos de patentes ao INPI e que ao longo do desenvolvimento deste trabalho a autora, juntamente com outras duas sócias, fundou a empresa Ziel Biosciences, atualmente situada na Incubadora Empresarial do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o intuito de desenvolver produtos inovadores na área de oncologia.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIL, H.; PERRAUD, A.; MÉLIN, C.; JAUBERTEAU, M. & MATHONNET, M. Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, trkB and sortilin in colorectal cancer cells survival. *Plos One*, 6 (9): e25097, 2011.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre: *Artes Médicas*, 1997.

ALTONEN, L. A.; SALOVAARA, R.; KRISTO, P.; CANZIAN, F.; HEMMINKI, A.; PELTOMÄKI, P.; CHADWICK, R. B.; KÄÄRIÄINEN, H.; ESKELINEN, M.; JÄRVINEN, H.; MECKLIN, J. P. & de la CHAPELLI, A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*, 338: 1481–1487, 1998.

AMADO, R. G.; WOLF, M.; PEETERS, M.; VAN CUTSEM, E.; SIENA, S.; FREEMAN, D. J.; JUAN, T.; SIKORSKI, R.; SUGGS, S.; RADINSKY, R.; PATTERSON, S. D. & CHANG, D. D. Wild-type *KRAS* is required for Panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26 (10): 1626-1634, 2008.

ANG, C. S & NICE, E. C. Targeted in-gel MRM: a hypothesis driven approach for colorectal cancer biomarker discovery in human feces. *J Proteome Res*, 9: 4346–4355, 2010.

ANG, C.; PHUNG, J.; NICE, E. C. The discovery and validation of colorectal cancer biomarkers. *Biomed Chromatogr*, 25: 82–99, 2011.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European anfybians *Bombina* and *Alytes Experientia*, 27: 166-167, 1971.

ANTON, E. S.; WESKAMP, G.; REICHARDT, L. F. & MATTHEW, W. D. Nerve growth factor and its receptor low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 2795-2799, 1994.

ASTOLFI, A.; NANNI, P.; LANDUZZE, L.; RICCI, C.; NICOLETTI, G.; ROSSI, I.; LOLLINI, P. L. & DE GIOVANNI, C. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer*, 37: 1719-1725, 2001.

BASSILI, M.; BIRMAN, E.; SCHOR, N. F. & SARAGOVI, H. U. Differential roles of Trk and P75 neurotrophin receptors in tumorigenesis and chemoresistance ex vivo and in vivo. *Cancer Chemother Farmacol*, 65: 1047-1056, 2010.

BARBACID, M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 25: 1386–1403, 1994.

BARDELLI, A.; PARSONS, D. W.; SILLIMAN, N.; PTAK, J.; SZABO, S.; SAHA, S.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J. K.; PARMIGIANI, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. & VELCULESCU, V. E. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science*, 300: 949, 2003.

BARDELLI, A. & JÄNNE, P. A. The road to resistance: EGFR mutation and cetuximab. *Nat Med*, 18: 199-200, 2012.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências desvendando o sistema nervoso. 2ed. Porto Alegre: *ArtMed*, 2002.

BENYA, R. V.; KUSUI, T.; KATSUNO, T.; TSUDA, T.; MANTEY, S. A.; BATTEY, J. F. & JENSEN, R. T. Glycosylation of the gastrin-releasing peptide receptor and its effect on expression, G protein coupling, and receptor modulatory process. *Mol Pharmacol*, 58: 1490-1501, 2000.

BERTOTTI, A.; MIGLIARDI, G. ; GALIMI, F.; SASSI, F.; TORTI, D.; ISELLA, C.; CORÀ, D.; DI NICOLANTONIO, F.; BUSCARINO, M.; PETTI, C.; RIBERO, D.; RUSSOLILLO, N.; MURATORE, A.; MASSUCCO, P.; PISACANE, A.; MOLINARO, L.; VALTORTA, E.; SARTORE-BIANCHI, A; RISIO, M.; CAPUSSOTTI, L.; GAMBACORTA, M.; SIENA, S. ; MEDICO, E.; SAPINO, A.; MARSONI, S.; COMOGLIO, P.M.; BARDELLI, A. & TRUSOLINO, L. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov*, 1: 508-523, 2011.

BIBEL, M. AND BARDE, Y. A. Neurotrophin: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14: 2919-2937, 2000.

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

BOYIADZIS, M. M.; LEBOWITZ, P. F.; FRAME, J. N. & FOJO, T. Hematology-Oncology Therapy. *Mc Qraw-Hill*, 2007.

CAMPOS, X.; MUÑOZ, Y.; SELMAN, A.; YAZIGI, R.; MOYANO, L.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C.; LARA, H. E. & ROMERO, C. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Ginecol Oncol*, 104: 168-175, 2007.

CARROLL, R. E.; MATKOWSKYJ, K. O.; CHAKRABARTI, S., MCDONALD, T. J. & BENYA, R. V. Aberrant expression of gastrin-releasing peptide and its receptor by well-differentiated color cancers in humans. *Am J Physiol*, 276: g655-g665, 1999.

CARROL, R. E.; OSTROVSKIY, D.; LEE, S.; DANILKOVICH, A. & BENYA, R. V. Characterization of gastrin-releasing peptide and its receptor aberrantly expressed by human colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol*, 58: 601-607, 2000.

CARROL, R. E.; MATKOWSKYJ, K.; SAUNTHARARAJAH, Y.; SEKOSAN, M.; BATTEY, J. F. & BENYA, R. V. Contribution of gastrin-releasing peptide and its receptor to villus development in the murine and human gastrointestinal tract. *Mech Dev*, 113: 121-130, 2002.

CASANUEVA, F. F.; PERIZ, F. R.; CASABIELL, X., CAMIÑA, J. P.; CAI, R. Z. & SCHALLY, A. V. Correlation between the effects of bombesin antagonists on cell proliferation and intracellular calcium concentration in Swiss 3T3 and HT-29 cell lines. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 1406-1411, 1996.

CASSANO, G.; RESTA, N.; GASPARRE, G.; LIPPE, C. & GUANTI, G. The proliferative response of HT-29 human colon adenocarcinoma cells to bombesin-like peptides. *Cancer Lett*, 172: 151-157, 2001.

CHAO, M.V. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron*, 9: 582-593, 1992.

CHATZISTAMOU I.; SCHALLY A. V.; SZEPEHAZI K.; GROOT, K.; HEBERT, F. & ARENCIBIA, J. M. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist rc-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetorelix. *Cancer Lett*, 171: 37-45, 2001.

CHU, K. U.; HIGASHIDE, S.; EVERS, B. M.; ISHIZUKA, J.; TOWNSEND, C. M. Jr & THOMPSON, J. C. Bombesin stimulates mucosal growth in jejunal and ileal Thiry-Vella fistulas. *Ann Surg*, 221: 602-609, 1995 (a).

CHU, K. U.; EVERS, B. M.; ISHIZUKA, J.; TOWNSEND, C. M. Jr & THOMPSON, J. C. Role of bombesin on gut mucosal growth. *Ann Surg*, 222: 94-100, 1995 (b).

COHENURAM, M & SAIF, M. W. Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic. *Anticancer Drugs* 18: 7-15, 2007.

COM, E.; LAGADEC, C.; PAGE, A.; EL YAZIDI-BELKOURA, I.; SLOMIANNY, C.; SPENCER, A.; HAMMACHE, D.; RUDKIN, B. B. & HONDERMARCK, H. Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis. *Mol Cell Prot*, 6 (11): 1842-1854, 2007.

CORNELIO, D. B.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Annals of Oncology*, 18 (9): 1457-1466, 2007.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robins Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2000.

CUNNINGHAM, J. M.; KIM, C. Y.; CHRISTENSEN, E. R.; TESTER, D. J.; PARC, Y. BURGART, L. J.; HALLING, K. C.; MCDONNELL, S. K.; SCHAID, D. J.; WALSH VOCKLEY, C.; KUBLY, V.; NELSON, H.; MICHELS, V. V. & THIBODEAU, S. N. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet*, 69: 780–790, 2001.

DAVIDSON, B.; REICH, R.; LAZAROVICI, P.; NESLAND, J. M.; SKREDE, M.; RISBERG, B.; TROPÉ, C. G. & FLØRENES, V. A. Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer*, 9: 2248-2259, 2003.

DAVIES, R. J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat Rev Cancer*, 5: 199–209, 2005.

DE JONG, A. E.; HENDRIKS, Y. M.; KLEIBEUKER, J. H.; DE BOER, S. Y.; CATS, A.; GRIFFIOEN, G.; NAGENGAST, F. M.; NELIS, F. G.; ROOKUS, M. A. & VASEN, H. F. Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. *Gastroenterology*, 130: 665–671, 2006.

DESCAMPS, S.; LEBOURHIS, X.; DELEHEDDE, M.; BOILLY, B. & HONDERMARCK, H. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem*, 273: 16659-16662, 1998.

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

DIONNE, C. A.; CAMORATTO, A. M.; JANI, J. P.; EMERSON, E.; NEFF, N.; VAUGHT, J. L.; MURAKATA, C.; DJAKIEW, D.; LAMB, J.; BOVA, S.; GEORGE, D. & ISAACS, J. T. Cell cycle-independent death of prostate adenocarcinoma is induced by the trk tyrosine kinase inhibitor CEP-751 (KT6587). *Clin Cancer Res*, 4: 1887-1898, 1998.

DORSAM, R. T & GUTKIND, J. S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev*, 7: 79-94, 2007.

DOUILLARD, J. Y.; CUNNINGHAM, D.; ROTH, A. D.; NAVARRO, M.; JAMES, R. D.; KARASEK, P.; JANDIK, P.; IVESON, T.; CARMICHAEL, J.; ALAKL, M.; GRUIA, G.; AWAD, L. & ROUGIER, P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 355: 1041-1047, 2000.

EGGERT, A.; GROTZER, M. A.; IKEGAKI, N.; LIU, X. G.; EVANS, A. E. & BRODEUR, G. M. Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 35: 569-572, 2000.

EGGERT, A.; GROTZER, M. A.; IKEGAKI, N.; ZHAO, H.; CNAAN, A.; BRODEUR, G. M. & EVANS, A. E. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol*, 19: 689-896, 2001.

FERNANDO, N. H.; HURWITZ, H. I. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol*, 30: 39-50, 2003.

FERRIS, H. A.; CARROL, R. E.; RASENIC, M. M. & BENYA, R. V. Constitutive activation of the gastrin-releasing peptide receptor expressed by the non-malignant human colon epithelial cell line NCM460. *J Clin Inves*, 100: 2530-2537, 1997.

FLORES, D. G.; DE FARIAS, C. B.; LEITES, J.; DE OLIVEIRA, M. S.; LIMA, R. C.; TAMAJUSUKU, A. S.; DI LEONE, L. P.; MEURER, L.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; LENZ, G. & ROESLER, R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res*, 5: 99-105, 2008.

FRATTINI, M.; BALESTRA, D.; SUARDI, S.; OGGIONNI, M.; ALBERICI, P.; RADICE, P.; COSTA, A.; DAIDONE, M. G.; LEO, E.; PILOTTI, S.; BERTARIO, L. & PIEROTTI, M. A. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 10 (12): 4015-4021, 2004.

FREEMAN, D. J.; McDORMAN, K.; BUSH, T. Mono and combination therapeutic activity of panitumumab (ABX-EGF) on human A431 epidermoid and HT-29 colon carcinoma xenografts; correlation with pharmacodynamic parameters. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, 27-31, 2004.

FRUCHT, H.; GAZDAR, A. AND JENSEN, R. T. Human colon cancer cell line NCI-H716 expresses functional bombesin receptors. *Proc. Am. Assoc Cancer Res*, 32: 47-52, 1991.

GEIGER, T. R.; SONG, J. Y.; ROSADO, A. & PEEPER, D. S. Functional characterization of human cancer-derived *TrkB* mutations. *PLoS One*, 6: e16871, 2011.

GILADI, E.; NAGALLA, S. R. & SPINDEL, E. R. Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides. *J Mol Neurosci.*, 4: 41-54, 1993.

GLASS, D.J.; YANCOPOULOS, G.D. The neurotrophin and their receptors. *Trands Cell Biol*, 3: 262-268, 1993.

GLOVER, S.; DELANEY, M.; DEMATT, C.; KORNBERG, L.; FRASCO, M.; TRAN-SON-TAY, R. & BENYA, R. V. Phosphorylation of focal adhesion kinase

tyrosine 397 critically mediates gastrin-releasing peptide's morphogenic properties. *J Cell Physiol*, 199 (4): 77-88, 2004.

GUATE, J.L.; FERNANDEZ, N.; LANZAS, J.M.; ESCAF, S. & VEJA, J. A. Expression of p75 (LNGFR) and Trk neurotrophin receptors in normal and neoplastic human prostate. *B J U Int*, 84: 495-502, 1999.

HAMPEL, H.; STEPHENS, J. A.; PUKKALA, E.; SANKILA, R.; AALTONEN, L. A.; MECKLIN, J. P. & DE LA CHAPELLE, A. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. *Gastroenterology*, 129: 415–421, 2005.

HAMPEL, H.; FRANKEL, W. L.; MARTIN, E.; ARNOLD, M.; KHANDUJA, K.; KUEBLER, P.; CLENDENNING, M.; SOTAMAA, K.; PRIOR, T.; WESTMAN, J. A.; PANESCU, J.; FIX, D.; LOCKMAN, J.; LAJEUNESSE, J.; COMERAS, I. & DE LA CHAPELLE, A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26: 5783–5788, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2000.

HEWITSON, P.; GLASZIOU, P.; IRWIG, L.; TOWLER, B. & WATSON, E. Screening of Colorectal Cancer using the Faecal Occult Blood Test, Hemocult. *Coch Data Syst Rev*, 2007.

HOFF, P. M.; ANSARI, R.; BATIST, G.; COX, J.; KOCHA, W.; KUPERMINC, M.; MAROUN, J.; WALDE, D.; WEAVER, C.; HARRISON, E.; BURGER, H. U.; OSTERWALDER, B.; WONG, A. O. & WONG, R. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 19: 2282–2292, 2001.

HOHLA, F. & SCHALLY, A. V. Targeting gastrin releasing peptide receptors: new options for the therapy and diagnosis of cancer. *Cell Cycle*, 9: 1738–1741, 2010.

HONDERMARCK, H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.06.004>

HUANG, Y. T.; LAI, P. C.; WU, C. C.; HSU, S. H.; CHENG, C. C.; LAN, Y. F. & CHIU, T. H. BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 36: 1469–1476, 2010.

HUANG, Y. T.; LAI, P. C.; WU, C. C.; CHENG, C. C. & CHIU, T. H. TrkB antibody elicits cytotoxicity and suppresses migration/invasion of transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 37: 943–949, 2010a.

HUNDT, S.; HAUG, U.; BRENNER, H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, p. 1935–1953, 2007.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J.; JORDAN BERLIN, W. H.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R. & KABBINAVAR, F et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of a phase III trial of Bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC. Abstract no. 3646, *American Society Oncology (ASCO) meeting*, 2006.

HUTCHINSON, A. J.; CHOU, C. L.; ISRAEL, D. D.; XU, W. & REGAN, J. W. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int*, 54: 439–446, 2009.

IQBAL, S. & LENZ, H. J. Determinants of prognosis and response to therapy in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep*, 3: 102–108, 2001.

JARVINEN, H. J.; MECKLIN, J. P.; SISTONEN, P. Screening reduces colorectal cancer rate in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Gastroenterology*, 108: 1405-1411, 1995.

JENSEN, J. A.; CARROL, R. E. AND BENYA, R. V. The case for gastrin-releasing peptide acting as a morphogen when it and its receptor are aberrantly expressed in cancer. *Peptides*, 22: 689-699, 2001.

JOHNSON, M. R. & DIASIO, R. B. Importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients exhibiting toxicity following treatment with 5-fluorouracil. *Adv Enzyme Regul*, 41: 151–157, 2001.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 213-221, 1997.

KATZIR, I.; SHANI, J., SHABASHOV, D., DAGAN, J. & LAZAROVICI, P. Establishment and characterization of pheochromocytoma tumor models expressing different levels of TrkA receptors. *Cancer Lett*, v. 200, p. 177-185, 2003.

KHWAJA, F. AND DJAKIEW, E. Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75 NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog*, 36: 153-160, 2003.

KIM, S.; HU, W.; KELLY, D. R., HELLMICH, M. R.; EVERS, B. M. & CHUNG, D. H. Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastoma. *Ann Surg*, 235: 621-230, 2002.

KRAUSE, D. S. & VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*, 353: 172–187, 2005.

KROOG, G.; SAINZ, E.; WORLAND, P.; AKESON, M. A.; BENYA, R. V.; JENSEN, R. T. & BATTEY, J. F. The gastrin-releasing peptide receptor is rapidly phosphorylated by a kinase other than protein kinase C after exposure to agonist. *J Biol Chem*, 270: 8217-8224, 1995.

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

KRYGIER, S. AND DJAKIEW, D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppress growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cell. *Int J Cancer*, 98: 1-7, 2002.

KUNKEL, T. A. Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature*, 365: 207–208, 1993.

KWEEKEL, D. M.; ANTONINI, N. F.; NORTIER, J. W. R.; PUNT, C. J.; GELDERBLUM, H. & GUCHELAAR, H. J. Explorative study to identify novel candidate genes related to oxaliplatin efficacy and toxicity using a DNA repair array. *Brit J Cancer*, 101: 357 – 362, 2009.

LABIANCA, R.; PESSI, M. A.; ZAMPARELLI, G. Treatment of colorectal cancer. current guidelines and future prospects for drug therapy. *Drugs*, 53: 593-607, 1997.

LAM, C. T.; YANG, Z. F.; LAU, C. K.; TAM, K. H.; FAN, S. T. & POON, R. T. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: implication in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 17: 3123–3133, 2011.

LA THANGUE, N. B. & KERR, D. J. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, 8: 587-596, 2011.

LAI, P. C.; CHIU, T. H.; HUANG, Y. T. Overexpression of BDNF and TrkB in human bladder cancer specimens. *Oncol Rep*, 24: 1265–1270, 2010.

LEE, J.; JIFFAR, T. & KUPFERMAN, M. E. A novel role for BDNF-TrkB in the regulation of chemotherapy resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Plos One*, 7(1): e30246, 2012.

LI, Z.; OH, D. Y.; NAKAMURA, K. & THIELE, C. J. Perifosine-induced inhibition of AKT attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma *in vivo*. *Cancer* DOI: 10.1002/cncr.26133, 2011 (Epub ahead of print).

LI, Z.; ZHANG, J.; LIU, Z.; WOO, C. & THIELE, C. J. Downregulation of Bin by brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from paclitaxel but not etoposide or cisplatin-induced cell death. *Cell Death Differ*, 14: 318-326, 2007.

LIEBOW, C.; CREAN, D. H.; LEE, M. T.; KAMER, A. R.; MANG, T. S. & SCHALLY, A. V. Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 3804-3808, 1994.

LYNCH, H.T. & DE LA CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348: 919-932, 2003.

MASLEN, G. L. & BOYD Y. Comparative mapping of the GRPR on the X Chromosomes of man and mouse. *Genomics*, 17 (1): 106-109, 1993.

MARCHETTI, D.; MENTER, D.; JIN, L.; NAKAJIMA, M. & NICOLSON, G. L. Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparanase production. *Int J Cancer*, 55: 692-699, 1993.

MARINISSEN, M.J. & GUTKIND, J.S. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 368-376, 2001.

MARTIN-ZANCA, D.; MITRA, G.; LONG, L. K. & BARBACID, M. Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51: 983-992, 1986.

McGREGOR, L. M.; McCUNE, B. K.; GRAFF, J. R.; MCDOWELL, P. R.; ROMANS, K. E.; YANCOPOULOS, G. D.; BALL, D. W.; BAYLIN, S. B. & NELKIN, B. D. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 4540-4545, 1999.

MENKO, F. H; WIJNEN J. T.; VASEN H. F.; SIJMONS, R. H. & KHAN, P. M. Familial and hereditary non-polyposis colorectal cancer: issues relevant for surgical practice. *Recent Results Cancer Res*, 146: 20-31, 1998.

MENTER, D. G.; HERRMANN, J. L.; MARCHETTI, D. & NICOLSON, G. L. Involvement of neurotrophins and growth factors in brain metastasis formation. *Invas Metast*, 14: 372-384, 1994.

MIKNYOCZKI, S.J; LANG, D. HUANG, L.; KLEIN-SZANTO, A. J.; DIONNE, C. A. & RUGGERI, B. A. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on *in vitro* invasive behavior. *Int J Cancer*, 81: 417-427, 1999.

MOODY, T.W. & MERALI Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*, 25: 511-520, 2004.

MOODY, T. W.; BERNA, M. J.; MANTEY, S.; SANCHO, V.; RIDNOUR, L.; WINK, D. A.; CHAN, D.; GIACCONE, G. & JENSEN, R. T. Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 637: 38–45, 2010.

MOODY, T. W.; SANCHO, V.; DI FLORIO, A.; NUCHE-BERENGUER, B.; MANTEY, S. & JENSEN, R. T. Bombesin receptor subtype-3 agonists stimulate the growth of lung cancer cells and increase EGF receptor tyrosine phosphorylation. *Peptides*, 32: 1677–1684, 2011.

MOON, A.; WON, K. Y.; LEE, J. Y.; KANG, I.; LEE, S. K. & LEE, J. Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology*, v. 43, p. 453–458, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 65: 55-63, 1983.

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

NAKAGAWARA, A. TrkA receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*, 169: 107-114, 2001.

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

ODEGAARD, E.; STAFF, C.A.; ABELER, V.; KOPOLOVIC, J.; ONSRUD, M.; LAZAROVICI, P. & DAVIDSON, B. The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Human Pathol*, 38: 140-146, 2007.

OHKI-HAMAZAKI, H.; IWABUCHI, N.; MAEKAWA, F. Development and function of bombesin-like peptide and their receptors. *Int J Dev Biol*, 49: 293-300, 2005.

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

PATANI, N.; JIANG, W. G.; MOKBEL, K. Brain derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int*, 11 (1): 23, 2011.

PATEL, O.; DUMESNY, C.; GIRAUD, A. S.; BALDWIN, G. S. & SHULKES, A. Estimulation of proliferation and migration of a colorectal cancer cell line by amidated and glycine-extended gastrin-releasing peptide via the same receptor. *Biochem Pharmacol*, 68: 2129-2142, 2004.

PATEL, O.; SHULKES, A.; BALDWIN, G.S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochem Biophys Acta*, 1766: 23-41, 2006.

PELLO, J. M.; GUATE, J.L.; NAVES, F.J.; ESCAF, S. & VEGA, J. A. Neurotrophins and neurotrophins receptors in some neural crest-derived tumours (ganglioneuroma, phaeochromocytoma and paraganglioma). *Histopathology*, 34: 216-225, 1999.

PEREZ-PINERA, P.; HERNANDEZ, T.; GARCÍA-SUÁREZ, O., The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem*, 295: 19-26, 2007.

PFLUG, B.R. & DJAKIEW, D. Expression of p75NTR in a human prostate epithelial tumor cell line reduces nerve growth factor induced cell growth by activation of programmed cell death. *Mol Carcinog*, 23: 106-114, 1998.

PRESTON, S. R.; MILLER, G. V.; PRINROSE, J. N. Bombesin-like peptide and cancer. *Critic Rev Oncol Hematol*, 23: 225-238, 1996.

QUEHENBERGER, F.; VASEN, H. F.; VAN HOUWELINGEN, H. C. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet*, 42: 491-496, 2005.

RADULOVIC, S.; MULLER, G., SCHALLY, A. V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res*, 51: 6006-6009, 1991.

RAFF, M. C.; BARRIS, B. A.; BURNE, J. F.; COLES, H. S.; ISHIZAKI, Y. & JACOBSON, M. D. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, 262: 695-700, 1993.

RAMSOEKH, D.; VAN LEERDAM, M. E.; WAGNER, A. & KUIPERS, E. J. Review article: detection and management of hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Aliment Pharmacol Ther*, 26 (2): 101-111, 2007.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil TranS R Soc B*, 361: 1545-1564, 2006.

RICCI, A.; GRECO, S.; MARIOTTA, S.; FELICI, L.; BRONZETTI, E.; CAVAZZANA, A.; CARDILLO, G.; AMENTA, F.; BISETTI, A. & BARBOLINI, G.

Neurotrophins and neurotrophin receptor in human lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25: 439-446, 2001.

RICK, F. G.; BUCHHOLZ, S.; SCHALLY, A. V.; SZALONTAY, L.; KRISHAN, A.; DATZ, C.; STADLMAYR, A.; AIGNER, E.; PEREZ, R.; SEITZ, S.; BLOCK, N. L. & HOHLA, F. Combination of gastrin-releasing peptide antagonist with cytotoxic agents produces synergistic inhibition of growth of human experimental colon cancers. *Cell Cycle*, 11 (13): 2518-2525, 2012.

RHEIN, M.; SCHWARZER, A.; YANG, M.; KAEVER, V.; BRUGMAN, M.; MEYER, J.; GANSER, A.; BAUM, C. & LI, Z. Leukemias induced by altered TRK-signaling are sensitive to mTOR inhibitors in preclinical models. *Ann Hematol*, 90: 283–292, 2010.

RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; BOLAND, C. R.; HAMILTON, S. R.; HENSON, D. E.; JASS, J. R.; KHAN, P. M.; LYNCH, H.; PERUCHO, M.; SMYRK, T.; SOBIN, L. & SRIVASTAVA, S. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1758–1762, 1997.

ROESLER R.; MELLER C. A.; KOPSCHINA M.I.; SOUZA, D. O.; HENRIQUES, J. A. & SCHWARTSMANN, G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*, 24: 1069-1074, 2003.

ROESLER R.; HENRIQUES J.A.; SCHWARTSMANN G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 241-242, 2004a.

ROESLER R.; LESSA D.; VENTURELLA R.; VIANNA, M. R.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; IZQUIERDO, I. & SCHWARTSMANN, G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci*, 19: 1041-1045, 2004b.

ROESLER R.; HENRIQUES, J.A., SCHWARTSMANN G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 5: 97-204, 2006.

ROZENGURT, E.; GUHA, S. & SINNETT-SMITH, J. Gastrointestinal peptide signaling in health and disease. *Eur J Surg Suppl*, 587: 23-38, 2002.

ROSA, I.; FIDALGO, P.; SOARES, J.; VINGA, S.; OLIVEIRA, C.; SILVA, J. P.; FERRO, S. M.; CHAVES, P.; OLIVEIRA, A. G. & LEITÃO, C. N. Adenoma incidence decreases under the effect of polypectomy. *World J Gastroenterol*, 18(11): 1243-1248, 2012.

RUGINIS, T.; TAGLIA, L.; MATUSIAK, D.; LEE, B. S. & BENYA R. V. Consequence of gastrin-releasing peptide receptor activation in a human colon cancer cell line: a proteomic approach. *J Prot Res*, 5: 1460-1468, 2006.

SALOVAARA, R.; LOUKOLA, A.; KRISTO, P.; KÄÄRIÄINEN, H.; AHTOLA, H.; ESKELINEN, M.; HÄRKÖNEN, N.; JULKUNEN, R.; KANGAS, E.; OJALA, S.; TULIKOURA, J.; VALKAMO, E.; JÄRVINEN, H.; MECKLIN, J. P.; AALTONEN, L. A. & DE LA CHAPELLE, A. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18: 2193–2200, 2000.

SALTZ, L. B.; COX, J. V.; BLANKE, C.; ROSEN, L. S.; FEHRENBACHER, L.; MOORE, M. J.; MAROUN, J. A.; ACKLAND, S. P.; LOCKER, P. K.; PIROTTA, N.; ELFRING, G. L. & MILLER, L. L. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*, 343: 905-914, 2000.

SAURIN, J.C. ; ROUALT, J.P. ; ABELLO, J. ; BERGER, F.; REMY, L. & CHAYVIALLE, J. A. High gastrin-releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer. *Eur J Cancer*, 35(1): 125-132, 1999.

SCHALLY, A. V.; COMARU-SCHALLY, A. M.; NAGY, A.; KOVACS, M.; SZEPEHAZI, K.; PLONOWSKI, A.; VARGA, J. L. & HALMOS, G. Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22: 248-291, 2001.

SCHALLY, A. V.; NAGY, A. New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. *Life Sci*, 72: 2305-2320, 2003.

SCHALLY, A.V.; SZEPEHAZI, K.; NAGY, A.; SCHALLY, A. V.; SZEPEHAZI, K.; NAGY, A.; COMARU-SCHALLY, A. M. & HALMOS, G. Biomedicine and disease: review. New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci*, 61: 1042-1068, 2004.

SCHMIDT, A. L.; DE FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; KAPCZINSKI, F.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L. & ROESLER, R. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci*, 40: 303–310, 2010.

SCHULTZ, W. A. Molecular Biology of Human Cancer. An Advanced Student's Textbook. United States of America: *Springer Science*, 2005. (<http://ebooks.springerlink.com>)

SCHWARTSMANN G. Dexamethasone and gastrin-releasing peptide receptors in human lung cells. *Lung Cancer*, 46: 129, 2004.

SCHWARTSMANN G., DI LEONE L. P.; DAL PIZZOL F. & ROESLER, R. MAPK pathway activation in colorectal cancer: a therapeutic opportunity for grp receptor antagonists. *Lancet Oncol*, 6: 444-5, 2005.

SCOTT, N.; MILLWARD, E.; CARTWRIGHT, E. J.; PRESTON, S. R. & COLETTA, P. L. Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor expression in gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol*, 57: 189-192, 2004.

SEGAL, R.A. & GREENBERG, M.E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 19: 463-489, 1996.

SHIBAYAMA, E. & KOIZUMI, H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissue. *Am J Pathol*, 148: 1807-1818, 1996.

SHIN, C.; MOK, K. H.; HAN, J. H.; AHN, J. H. & LIM, Y. Conformational analysis in solution of gastrin releasing peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 120-124, 2006.

SHUMYATSKY, G. P.; TSVETKOV, E.; MALLERET, G.; VRONSKAYA, S.; HATTON, M.; HAMPTON, L.; BATTEY, J. F.; DULAC, C.; KANDEL, E. R. & BOLSHAKOV, V. Y. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell*, 111: 905-918, 2002.

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

STUCKY, C.L.; DECHIARA, T.; LINDSAY, R.M.; YANCOPOULOS, G. D. & KOLTZENBURG, M. Neurotrophin 4 is require for the survival of a subclass of hair follicle receptors. *J Neurosci*, 18: 7040-7046, 1998.

SZEPESHAZI, K.; LAPIS, K.; SCHALLY, A. V. Effect of combination treatment with analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or somatostatin and 5-fluorouracil on pancreatic cancer in hamsters. *Int J Cancer*, 49: 260-266, 1991.

SZEPESHAZI K.; SCHALLY A. V.; HALMOS G.; LAMHARZI, N.; GROOT, K. & HORVATH, J. E. A single *in vivo* administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mrna expression of epidermal growth factor receptors in mxt mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 10913-8, 1997.

TAKHAR, A. S.; ERMIN, O.; WATSON, S. A. The role of gastrin in colorectal carcinogenesis. *Surgeon*, 2(5): 251-7, 2004.

THIELE, C.J.; LI, Z.; McKEE, A. E. On Trk – the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res*, 15:5962–5967, 2009.

THOMAS, S. M.; GRANDIS, J. R.; WENTZEL, A. L.; GOODING, W. E.; LUI, V. W. Y. & SIEGFRIED, J. M. Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia*, 7(4): 426-431, 2005.

TRAINER, D. L.; KLINE, T.; McCABE, F.; TRAINER, D. L.; KLINE, T.; MCCABE, F. L.; FAUCETTE, L. F.; FEILD, J.; CHAIKIN, M.; ANZANO, M.; RIEMAN, D.; HOFFSTEIN, S. & LI, D. J. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 41: 287-296, 1988.

UMAR, A.; BOLAND, C. R.; TERDIMAN, J. P.; SYNGAL, S.; DE LA CHAPELLE, A.; RÜSCHOFF, J.; FISHEL, R.; LINDOR, N. M.; BURGART, L. J.; HAMELIN, R.; HAMILTON, S. R.; HIATT, R. A.; JASS, J.; LINDBLOM, A.; LYNCH, H. T.; PELTOMAKI, P.; RAMSEY, S. D.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; VASEN, H. F.; HAWK, E. T.; BARRETT, J. C.; FREEDMAN, A. N. & SRIVASTAVA, S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96: 261–268, 2004.

VANHECKE, E.; ADRIAENSSENS, E.; VERBEKE, S.; MEIGNAN, S.; GERMAIN, E.; BERTEAUX, N.; NURCOMBE, V.; LE BOURHIS, X. & HONDERMARCK, H. 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: 1741–1752, 2011.

VAN LIER, M. G. F.; WAGNER, A.; VAN LEERDAM, M. E.; BIERMANN, K.; KUIPERS, E. J.; STEYERBERG, E. W.; DUBBINK, H. J. & DINJENS, W. N. A review on the molecular diagnostics of Lynch syndrome: a central role for the pathology laboratory. *J Cell Mol Med*, 14: 181-197, 2010.

VASEN, H. F.; STORMORKEN, A.; MENKO, F. H.; NAGENGAST, F. M.; KLEIBEUKER, J. H.; GRIFFIOEN, G.; TAAL, B. G.; MOLLER, P. & WIJNEN, J. T. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol*, 19: 4074–4080, 2001.

VASEN, H. F. A. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Pham Cancer*, 4: 219-225, 2005.

XIAO, D.; WANG, J.; HAMPTON, L. L., WEBER, H. C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene*, 264: 95-103, 2001.

WADHWA, S.; NAG, T. C.; JINDAL, A.; KUSHWAHA, R.; MAHAPATRA, A. K. & SARKAR, C. Expression of the neurotrophin receptors Trk A and Trk B in adult human astrocytoma and glioblastoma. *J Biosci*, 28 (2): 181–188, 2003.

WADLOW, R. C. & RYAN, D. P. The Role of Targeted Agents in Preoperative Chemoradiation for Rectal Cancer. *Cancer*, 3537-3548, 2010.

WAGNER, N.; WAGNER, K.D.; THERES, H.; ENGLERT, C.; SCHEDL, A. & SCHOLZ, H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilm's tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev*, 19: 2631-2642, 2005.

WEICKHARDT, A.; WELLS, K.; MESSERSMITH W. Oxaliplatin-Induced Neuropathy in Colorectal Cancer. *J Oncol*, 2011: 1-7, 2011.

WILLIAMS J. L. Cancer stem cells. *Clin Lab Sci*, 25 (1): 50-57, 2012.

www.inca.gov.br

www.nccn.org

www.ema.europa.eu (European Medicines Agency)

YOSHII A, CONSTANTINE-PATON M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70: 304–322, 2010.

ZHANG, Q.; BHOLA, N. E.; LUI, V. W.; SIWAK, D. R.; THOMAS, S. M.; GUBISH, C. T.; SIEGFRIED, J. M.; MILLS, G. B.; SHIN, D. & GRANDIS, J. R. Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck. *Mol Cancer Ther*, 6: 1414-1424, 2007.,

ZOLG, J. W. & LANGEN, H. How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol Cell Proteomics*, 3: 345–354, 2004.

11 APÊNDICES

- 11.1 ARTIGO PUBLICADO: Reduced NGF Secretion by HT-29 Human Colon Cancer Cells Treated with a GRPR Antagonist**
- 11.2 DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE N° PI BR 10 2012-08895**
- 11.3 DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE N° PI BR 10 2012-012574-9**
- 11.4 ARTIGO ACEITO: Influence of GRPR and BDNF / TrkB on the Viability of Breast and Gynecologic Cancer Cells**

11.1 Artigo Publicado

Reduced NGF Secretion by HT-29 Human Colon Cancer Cells Treated with a GRPR Antagonist

Situação: Publicado

Revista: Protein & Peptide Letters

Ano de publicação: 2009

Volume: 16

Páginas: 650 - 652

Reduced NGF Secretion by HT-29 Human Colon Cancer Cells Treated with a GRPR Antagonist

Caroline Brunetto de Farias^{a,b}, Laura Stertz^c, Rodrigo Cruz Lima^{a,b}, Flávio Kapczinski^c, Gilberto Schwartzmann^{a,d} and Rafael Roesler^{a,b,*}

^aCancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil; ^bCellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil; ^cLaboratory of Molecular Psychiatry, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil; ^dDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract: The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is a therapeutic target in colon cancer. Here we show that the GRPR antagonist RC-3095 (10^{-3} , 10^{-6} , or 1 μ M) decreases nerve growth factor (NGF) secretion measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in HT-29 human colon carcinoma cells. The results suggest that decreased secretion of neurotrophins might be a novel mechanism by which GRPR antagonists exert their antiproliferative effects in cancer cells.

Keywords: Gastrin-releasing peptide receptor, RC-3095, nerve growth factor, colon cancer.

INTRODUCTION

The rational targeting of specific growth factor receptors on tumors is one of the most promising strategies for the development of novel drugs for the treatment of colon cancer. Gastrin-releasing peptide (GRP) is a mammalian bombesin (BB)-like peptide that acts as a major autocrine growth factor in several human cancers. Aberrant expression of both GRP and its receptor (GRPR) has been reported in many types of tumors, including colon cancer (for recent reviews, see [1, 2]). These findings have led to the development of selective GRPR antagonists as a potential new class of targeted drugs for the treatment of colon cancer [3, 4]. The molecular mechanisms underlying the antiproliferative effects of GRPR antagonists in colon cancer remain poorly understood. Possible mechanisms include inhibition of protein kinase signaling pathways (reviewed in [1, 2] and decreased expression of epidermal growth factor receptors (EGFR) [4].

The neurotrophin nerve growth factor (NGF) is well known for stimulating neuronal survival and growth. Evidence indicates that NGF might also act as an autocrine mitogen for breast and prostate cancer cells [5, 6]. Because NGF secretion by cancer cells might involve cellular mechanisms that are affected by GRPR activation, such as the protein kinase C (PKC) pathway [7], it is possible that the actions of GRPR antagonists involve altering NGF release from cancer cells. In the present study, we examined the effects of a GRPR antagonist on NGF secretion from colon cancer cells *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

HT-29 human colon carcinoma cells (American Type Culture Collection, USA) were seeded (7×10^3 cells per well) in 96-well polystyrene tissue-culture-treated flat-bottom microtiter plates (TPP, Switzerland) in RPMI medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Soral, Brazil), gentamicin (4 mg/ml, Nova Pharma, Brazil), and fungizone (250 mg/kg, Invitrogen, Brazil) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. The cells were treated with the GRPR antagonist RC-3095 at 10^{-3} , 10^{-6} , or 1 μ M [3, 4, 8] for 24 or 48 h. We have previously shown that RC-3095 at that concentration range inhibits proliferation of HT-29 cells *in vitro* [8].

Either 24 or 48 h after treatment, the supernatant was removed and NGF levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; (ChemiKine, cat. no. CYT304) according to the manufacturer's instructions. Briefly, supernatants were added to microtiter plates for 24 h. The standard curve was prepared with samples diluted 1:2 in sample diluent. Plates were then washed four times with sample diluent before adding anti-NGF monoclonal antibody diluted 1:1000 in sample diluent and incubated for 3 h at room temperature. After washing, wells were incubated with 1:1000 anti-rabbit peroxidase conjugated antibody for 1 h at room temperature. After addition of streptavidin enzyme, substrate, and stop solution, NGF concentrations were determined at 450 nm.

Data are shown as mean \pm SEM concentration of NGF. Differences between mean values were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc tests. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/ÚFRGS), 90046-900 Porto Alegre, RS (Brazil); Tel: +55 51 3308 3183; Fax: +55 51 3308 3121; E-mail: roesler@terra.com.br

RESULTS AND DISCUSSION

Treatment with RC-3095 induced a discrete but significant decrease in NGF levels secreted by HT-29 cells. Analysis with Tukey tests showed that RC-3095 at 10^{-3} or $1 \mu\text{M}$ significantly reduced NGF levels (both P s < 0.05 compared to control cells), whereas the concentration of 10^{-6} had no effect ($P = 0.35$) (Fig. 1, upper panel). At 48 h after addition of RC-3095, NGF levels were significantly reduced by RC-3095 at all concentrations used ($10^{-6} \mu\text{M}$, $P < 0.05$; $10^{-3} \mu\text{M}$, $P < 0.01$; and $1 \mu\text{M}$, $P < 0.01$ as compared to controls) (Fig. 1, lower panel).

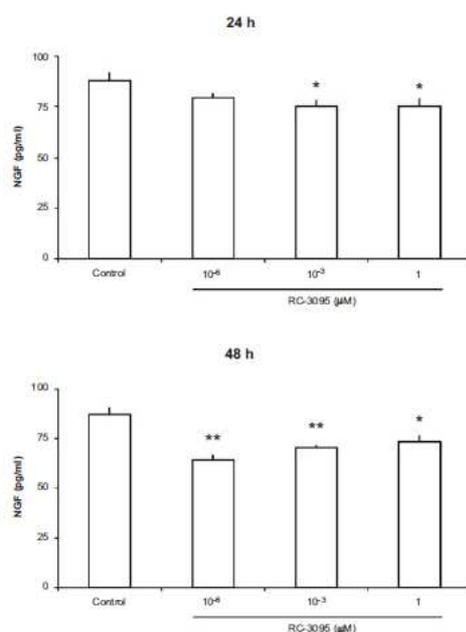


Figure 1. The GRPR antagonist RC-3095 inhibits NGF secretion by HT-29 human colon carcinoma cells *in vitro*. NGF levels were assessed by ELISA after either 24 (upper panel) or 48 (lower panel) h after treatment. Data are mean \pm SEM NGF levels expressed in pg/ml of culture supernatant; N=4 (24 h-period) and 7 (48 h-period) experiments performed in triplicate; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control cells.

Our results indicate that HT-29 colon cancer cells are capable of secreting NGF. Although this finding suggests that NGF might act as a stimulator of cell proliferation in colon cancer, further experiments are required to examine its effect on colon cancer cell proliferation. A potential caveat of this finding is that the reduced NGF levels observed are related to a reduced number of viable cells, since RC-3095 has been shown to inhibit proliferation of HT-29 cells *in vitro* [8]. However, RC-3095 produced a decrease in NGF levels at $10^{-3} \mu\text{M}$, a concentration that does not affect prolif-

eration of HT-29 cells [8]. In addition, cells grown under serum-free conditions (which decreases the number of cells) had no significant differences in secreted NGF levels compared to control cells grown with serum (data not shown), indicating that the differences in NGF levels observed in our experiment could not be attributed to a reduction in the number of cells.

The apparent inverted U-shaped dose-response pattern for the effect of RC-3095 on NGF secretion is consistent with previous experiments examining the effects of different doses of RC-3095 on the growth of HT-29 and glioma cells *in vitro* [8, 9]. This pattern of effects has been attributed to a possible intrinsic agonist activity of higher doses of peptide GRPR antagonists on the receptor [9, 10].

The present results provide preliminary evidence suggesting that inhibition of neurotrophin production and secretion might be a novel mechanism involved in the antiproliferative and antimorphogenic actions of GRPR antagonists in cancer cells. In light of this finding, further research should aim at elucidating the role of neurotrophins in mediating GRPR-elicited responses in cancer cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) grants 400839/2005-9 and 301578/2006-0 to R.R.; the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the Children's Cancer Institute (ICI-RS; Porto Alegre, Brazil). Authors thank Dr. Ana Lucia Abujamra for suggestions on the manuscript.

REFERENCES

- [1] Comelio, D.B.; Roesler, R.; Schwartzmann, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, 2007, 18(9), 1457-1466.
- [2] Patel, O.; Shulkes, A.; Baldwin, G.S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1766(1), 23-41.
- [3] Radulovic, S.; Miller, G.; Schally, A.V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, 1991, 51(21), 6006-6009.
- [4] Radulovic, S.; Schally, A.V.; Reile, H.; Halmos, G.; Szepeshazi, K.; Groot, K.; Milovanovic, S.; Miller, G.; Yano, T. Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. *Acta Oncol.*, 1994, 33(6), 693-701.
- [5] Descamps, S.; Toillon, R.A.; Adriaenssens, E.; Pawlowski, V.; Cool, S.M.; Nurcombe, V.; Le Bourhis, X.; Boilly, B.; Peyrat, J.P.; Hondermarck, H. Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(21), 17864-17870.
- [6] Papatsonis, A.G.; Liolitsa, D.; Deliveliotis, C. Manipulation of the nerve growth factor network in prostate cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2007, 16(3), 303-309.
- [7] Lipnik-Stangelj, M.; Carman-Kirzan, M. Histamine-stimulated nerve growth factor secretion from cultured astrocytes is blocked by protein kinase C inhibitors. *Inflamm. Res.*, 2004, 53(Suppl 1), S57-S58.
- [8] Fernando, A.; Farias, C.B.; Roesler, R.; Schwartzmann, G. Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: a potential therapeutic role for gastrin-releasing peptide receptor antagonists. *Oncology*, 2007, 72(3-4), 160-161.
- [9] Flores, D.G.; Leites, J.; Farias, C.B.; Oliveira, M.S.; Lima, R.C.; Tamajusuku, A.S.K.; DiLeone, L.P.; Meurer, L.; Brunetto, A.L.; Schwartzmann, G.; Lenz, G.; Roesler, R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phos-

- phatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr. Neurovasc. Res.*, 2008, 5(2), 99-105.
- [10] Casanueva, F.F.; Perez, F.R.; Casabiell, X.; Camina, J.P.; Cai, R.Z.; Schally, A.V. Correlation between the effects of bombesin antagonists on cell proliferation and intracellular calcium concentration in Swiss 3T3 and HT-29 cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(4), 1406-1411.

11.2 Pedido de Patente N° PI BR 10 2012-08895

Título: Composição Compreendendo Agentes Moduladores Anti-Tumorais, Método de Modulação de Tumores Utilizando Agentes Moduladores e Uso de Agentes Moduladores de BDNF/TrkB para Modulação da Resistência a Agentes Antitumorais”

Número do Protocolo: PI BR 10 2012-0889 5

Data do depósito: 08 de maio de 2012.

Inventores: Ana Lúcia Abujamra, Caroline Brunetto de Farias, Daniela Baumann Cornelio, Gilberto Schwartzmann, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rafael Roesler e Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Esta patente será anexada às teses das alunas de doutorado **Caroline Brunetto de Farias e Daniela Baumann Cornelio**

< Uso exclusivo do INPI >



Espaço reservado ao protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
 1.2 Qualificação: INST. PÚBLICA DE ENSINO SUP
 1.3 CNPJ/CPF: 92969856000198
 1.4 Endereço Completo: AV. PAULO GAMA, 110. CENTRO, PORTO ALEGRE - RS Brasil
 1.5 CEP: 90040-060 1.6 Telefone: 51 3308 3800 1.7 Fax: 51 3308 4237
 1.8 E-mail: sedetec@ufrgs.br

 continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E USO DE AGENTES MODULADORES DE BDNF/TRKB PARA MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A

 continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido N° Data de Depósito:

- 5. Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72): Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: RAFAEL ROESLER
 6.2 Qualificação: DOCENTE 6.3 CPF: 737.112.760-91
 6.4 Endereço completo: DONA LEONOR, 194 APTO 708 RIO BRANCO PORTO ALEGRE RS BR
 6.5 CEP: 90420180 6.6 Telefone: 33083183 6.7 Fax: 33083121
 6.8 E-Mail: RROESLER@TERRA.COM.BR

 continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	18 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	9 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Autorizações de cessão de invenção; Portaria de Competência; cópia Diário Oficial da União.				9 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 41 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Porto Alegre

Local e Data

08/MAIO/2012

Assinatura e Carimbo

Profª Raquel S. Mauler
Secretária de Desenvolvimento
Tecnológico
UFRGS

Raquel S. Mauler

ANEXO DE TÍTULO DA PATENTE

Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS,
MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E...

Página 1

AGENTES ANTITUMORAIS

ANEXO DE DEPOSITANTES**Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS,
MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E...**Página 1

Nome: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Qualificação: Hospital Univesitário

CNPJ / CPF / Número INPI: 87020517000120

Endereço Completo: Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90035-903

Telefone: 21028000

FAX:

E-mail:

ANEXO DE INVENTORES**Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS,
MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES MODULADORES E...**

Página 1

Nome: CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

Qualificação: Estudante

CPF: 003.146.320-77

Endereço Completo: Rua Sarmento Leite, 781, Apto. 304 Centro Porto Alegre RS BR

CEP: 90050-170

Telefone: 51-30234824

FAX:

E-mail: carolbfarias@gmail.com

Nome: DANIELA BAUMANN CORNÉLIO

Qualificação: MÉDICA

CPF: 65414845034

Endereço Completo: CEL LUCAS DE OLIVEIRA, 1585/402 BELA VISTA PORTO ALEGRE RS BR

CEP:

Telefone:

FAX:

E-mail: DANICORNELIO@TERRA.COM.BR

Nome: ANA LUCIA ABUJAMRA

Qualificação: Biomédica

CPF: 271.634.108-75

Endereço Completo: Rua Artur Rocha, 1121, Apto. 801 Rio Branco Porto Alegre RS BR

CEP: 90620-110

Telefone: 51-33597616

FAX:

E-mail: aabujamra@hcpa.ufrgs.br

Nome: GILBERTO SCHWARTSMANN

Qualificação: DOCENTE

CPF: 289.946.470-15

Endereço Completo: SANTO INACIO, 525/1201 MOINHOS DE VENTO PORTO ALEGRE RS BR

CEP: 90450-170

Telefone: 51-33954912

FAX:

E-mail: gilberto.ez@terra.com.br

11.3 Pedido de Patente N° PI BR 10 2012-012574-9

Título: Uso de Agentes Moduladores (GRP) para Preparação de Medicamentos Antitumorais, Composição Compreendendo Agentes Moduladores Antitumorais, Método de Modulação de Tumores Utilizando Agentes Moduladores

Número do Protocolo: PI BR 10 2012-012574-9

Data do depósito: 25 de maio de 2012.

Inventores: **Ana Lúcia Abujamra, Caroline Brunetto de Farias, Daniela Baumann Cornelio, Gilberto Schwartzmann e Rafael Roesler**

Depositantes: **Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

Esta patente será anexada às teses das alunas de doutorado **Caroline Brunetto de Farias e Daniela Baumann Cornelio**

< Uso exclusivo do INPI >	
Espaço reservado ao protocolo	 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 25/05/2012 01612000: 581 15:35 D: RS  BR 10 2012 012574 9 Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
 1.2 Qualificação: INST. PÚBLICA DE ENSINO SUP
 1.3 CNPJ/CPF: 92969856000198
 1.4 Endereço Completo: AV. PAULO GAMA, 110 - CENTRO, PORTO ALEGRE - RS, Brasil
 1.5 CEP: 90040-060 1.6 Telefone: 51 3308 3800 1.7 Fax: 51 3308 4237
 1.8 E-mail: sedetec@ufrgs.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

USO DE AGENTES MODULADORES (GRP) PARA PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS ANTITUMORAIS, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO AGENTES MODULADORES ANTITUMORAIS, MÉTODO DE MODULAÇÃO DE TUMORES UTILIZANDO AGENTES

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: RAFAEL ROESLER
 6.2 Qualificação: DOCENTE 6.3 CPF: 73711276091
 6.4 Endereço completo: DONA LEONOR, 194/708 - RIO BRANCO, PORTO ALEGRE - RS, BR
 6.5 CEP: 6.6 Telefone: 6.7 Fax:
 6.8 E-Mail:

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- Listagem de sequências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

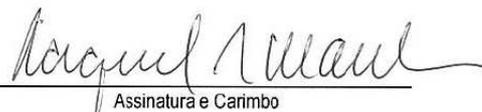
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	12 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	1 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	4 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Autorizações de cessão; Portaria de Competência; cópia Diário Oficial da União.				9 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 29 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Porto Alegre, 25/05/2012

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Profª Raquel S. Mauler
Secretária de Desenvolvimento
Tecnológico
LIFERGS

ANEXO DE DEPOSITANTES**Título: USO DE AGENTES MODULADORES (GRP) PARA PREPARAÇÃO DE
MEDICAMENTOS ANTITUMORAIS, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO...**Página 1

Nome: Hospital de Clinicas de Porto Alegre

Qualificação:

CNPJ / CPF / Número INPI: 87020517000120

Endereço Completo: Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90035-903

Telefone: 51-33598760

FAX:

E-mail:

ANEXO DE TÍTULO DA PATENTE**Título: USO DE AGENTES MODULADORES (GRP) PARA PREPARAÇÃO DE
MEDICAMENTOS ANTITUMORAIS, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO...**

Página 1

MODULADORES

ANEXO DE INVENTORES**Título: USO DE AGENTES MODULADORES (GRP) PARA PREPARAÇÃO DE
MEDICAMENTOS ANTITUMORAIS, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO...**

Página 1

Nome: CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

Qualificação: Estudante

CPF: 003.146.320-77

Endereço Completo: Rua Sarmento Leite, 781, Apto. 304 - Centro, Porto Alegre - RS, BR

CEP: 90050-170

Telefone: 51-30234824

FAX:

E-mail: carolbfarias@gmail.com

Nome: DANIELA BAUMANN CORNÉLIO

Qualificação: MÉDICA

CPF: 65414845034

Endereço Completo: CEL LUCAS DE OLIVEIRA, 1585/402 - BELA VISTA, PORTO ALEGRE - RS, BR

CEP:

Telefone:

FAX:

E-mail: DANICORNELIO@TERRA.COM.BR

Nome: GILBERTO SCHWARTSMANN

Qualificação: DOCENTE

CPF: 289.946.470-15

Endereço Completo: SANTO INACIO, 525/1201 - MOINHOS DE VENTO, PORTO ALEGRE - RS, BR

CEP: 90450-170

Telefone: 51-33954912

FAX:

E-mail: gilberto.ez@terra.com.br

Nome: ANA LUCIA ABUJAMRA

Qualificação: Biomédica

CPF: 271.634.108-75

Endereço Completo: Rua Artur Rocha, 1121, Apto. 801 - Rio Branco, Porto Alegre - RS, BR

CEP: 90620-110

Telefone: 51-33597616

FAX:

E-mail: aabujamra@hepa.ufrgs.br

11.4 Artigo Aceito para Publicação

Influence of GRPR and BDNF/Trk on the viability of breast and gynecologic cancer cells

Situação: Aceito

Revista: Molecular and Clinical Oncology

Data de aceite: 01 de agosto de 2012.

Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells

DANIELA B. CORNELIO^{1-3*}, CAROLINE B. DE FARIAS^{1-4*}, DÉBORA S. PRUSCH¹⁻³, TIAGO E. HEINEN¹⁻³, RAFAEL P. DOS SANTOS¹⁻³, ANA L. ABUJAMRA¹⁻⁴, GILBERTO SCHWARTSMANN^{1,3,5} and RAFAEL ROESLER¹⁻³

¹Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA);

²Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology,

Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul;

³National Institute for Translational Medicine (INCT-TM);

⁴Children's Cancer Institute; ⁵Department of Internal Medicine, School of Medicine,

Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received June 14, 2012; Accepted August 1, 2012

DOI: 10.3892/mco_XXXXXXX

1 **Abstract.** Neuropeptide and neurotrophin receptors are increas-
2 ingly important molecular targets in cancer. Scientific findings
3 indicate that compounds blocking gastrin-releasing peptide
4 receptors (GRPR) or tropomyosin receptor kinase (Trk) recep-
5 tors are likely to have antiproliferative activities against cancer
6 cells. The present study aimed to demonstrate that, in contrast
7 to previous findings, GRPR activation reduces, whereas its
8 blockade increases the viability of breast, ovarian and cervical
9 cancer cell lines. However, consistent with previous studies,
10 Trk inhibition was demonstrated to reduce the viability of these
11 cells. MCF-7 (breast), OVCAR-3 (ovarian) and HeLa (cervical)
12 human cancer cell lines were treated with GRP, the GRPR antag-
13 onists RC-3095 and RC-3940-II, brain-derived neurotrophic
14 factor (BDNF) and the Trk antagonist K252 α . Cell viability
15 was measured by the MTT assay. Expression of GRPR and
16 BDNF was confirmed with reverse transcription-polymerase
17 chain reaction (RT-PCR). GRP reduced, whereas RC-3940-II
18 enhanced the viability of the three cell lines. Treatment with
19 K252 α inhibited the viability of the cell lines, while BDNF
20 increased the viability of OVCAR-3 cells. The results supported
21 the hypothesis that GRPR and BDNF/TrkB signaling regulates
22 cancer cell viability. Most importantly, these findings are the
23 first to demonstrate that GRPR blockade can stimulate, rather

than inhibits the viability of breast and gynecologic cancer cell
lines.

Introduction

Increasing evidence indicates that neuropeptide and neuro-
trophin receptors and their ligands may be overexpressed
in cancer cells and are involved in cell survival and growth.
Neuropeptide receptors aberrantly expressed in several human
cancers include the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR),
activated in mammals by the bombesin-like neuropeptide
gastrin-releasing peptide (GRP). GRPR activation has been
shown to stimulate cancer cell proliferation, whereas GRPR
antagonists to reduce tumor growth in a range of experimental
cancer models (1,2). In gynecologic cancers, GRPR is likely
to be highly expressed in breast, ovarian and cervical tumors,
as well as in breast cancer cell lines, whereas its expression is
low or absent in non-neoplastic tissue and healthy cells (1,3-8).
The pharmacological blockade of GRPR by synthetic peptides
acting as selective antagonists (RC-3940-II, RC-3095) has
been shown to reduce human breast and ovarian tumor growth
xenografted into nude mice (9-11).

Additional growth factor receptors increasingly implicated
in tumor progression include tropomyosin receptor kinase
(Trk) receptors. Trks are receptor tyrosine kinases activated
endogenously by neurotrophins. TrkA, TrkB and TrkC
are the preferred receptors for nerve growth factor (NGF),
brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3
(NT-3), respectively (12). Increased BDNF and TrkB expres-
sions have recently been found in several human tumors
(13-15). BDNF/TrkB promote cancer cell survival and
resistance to chemotherapy, while small-molecule inhibi-
tors of Trk, such as K252 α , inhibit cell growth and induce
apoptotic death in cancer cells (16-19). TrkB expression has
been described in ovarian and cervical cancers (20,21), while
being associated with a shorter survival and the promotion of
metastasis in ovarian cancer patients (20). In addition, studies
using ovarian cancer cells indicated that TrkB is involved

Correspondence to: Dr Rafael Roesler, Department of Pharma-
cology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University
of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus
Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail: rafael.roesler@pq.cnpq.br

*Contributed equally

Key words: gastrin-releasing peptide receptor, brain-derived
neurotrophic factor, tropomyosin receptor kinase B, gynecologic
cancer, cancer cell

1 in cell proliferation, migration and suppression of anoikis
2 (22,23). In breast cancer, BDNF expression has been shown
3 to be higher in tumor samples compared to non-neoplastic
4 tissues, while BDNF transcript levels have been associated
5 with unfavorable pathological parameters and adverse clinical
6 outcomes (24). Moreover, BDNF has been shown to induce
7 resistance to apoptosis in breast cancer cells, while injection of
8 an anti-BDNF antibody has been proven to reduce the growth
9 of breast tumors xenografted in mice (25).

10 The present study aimed to explore the effects of GRPR
11 and TrkB ligands on the viability of human breast, ovarian
12 and cervical cancer cells *in vitro*. Notably, under the experi-
13 mental conditions used in this study, GRP produced a small,
14 but statistically significant reduction of cell viability, whereas
15 the RC-3940-II-induced GRPR blockade led to a statistically
16 significant increase in cell viability. In addition, K252 α -induced
17 Trk inhibition was found to have reduced cell viability.

18 Materials and methods

19 **Cell culture and treatments.** MCF-7, OVCAR-3 and HeLa human
20 cells were obtained from the American Type Culture Collection
21 (Rockville, MD, USA). The cells were plated in 96-well plates
22 (TPP) at a density of 4, 7 and 3x10³ cells/well in sextuplets,
23 respectively, and then cultured and maintained in Dulbecco's
24 modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, Carlsbad, CA,
25 USA) (MCF-7 and HeLa cells) and RPMI-1640 (Gibco-BRL,
26 OVCAR-3 cells), containing 2% (w/v) LH-glutamine and
27 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Sorali, Campo Grande,
28 Brazil). For the experiments GRP treatment was used, whereby
29 cells were starved for 24 h in medium supplemented with 0.5%
30 serum medium and then treated with human recombinant GRP
31 (0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
32 USA). For other treatments, 24 h after medium and serum addition,
33 the cells were treated with the GRPR antagonist [D-Tpi⁶,
34 Leu¹³ psi(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (RC-3095; 0.001, 0.01,
35 0.1, 1 or 10 μ M; Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany), the
36 GRPR antagonist [Hca⁶, Leu¹³ psi(CH₂N)-Tac14-bombesin⁶⁻¹⁴]
37 (RC-3940-II; 0.01, 0.1, 0.5, 1 or 5 μ M; Zentaris GmbH) (10),
38 human recombinant BDNF (1, 10 or 100 ng/ml; Sigma-Aldrich)
39 or K252 α (0.01, 0.1 or 1 μ M, Sigma-Aldrich). The cells were
40 kept at a temperature of 37°C, in a minimum relative humidity
41 of 95% and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

42 **MTT assay.** The cell viability was measured using
43 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
44 (MTT; Sigma-Aldrich) 48 h subsequent to treatment. Eleven
45 microliters of MTT 5 mg/ml solution were added to each well
46 of the plate, followed by incubation for 4 h at 37°C. The plate
47 was left at room temperature until completely dry. Dimethyl
48 sulfoxide was added and the absorbance was measured at
49 492 nm in a multiplate reader. The experiments were performed
50 at least in triplicate.

51 **Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).**
52 Total RNA was extracted from MCF-7, OVCAR-3 and
53 HeLa cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA,
54 USA), in accordance with the manufacturer's instructions,
55 and reverse transcribed with SuperScript[®] III First-Strand
56 Synthesis SuperMix[®] (Invitrogen). The human BDNF and

61 GRPR primers were designed according to the corresponding
62 GenBank sequence. The forward and reverse primers used for
63 RT-PCR amplification are shown in Table I. The PCR experi-
64 ments were carried out with 1.5 mM MgCl₂, 0.1 μ M for each
65 primer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 M betain (only to BDNF primers),
66 1 unit Taq Platinum[®] (Invitrogen) and 2 μ l cDNA template.
67 The expression of β -actin was measured as an internal control
68 using the primers shown in Table I. The PCR reaction was
69 performed in a total volume of 20 μ l using a concentration
70 of 0.04 mM dNTPs, 0.2 units Taq polymerase in the supplied
71 reaction buffer, 0.3 mM MgCl₂ and 10 pmol of each primer.
72 Amplification conditions consisted of 1 min at 95°C followed
73 by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing
74 at 59°C for 30 sec, extension of primers at 72°C for 45 sec,
75 followed by a final extension at 72°C for 10 min. The prod-
76 ucts of BDNF (362 bp), GRPR (190 bp) and β -actin (190 bp)
77 were electrophoresed through 2% agarose gels, stained with
78 ethidium bromide and visualized under ultraviolet illumina-
79 tion (17,26,27). Each experiment was performed twice using
80 RNA isolated from two independent cell cultures.

81 **Statistical analysis.** Data were shown as the mean \pm SEM.
82 Differences between the mean values were evaluated by
83 one-way analysis of variance followed by Tukey *post hoc* tests,
84 when appropriate. In the comparisons, P<0.05 was considered
85 to indicate a statistically significant difference.

86 Results

87 **GRPR activation reduced, whereas GRPR blockade increased**
88 **the viability of MCF-7, OVCAR-3 and HeLa cells.** Treatment
89 with recombinant GRP induced a small (range, 11.3-36.0%),
90 yet statistically significant reduction of cell viability in the three
91 cell lines studied (Fig. 1A). Viability was reduced by GRP at all
92 the doses used in MCF-7 cells, with the exception of 0.001 μ M
93 in OVCAR-3 cells and only at 1 μ M in HeLa cells (Fig. 1B).
94 The GRPR antagonist RC-3940-II led to increases ranging
95 from 200.1 to 476.8% in the viability of all three cell lines, at all
96 doses used, with the exception of the 0.01 μ M in OVCAR-3 and
97 the 5 μ M in HeLa cells. The less potent (10) GRPR antagonist
98 RC-3095 demonstrated an increase of ~24% in the viability of
99 OVCAR-3 cells, however, no statistically significant effect was
100 observed in OVCAR-3 or HeLa cells (Fig. 1C). Given these
101 negative findings, RC-3095 in MCF-7 cells was not tested.
102 These results indicated that GRPR activation reduced, whereas
103 GRPR blockade increased the viability of MCF-7, OVCAR-3
104 and HeLa cells.

105 **Trk inhibition reduced the viability of MCF-7, OVCAR-3 and**
106 **HeLa cells.** Treatment with BDNF had no significant effect on
107 cell viability, except for a small effect at a dose of 1 ng/ml in
108 OVCAR-3 cells (Fig. 2A). The Trk inhibitor K252 α demon-
109 strated a notable inhibitory effect on cell viability (ranging
110 from 13.5 to 44.6%), at a dose of 1 μ M in the three cell lines,
111 and at a dose of 0.01 μ M in MCF-7 cells (Fig. 2B). These results
112 indicated that Trk inhibition reduced the viability of MCF-7,
113 OVCAR-3 and HeLa cells in a dose-dependent manner.

114 **GRPR and BDNF expression in MCF-7, OVCAR-3 and**
115 **HeLa cells.** RT-PCR analyses demonstrated that MCF-7,
116 OVCAR-3 and HeLa cells expressed GRPR and BDNF mRNA.

Table I. Forward and reverse primers used for RT-PCR amplification.

Gene	Primer sequences	PCR product size (bp)
GRPR	Forward: 5'-CAAGATCTTCTGCACGGTCA-3' Reverse: 5'-TCAGTTTGCAGCCAATTCTG-3'	190
BDNF	Forward: 5'-GCGTGAATGGGCCCAAGGCAGG-3' Reverse: 5'-TGTGACCGTCCC GCCGACATG-3'	362
β -actin	Forward: 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' Reverse: 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'	190

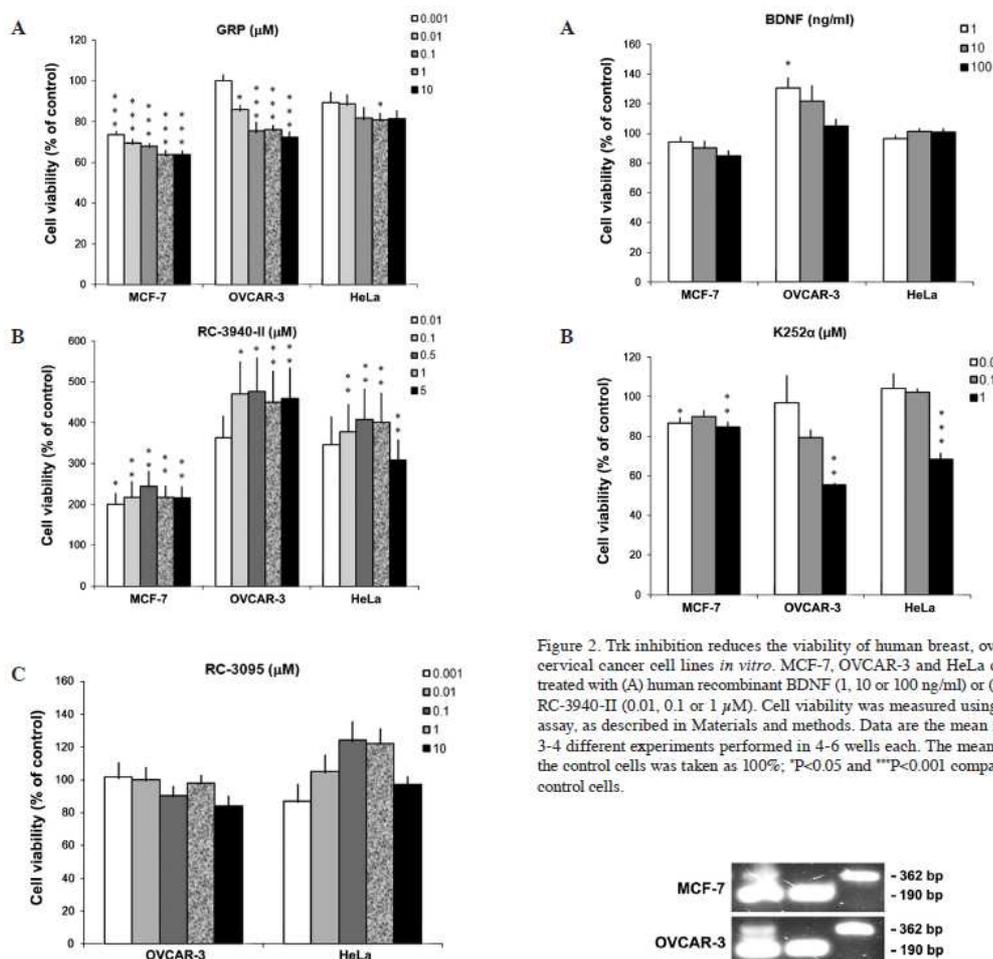


Figure 1. A GRPR agonist reduces, whereas a GRPR antagonist increases the viability of human breast, ovarian and cervical cancer cell lines *in vitro*. MCF-7, OVCAR-3 and HeLa cells were treated with (A) human recombinant GRP (0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 μ M); (B) RC-3940-II (0.01, 0.1, 0.5, 1 or 5 μ M) and (C) RC-3095 (0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 μ M). RC-3095 was tested in OVCAR-3 and HeLa cells only. Cell viability was measured using an MTT assay, as described in Materials and methods. Data are the mean \pm SEM of 3-5 different experiments performed in 4-6 wells each. The mean value for the control cells was taken as 100%; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to control cells.

Figure 2. Trk inhibition reduces the viability of human breast, ovarian and cervical cancer cell lines *in vitro*. MCF-7, OVCAR-3 and HeLa cells were treated with (A) human recombinant BDNF (1, 10 or 100 ng/ml) or (B) K252 α RC-3940-II (0.01, 0.1 or 1 μ M). Cell viability was measured using an MTT assay, as described in Materials and methods. Data are the mean \pm SEM of 3-4 different experiments performed in 4-6 wells each. The mean value for the control cells was taken as 100%; *P<0.05 and ***P<0.001 compared to the control cells.

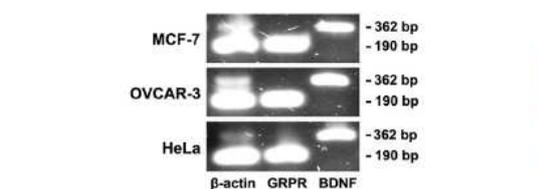


Figure 3. RT-PCR analysis of GRPR and BDNF mRNA expression in MCF-7, OVCAR-3 and HeLa human cancer cells is shown. RNA was extracted from the cells and RT-PCR analysis was performed, as described in Materials and methods. Transcript sizes of 190 and 362 bp were identified, representing fragments of GRPR and BDNF, respectively.

VCAR-3 and HeLa cells showed an mRNA expression for both GRPR and BDNF. Transcript sizes of 190 and 362 bp, representing fragments of GRPR and BDNF, respectively, were identified in the cells (Fig. 3).

Discussion

The most important finding of the present study is that, in contrast to findings of previous studies (1,2,9-11), pharmacological blockade of the GRPR exhibited an enhancing, rather than an inhibitory action on cancer cells, whereas GRP decreased cell viability. In addition, Trk inhibition was found to reduce the viability of the breast, ovarian and cervical cancer cell lines used, although treatment with BDNF did not alter cell viability.

GRPR antagonists have been previously shown to reduce experimental breast and ovarian tumor growth *in vivo* (9-11). However, the effects of the GRPR agonists and antagonists on cancer cell growth depends markedly on specific cell culture and experimental conditions. Consistent with these hypotheses, Yano *et al.* (28) found that bombesin (showing a GRPR agonistic action comparable to that of GRP) at doses ranging from 0.001 to 1 μ M stimulated, while RC-3095 at doses between 0.01 and 10 μ M inhibited the proliferation of human breast cancer cell lines only when cells were cultured in heat-inactivated and dextran-coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS), but not in the presence of untreated FBS. Additionally, MCF-7 cells failed to respond to bombesin or RC-3095 in the presence of either FBS or DCC-FBS. The authors of that study suggested that bombesin-like peptides or other growth factors present in the culture medium may compete with GRPR ligands, thus altering the cell response to the treatments. Authors of other studies (29) found that bombesin failed to affect MCF-7 cell proliferation, although the cells expressed GRP binding sites, while bombesin stimulated calcium mobilization and inositol lipid hydrolysis. Discrepancies among different studies might be due to differences in cell clones, cell culture conditions and methods used to assess proliferation and viability (e.g., trypan blue dye exclusion vs. MTT) in different laboratories.

In a previous study using Neuro2A mouse neuroblastoma cells, a lower dose of RC-3095 was found to reduce, while a higher dose to increase cell viability (30). Notably, in experiments examining cancer cell growth (27,30,31), as well as in other experimental models (32-34), GRPR agonists and antagonists often show drug-response patterns, in which intermediate doses have more pronounced biological, whereas higher doses have no or even contrary effects. Moreover, the lack of a significant effect of RC-3095 in the present study might be owed to its lower potency compared to RC-3940-II. The latter has been shown to inhibit cancer cell proliferation at lower dose ranges, and was more effective compared to RC-3095, in inhibiting experimental breast cancer cell growth (10). Taken together, these data raise the possibility that GRPR agonists and antagonists have highly varying effects depending on the dose and the presence of endogenous GRP, as well as other factors in the tissue micro-environment, with potential implications of their effects *in vivo* in both experimental animals and patients undergoing clinical studies.

Although several molecular mechanisms downstream of GRPR activation have been described and proposed to mediate GRPR-induced cancer cell growth regulation, the mechanisms underlying the stimulatory effects of GRPR blockade on cancer cells observed in the present study and previous experiments (30) remain unknown and have yet to be investigated in future studies. Cell responses to GRPR activation are mediated by multiple protein kinase pathways, including phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) cascades (35). Studies focusing on experimental breast and gynecologic cancers have demonstrated that GRPR is associated with cell migration and interleukin-8 expression in breast tumors (36), whereas GRPR antagonists reduce ErbB-2/HER-2 expression in breast cancer cells and epidermal growth factor receptor (EGFR), as well as c-jun and c-fos oncogenes in experimental breast and ovarian tumors (9,11,38).

BDNF/TrkB signaling has been suggested to promote cancer cell survival and resistance to chemotherapy (12-14). Previous studies on breast and ovarian cancer cells have suggested that BDNF/TrkB stimulates cell survival and migration (20,22,23,25). BDNF is likely not to enhance viability since the BDNF/TrkB pathway is already activated at its optimal level by BDNF secreted from the cells as an autocrine factor. The possibility that BDNF is secreted as an autocrine factor from cultured cells would be consistent with our finding that the three cell lines expressed mRNA for BDNF. Results of this study demonstrating that K252 α decreased cell viability are consistent with the hypothesis that TrkB needs to be further examined as a potential anticancer target in breast and gynecologic cancers. Since TrkB has the potential to crosstalk with GRPR and other growth factor receptors, including EGFR, in regulating cancer cell survival and proliferation (17,22), combining compounds acting on different receptors might prove to be the most effective strategy to inhibit tumor growth by targeting neuropeptide and neurotrophin signaling.

In conclusion, the present study is the first to demonstrate that, at least under certain experimental conditions, GRPR activation negatively regulates the viability of breast, ovarian and cervical cancer cells *in vitro*. In addition, these findings are consistent with the hypothesis that Trk signaling regulates the viability of breast and gynecologic cancer cells. Experimental findings suggesting that there are conditions under which GRPR blockade stimulates cell viability and proliferation are likely to have implications for the clinical testing of GRPR antagonists as potential anticancer medications. Based on the *in vitro* findings reported in this study, additional studies using *in vivo* models and tumor samples from patients are required in order to examine the potential inhibitory role of GRPR activation in breast and gynecologic cancer development.

Acknowledgements

This study was financed by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; no. 303703/2009-1 to R.R.); the National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); FAPERGS/CNPq grant no. 10/0044-3-PRONEX; the University Hospital Research Fund (FIPE/HCPA); the

1 South American Office for Anticancer Drug Development and
2 the Children's Cancer Institute (ICI-RS).

3
4 **References**

1. Cornelio DB, Roesler R and Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18: 1457-1466, 2007.
2. Patel O, Shulkes A and Baldwin GS: Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766: 23-41, 2006.
3. Cornelio DB, Meurer L, Roesler R and Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology* 73: 340-345, 2007.
4. Cornelio DB, Meurer L, Schwartzmann G and Roesler R: The gastrin-releasing peptide receptor as a marker of dysplastic alterations in cervical epithelial cells. *Oncology* 82: 90-97, 2012.
5. Giacchetti S, Gauvillé C, de Crémoux P, *et al*: Characterization, in some human breast cancer cell lines, of gastrin-releasing peptide-like receptors which are absent in normal breast epithelial cells. *Int J Cancer* 46: 293-298, 1990.
6. Gugger M and Reubi JC: Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. *Am J Pathol* 155: 2067-2076, 1999.
7. Halmos G, Wittliff JL and Schally AV: Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Res* 55: 280-287, 1995.
8. Sun B, Schally AV and Halmos G: The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept* 90: 77-84, 2000.
9. Chatzistamou I, Schally AV, Szepeshazi K, *et al*: Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Cancer Lett* 171: 37-45, 2001.
10. Miyazaki M, Lamharzi N, Schally AV, *et al*: Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095. *Eur J Cancer* 34: 710-717, 1998.
11. Yano T, Pinski J, Szepeshazi K, *et al*: Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 on the growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* 73: 1229-1238, 1994.
12. Huang EJ and Reichardt LF: Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-642, 2003.
13. Desmet CJ and Peeper DS: The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 63: 755-759, 2006.
14. Roesler R, de Farias CB, Abujamra AL, Brunetto AL and Schwartzmann G: BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Rev Anticancer Ther* 11: 1473-1475, 2011.
15. Thiele CJ, Li Z and McKee AE: On Trk - the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 15: 5962-5967, 2009.
16. Akil H, Perraud A, Melin C, Jauberteau MO and Mathonnet M: Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor, TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival. *PLoS One* 6: e25097, 2011.
17. de Farias CB, Rosemberg DB, Heinen TE, *et al*: BDNF/TrkB content and interaction with gastrin-releasing peptide receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 79: 430-439, 2010.
18. Li Z, Oh DY, Nakamura K and Thiele CJ: Perifosine-induced inhibition of Akt attenuates brain-derived neurotrophic factor/TrkB-induced chemoresistance in neuroblastoma in vivo. *Cancer* 117: 5412-5422, 2011.
19. Perez-Pinera P, Hernandez T, García-Suárez O, *et al*: The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem* 295: 19-26, 2007.
20. Au CW, Siu MK, Liao X, *et al*: Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Lett* 281: 151-161, 2009.
21. Moon A, Won KY, Lee JY, *et al*: Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology* 43: 453-458, 2011.
22. Qiu L, Zhou C, Sun Y, *et al*: Crosstalk between *EGFR* and *TrkB* enhances ovarian cancer cell migration and proliferation. *Int J Oncol* 29: 1003-1011, 2006.
23. Yu X, Liu L, Cai B, He Y and Wan X: Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci* 99: 543-552, 2008.
24. Patani N, Jiang WG and Mokbel K: Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological and clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 11: 23, 2011.
25. Vanhecke E, Adriaenssens E, Verbeke S, *et al*: 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: 1741-1752, 2011.
26. de Farias CB, Lima RC, Lima LO, *et al*: Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 75: 27-31, 2008.
27. Flores DG, de Farias CB, Leites J, *et al*: Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 5: 99-105, 2008.
28. Yano T, Pinski J, Groot K and Schally AV: Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 4545-4547, 1992.
29. Patel KV and Schrey MP: Activation of inositol phospholipid signaling and Ca²⁺ efflux in human breast cancer cells by bombesin. *Cancer Res* 50: 235-239, 1990.
30. Abujamra AL, Almeida VR, Brunetto AL, Schwartzmann G and Roesler R: A gastrin-releasing peptide receptor antagonist stimulates Neuro2a neuroblastoma cell growth: prevention by a histone deacetylase inhibitor. *Cell Biol Int* 33: 899-903, 2009.
31. Pinski J, Schally AV, Halmos G, *et al*: Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res* 54: 5895-5901, 1994.
32. Czepelewski RS, Porto BN, Rizzo LB, *et al*: Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 547-552, 2012.
33. Roesler R, Luft T, Oliveira SH, *et al*: Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 51: 350-357, 2006.
34. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, *et al*: Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 24: 1069-1074, 2003.
35. Jensen RT, Batten JF, Spindel ER and Benya RV: International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60: 1-42, 2008.
36. Chao C, Ives K, Hellmich HL, Townsend CM Jr and Hellmich MR: Gastrin-releasing peptide receptor in breast cancer mediates cellular migration and interleukin-8 expression. *J Surg Res* 156: 26-31, 2009.
37. Bajo AM, Schally AV, Krupa M, *et al*: Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3836-3841, 2002.
38. Chatzistamou I, Schally AV, Sun B, Armatis P and Szepeshazi K: Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancers and c-jun and c-fos oncogene expression by bombesin antagonists. *Br J Cancer* 83: 906-913, 2000.

12 CURRICULUM VITAE Resumido

Nome em citações bibliográficas FARIAS, C. B.;
Farias, Caroline Brunetto;
de Farias, C. B.;
Brunetto de Farias, Caroline;
De Farias, Caroline B.;
de Farias, Caroline Brunetto

Dados Pessoais

Nome **Caroline Brunetto de Farias**

Nascimento 07/11/1982 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço profissional Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Laboratório de Pesquisas em Câncer
Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, Centro de Pesquisas
Experimentais
Santana - Porto Alegre
90035-903, RS - Brasil
Telefone: 51 2101.7616

Endereço eletrônico carolbfarias@gmail.com
cbfarias@zielbiosciences.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 - Atual** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Orientador: Rafael Roesler
- 2005 - 2008** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Título: Interação Funcional entre o receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina e a Via de Sinalização do cAMP/PKA: um estudo *in vitro* e *in vivo*.
Ano de obtenção: 2008
Orientador: Rafael Roesler
- 2004 - 2008** Especialização em Biologia Celular e Molecular.
Conselho Federal de Biologia, CFB, Brasília, Brasil.
Título: Experiência Profissional (mínimo de 5 anos)
- 2001 - 2004** Graduação em Bacharelado Em Ciências Habilitação em Biologia.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil.
Título: A Utilização da Cultura Celular para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer
Orientador: Adriana Brondani da Rocha
-

Atuação Profissional

1. Ziel Biosciences Pesquisa, Desenvolvimento e Diagnóstico LTDA

2010 - Atual Vínculo: Sócio-fundador. Enquadramento funcional: Diretora de Pesquisa e Desenvolvimento. Regime: Parcial.
Criou e fundou a Ziel Biosciences, Pesquisa, Desenvolvimento e Diagnóstico LTDA em parceria com outras duas sócias, Ana Lúcia Abujamra e Daniela Baumann Cornélio. Empresa incubada no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Instituto do Câncer Infantil do RS (ICI-RS)

Atividade: Laboratório de Pesquisas em Câncer - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

2008 - Atual Vínculo: Pesquisador. Enquadramento funcional: Biólogo. Regime: Integral
2005 - 2008 Vínculo: Pesquisador-bolsista. Enquadramento funcional: Biólogo. Regime: Integral.

Atividades

2011 - Atual Projetos de pesquisa, Laboratório de Pesquisas em Câncer
➤ Estudo sulamericano para o tratamento de pacientes com tumores da família Ewing metastático e não-metastático.

2010 - Atual Projetos de pesquisa, Laboratório de Pesquisas em Câncer
➤ Identificação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de terapias-alvo para o tratamento de sarcoma de Ewing e outros tumores pediátricos neuroectodérmicos: um estudo molecular e celular.
➤ Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas isoladas de *Hypericum carinatum*.
➤ Expressão dos receptores IGF-I e IGF-II nas neoplasias pediátricas.

2009 - Atual Projetos de pesquisa, Laboratório de Pesquisas em Câncer
➤ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina
➤ Estudo dos efeitos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* sobre a proliferação e viabilidade de linhagens celulares.
➤ Papel de receptores de neuropeptídeos e vias de sinalização envolvidas no crescimento de meduloblastomas.
➤ Papel de inibidores de desacetilase de histona e associações com outros fármacos na proliferação de linhagens de meduloblastoma.
➤ Avaliação dos níveis séricos de BDNF em pacientes portadores e não portadores de neoplasias.

2008 - 2010 Projetos de pesquisa, Laboratório de Pesquisas em Câncer
➤ Avaliação do efeito sinérgico do antagonista sintético do receptor do peptídeo liberador de gastrina, RC - 3095, com cisplatina em tumores sólidos.
➤ Avaliação da expressão de neurotrofinas e seus receptores em tecido tumoral carcinomatóide humano.
➤ Mecanismos de sinalização celular envolvidos na resposta proliferativa induzida pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em linhagens celulares de tumores pediátricos.
➤ Mecanismos de sinalização celular envolvidos no crescimento tumoral induzido pela ativação de receptores GRP em tumores neuroectodérmicos.

2007 - 2009 Projetos de pesquisa, Laboratório de Pesquisas em Câncer
➤ Mecanismos de sinalização celular envolvidos na resposta proliferativa

- induzida pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em linhagens celulares de tumores pediátricos.
- Análise da diferença de expressão gênica entre mucosa gástrica normal, metaplasia e câncer gástrico por cDNA microarray.
 - Mecanismos de sinalização celular envolvidos no crescimento tumoral induzido pela ativação de receptores GRP em gliomas.
 - Avaliação da atividade da telomerase em sangue de pacientes com o diagnóstico de tumores da família do Sarcoma de Ewing.
 - Avaliação da atividade da telomerase em sangue de pacientes com o diagnóstico de leucemia linfóide aguda.
 - Efeitos do bloqueio do receptor do peptídeo liberador de gastrina sobre a proliferação de células de tumores pediátricos neuroectodérmicos.
 - Mecanismos de transdução de sinal envolvidos nas respostas celulares à ativação de receptores de bombesina/GRP em gliomas.
- 2007 - Atual** Projetos de pesquisa, Centro de Pesquisas Básicas, Laboratório de Pesquisas Em Câncer
- Avaliação do efeito de antagonistas NMDA sobre linhagens tumorais pediátricas humanas.
 - Estudo Genético Epidemiológico em Sarcoma de Ewing: Genes Candidatos a Polimorfismo.
- 2005 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento
- Banco de Tumores Pediátricos , Estudo Genético e Epidemiológico em Sarcoma de Ewing: Genes Candidatos a Polimorfismo.
-

3. Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

- 2004 - 2004** Vínculo: Bolsista I.C. Enquadramento funcional: Voluntário. Regime: Integral.
- 2003 - 2003** Vínculo: Bolsista I.C. Enquadramento funcional: Remunerado. Fonte financiadora: ULBRA. Regime: Integral.
- 2002 - 2002** Vínculo: Bolsista I.C. Enquadramento funcional: Remunerado. Fonte financiadora: ULBRA. Regime: Integral.
- 2001 - 2001** Vínculo: Bolsista I.C. Enquadramento funcional: Voluntário. Regime: Integral.
-

Atividades

- 2004 - 2004** Projetos de pesquisa, Centro de Pesquisas Em Ciências Médicas
- Investigação de processos neurotóxicos mediado pelo glutamato em linhagens derivadas de gliomas humanos
- 2003 - 2003** Projetos de pesquisa, Centro Integrado do Câncer (CINCAN)
- Investigação de Processos Neurotóxicos Mediados pelo Glutamato
- 2002 - 2004** Projetos de pesquisa, Centro Integrado do Câncer (CINCAN)
- Investigação dos mecanismos moleculares associados à radioresistência de gliomas humanos.
- 2001 - 2004** Projetos de pesquisa, Centro Integrado do Câncer (CINCAN)
- Investigação de Mecanismos Moleculares Associados à Progressão dos Gliomas Humanos
-

Revisor de Periódico

1. **Oncology (Basel) - 2011**
 2. **Plos One - 2010**
 3. **Molecular and Cellular Biochemistry - 2010**
-

Prêmios

- | | |
|-------------|--|
| 2012 | I Congresso Pan-Americano de Câncer Gástrico, Fórum Mundial de Câncer Gástrico, I SICAD – modalidade pôster. |
| 2010 | Finalista do Prêmio Santander de Empreendedorismo. |
| 2008 | Prêmio Rhomes Aur, Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE) |
-

Produção Bibliográfica

Artigos completos aceitos para publicação em periódicos

1. **de Farias, C. B.**; Heinen, T. E.; dos Santos, R. P.; Abujamra, A. L.; Schwartzmann, G. & Roesler, R. BDNF/TrkB signaling protects HT-29 human colon cancer cells from EGFR inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Ms. Nº: BBRC-12-4632).
2. Cornelio, D. B.; de Farias, C. B.; Prusch, D. S.; Heinen, T. E.; dos Santos, R. P.; Abujamra, A. L.; Schwartzmann, G. & Roesler, R. Influence of GRPR and BDNF/TrkB signaling on the viability of breast and gynecologic cancer cells. *Molecular and Clinical Oncology* (MS Nº.: MCO-089-E105748).

Artigos completos publicados em periódicos

1. Roesler, Rafael, **de Farias, Caroline Brunetto**, Abujamra, Ana Lucia, Brunetto, Algimir Lunardi, Schwartzmann, Gilberto. BDNF/TrkB signaling as an anti-tumor target. *Expert Review of Anticancer Therapy*. , v.11, p.1473 - 1475, 2011. [[doi:10.1586/era.11.150](https://doi.org/10.1586/era.11.150)]
2. Pardo-Andreu, G.L., Maurmann, N., Reolon, G K, **Farias, C. B.**, Delgado, R., Roesler, Rafael. Effect of mangiferin, a naturally occurring glucoylxanthone, on fear memory in rats. *Arzneimittel-Forschung*. , v.61, p.382 - 385, 2011.
3. Nery, Laura R., Rodrigues, Mariana M., Rosemberg, Denis B., Bogo, Maurício R., **De Farias, Caroline B.**, Abujamra, Ana L., SCHWARTSMANN, Gilberto, ROESLER, Rafael, Vianna, Mônica R.M. Regulation of E-cadherin expression by growth factor receptors in cancer cells. *Journal of Surgical Oncology (Print)*. , p.n/a - n/a, 2011. [[doi:10.1002/jso.21898](https://doi.org/10.1002/jso.21898)]
4. Nör, Carolina, **Farias, Caroline Brunetto**, Abujamra, Ana Lucia, SCHWARTSMANN, Gilberto, BRUNETTO, Algimir Lunardi, Roesler, Rafael. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. *Child's Nervous System (Print)*. , p.x - x, 2011. [[doi:10.1007/s00381-011-1439-4](https://doi.org/10.1007/s00381-011-1439-4)]
5. **Brunetto de Farias, Caroline**, Rosemberg, Denis Broock, Heinen, Tiago Elias, Koehler-Santos, Patricia, Abujamra, Ana Lucia, Kapczinski, Flávio, Brunetto, Algimir Lunardi, Ashton-Prolla, Patricia, Meurer, Luise, Reis Bogo, Maurício, Damin, Daniel C., Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael. BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Oncology*. , v.79, p.430 - 439, 2010.

6. Roesler, Rafael, Brunetto, André T, Abujamra, Ana Lucia, **de Farias, Caroline Brunetto**, Brunetto, Algimir Lunardi, Schwartzmann, Gilberto. Current and emerging molecular targets in glioma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. , v.10, p.1735 - 1751, 2010. [doi:10.1586/era.10.167]
 7. Goulart, B. K., Lima, M. N. N., **Farias, C. B.**, Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schroder, N. and Roesler, R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*. , v.167, p.969 - 973, 2010.
 8. Pardo-Andreu, G.L., Maurmann, N., Reolon, G K, **Farias, C. B.**, Schwartzmann, G., Delgado, R., Roesler, R. Mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*. , v.635, p.124 - 128, 2010.
 9. Schmidt, Anna Laura, **Farias, Caroline Brunetto**, Abujamra, Ana Lucia, Kapczinski, Flávio, Schwartzmann, Gilberto, Brunetto, Algimir Lunardi, Roesler, Rafael. BDNF and PDE4, but not the GRPR, Regulate Viability of Human Medulloblastoma Cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. , v.40, p.303 - 310, 2009.
 10. Schmidt, A. L., **de Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Roesler, R. Phosphodiesterase-4 Inhibition and Brain Tumor Growth. *Clinical Cancer Research*. , v.15, p.3238 - 3238, 2009. [doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0097]
 11. **Farias, C. B.**, Stertz, L, Lima, R.C., Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael. Reduced NGF Secretion by HT-29 Human Colon Cancer Cells Treated with a GRPR Antagonist. *Protein and Peptide Letters*. , v.16, p.650 - 652, 2009.
 12. Flores, D. G., **Farias, C. B.**, Leites, J., Oliveira, M. S., Lima, R.C., Leone, Luciane Pons Di, Meurer, L., Brunetto, Algimir L, Schwartzmann, Gilberto, Lenz, G., Roesler, Rafael. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.. *Current Neurovascular Research*. , v.5, p.99 - 105, 2008.
 13. **Farias, C. B.**, Cruz Lima, Rodrigo, Otero Lima, Luciana, Gazzana Flores, Debora, Meurer, Luise, Lunardi Brunetto, Algimir, Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael. Stimulation of Proliferation of U138-MG Glioblastoma Cells by Gastrin-Releasing Peptide in Combination with Agents That Enhance cAMP Signaling. *Oncology (Basel)*. , v.75, p.27 - 31, 2008.
 14. Fernando, Augusta, **Brunetto de Farias, Caroline**, Roesler, Rafael, Schwartzmann, Gilberto. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Colorectal Cancer: A Potential Therapeutic Role for Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonists. *Oncology (Basel)*. , v.72, p.160 - 161, 2007.
 15. Roesler, R, Luft, T, Oliveira, S, **Farias, C. B.**, Almeida, V., Quevedo, J., Pizzol, F., Schroder, N., Izquierdo, I., Schwartzmann, G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*. , v.51, p.350 - 357, 2006.
 16. Regner, Andrea, Schunemann, Daniel Pretto, Grivicich, Ivana, Diel, Celito Luis, **Farias, Caroline Brunetto**, Kowaleski, Giovana, Mondadori, Edlaine, Schwartzmann, Gilberto, Rocha, Adriana Brondani Da
Effects of toxic doses of glutamate on Cu²⁺Zn and Mn/superoxide dismutases activities in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*. , v.71, p.9 - 17, 2005.
 17. Rocha, Adriana Brondani Da, Regner, Andréa P, Grivicich, Ivana, Schunemann, Daniel Pretto, Diehl, Celito L, Kowaleski, Giovana, **Farias, C. B.**, Mondadori, Edlaine, Almeida, Leonardo L De, Braga Filho, Aroldo, Schwartzmann, Gilberto. Radioresistance is Associated to Increased Hsp70 Content in Human Glioblastoma Cell Lines. *International Journal of Oncology*. , v.25, p.777 - 785, 2004.
-

Capítulos de Livros Publicados

1. **Brunetto de Farias, Caroline**, Abujamra, A.L.

BANCO DE TECIDOS NEOPLÁSICOS EM ONCOLOGIA PEDIÁTRICA In: **Oncologia Pediátrica: uma abordagem multiprofissional**. 1 ed. São Paulo : Editora Martinari, 2011.

Artigos em Jornal de Notícias e Revistas

1. Roesler, Rafael, **de Farias, Caroline Brunetto**, Schwartzmann, Gilberto

Brain-derived protein in colorectal cancer. News Medical. , 2011.

2. Roesler, Rafael, **de Farias, Caroline Brunetto**, Schwartzmann, Gilberto

Proteína do cérebro que ajuda memória atrapalha quimioterapia. Folha de São Paulo. São Paulo, 2011.

3. Roesler, Rafael, **de Farias, Caroline Brunetto**, Schwartzmann, Gilberto. A potential novel drug-target for colorectal cancer treatment comes from the brain. Science Daily. , 2011.

4. Roesler, R, **Farias, C. B.**

BDNF signaling found in colorectal cancer may become new therapeutic target. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. , p.299 - 299, 2011.

5. Roesler, Rafael, **de Farias, Caroline Brunetto**, Schwartzmann, Gilberto

Brain protein may be useful target in colorectal cancer. BioQuick News. , 2011.

6. **Farias, C. B.**, Roesler, Rafael

Brain-derived neurotrophic factor signaling found in colorectal cancer may hold potential as novel therapeutic target. Expert Review of Anticancer Therapy. , p.821 - 821, 2011.

Trabalhos Publicados em Anais de Eventos (resumo)

1. Roesler, R, Nör, Carolina, Jaeger, M. C., **Farias, C. B.**, Abujamra, A.L., Schwartzmann, G, Brunetto, A. L. Inhibition of histone deacetylase or DNA topoisomerase II reduces the viability of human neuroectodermal cells. In: 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010, San Diego. **40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**. Society for Neuroscience Abstracts, 2011. p.262.28 - 262.28

2. **Farias, C. B.**, Heinen, T. E., Santos, R. P., Pinhatti, A. V., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G, Abujamra, A. L., Roesler, R. O Papel de BDNF em Processos de Quimiorresistência em Câncer Colorretal Humano. Simpósio Novas Fronteiras da Biologia Celular, 2011, Porto Alegre.

3. Prusch, D.S., **Farias, C. B.**, Cornelio, D. B., Heinen, T. E., Santos, R. P., Abujamra, A. L., Schwartzmann, G, Roesler, R. O Papel de GRP/GRPR em Linhagens Celulares de Tumores Femininos In: 31° Semana Científica do HCPA, 2011, Porto Alegre.

4. Prusch, D.S., **de Farias CB**, Rosemberg, Denis B., Heinen, T. E., Koehler-Santos, Patricia, Abujamra, A. L., KAPCZINSKI, F., Brunetto, A. L., Ashton-Prolla, Patricia, MEURER, L., Bogo, Maurício R., DAMIN, D. C., Schwartzmann, G., Roesler, R. Avaliação da Expressão de GRPR e TrkB em Câncer Colorretal Humano. 2010. In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Porto Alegre, 2010.

5. Prusch, D.S., **de Farias CB**, Rosemberg, Denis B., Heinen, T. E., Abujamra, A. L., Kapczinski, F., Brunetto, A. L., Ashton-Prolla, Patricia, Meurer, L., Bogo, Maurício R., Schwartzmann, G., Roesler, R. Regulação dos Níveis de Neurotrofinas pelo Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina em Células de Câncer Colorretal Humano. In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Porto Alegre, 2010.

6. Rodrigues, F. O., **Farias, C. B.**, Prusch, D.S., Abujamra, A. L., Roesler, R., Brunetto, A. L., Gregianin, Lauro José. Avaliação dos Níveis Séricos de BDNF em Crianças e Adolescentes com Neoplasia In: 30° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Porto Alegre, 2010.
7. **Farias, C. B.**, Pinhatti, A. V., Barros, F.M.C., Roesler, R., von Poser, G. L. Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas isoladas de *Hypericum carinatum*, 2010. In: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia, Rio de Janeiro, 2010. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.
8. Almeida, V R, Zanirati, G.G., Prusch, D.S., Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G, Brunetto, A. L., Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A.S., Roesler, R. O Canabidiol Reduz a Viabilidade Celular em Linhagem de Neuroblastoma, 2010. In: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia, Rio de Janeiro, 2010. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.
9. **Farias, C. B.**, Stertz, L, Kapczinski, F., Schwartzmann, G, Roesler, R. Redução da Secreção de NGF na Linhagem Celular de Câncer Colorretal Humana, HT-29, Tratada com Antagonista de GRPR, 2010. In: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia, Rio de Janeiro, 2010. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.
10. Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A.L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. Redução da Viabilidade de Células de Meduloblastoma Humano por um Inibidor de Desacetilase de Histona Combinado com BDNF, 2010. In: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia, Rio de Janeiro, 2010. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.
11. **Farias, C. B.**, Heinen, T. E., Santos, R. P, Prusch, D.S., Abujamra, A.L., Kapczinski, F., Brunetto, A. L., Damin, Daniel C., Schwartzmann, G, Roesler, R. Avaliação dos Níveis de BDNF em Tecido de Pacientes com Câncer Colorretal. In: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia, Rio de Janeiro, 2010. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.
12. Heinen, T. E., **Farias, C. B.**, Prusch, D.S., Abujamra, A. L., Roesler, R., Veiga, A. B. G., Alexandre, C.O.P. Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
13. Jaeger, M. C., Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. Expressão de Neuromedina B e seu Receptor em Células de Meduloblastoma Humano, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
14. Almeida, V R, Zanirati, G.G., Prusch, D.S., Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Zuardi, A. W., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A.S., Roesler, R. O Canabidiol Reduz a Viabilidade Celular em Linhagem de Neuroblastoma, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
15. Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. Redução da Viabilidade de Células de Meduloblastoma Humano por um Inibidor de Desacetilase de Histona Combinado com BDNF, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
16. Nör, Carolina, **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. Redução da Viabilidade de Células de Meduloblastoma Humano por um Inibidor de Desacetilase de Histona Sozinho ou em Combinação com Etoposide, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
17. Rodrigues, F. O., **Farias, C. B.**, Prusch, D.S., Abujamra, A. L., Roesler, R, Brunetto, A. L., Gregianin, Lauro José. Avaliação dos Níveis Séricos de BDNF em Crianças e Adolescentes com Neoplasia, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.

18. **Farias, C. B.**, Schmidt, A. L., Abujamra, A. L., Kapczinski, F., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. PDE4 Regula a Viabilidade Celular de Meduloblastoma Humano, 2010. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia; Expo Unimed, Curitiba. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
19. Prusch, D.S., Schmidt, A. L., **de Farias C. B.**, Abujamra, A. L., Kapczinski, F., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. BDNF e PDE4, mas não GRPR, regulam a viabilidade de células de meduloblastoma humano, 2010. In: XX Congresso Pan-Americano de Farmácia e do XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
20. Maurmann, N., Pardo-Andreu, G.L., **Farias, C. B.**, Delgado, R., Roesler, R. Administration of Mangifera indica L. stem bark extract and mangiferin impairs aversive memory but improves object recognition index in rats. In: Immunopharmacology 2008-1st International Workshop of Immunopharmacology, 2008, Varadero.
21. Pardo-Andreu, G.L., **Farias, C. B.**, Maurmann, N., Delgado, R., Roesler, R. Effect of Mangifera indica l extract (Vimang) on human lung (H460) and colon (HT-29) tumor cell proliferation. In: Immunopharmacology 2008-1st International Workshop of Immunopharmacology, 2008, Varadero.
22. **Farias, C. B.**, Lima, R.C., Lima, Luciana Otero, Flores, D. G., Meurer, L., Brunetto, Algemir L, Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael. Synergist stimulation of proliferation of U-138MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling In: Immunopharmacology, 2008, Varadero beach, Matanzas. **Cuban Society of Pharmacology** , 2008.
23. **Farias, C. B.**, Lima, R.C., Heinen, T. E., Nery, L. R., Lubian, A., Abujamra, A.L., Brunetto, Algemir Lunardi, Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael. The cotreatment between RC-3095 and chemoterapics: a new anti-tumoral strategye to colorectal cancer in vitro, 2008. In: XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, São Paulo. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
24. **Farias, C. B.**, de Almeida, V. R., Schwartzmann, Gilberto, Brunetto, Algemir Lunardi, Abujamra, A.L., Roesler, Rafael. The GRPR antagonist, RC-3095, elicits a proliferative effect in Neuro-2A cells which is reverted by treatment with sodium butyrate, 2008. In: XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, São Paulo. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Biologia Celular.
25. Maurmann, N., **Farias, C. B.**, Pardo-Andreu, G.L., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Delgado, R. Roesler, R. Efeito de Mangiferina sobre a Proliferação de Células Tumorais Humanas de Glioblastoma, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
26. Heinen, T. E., **Farias, C. B.**, Lima, R. C., Abujamra, A. L., Brunetto, A. L., Roesler, R., Veiga, A. B. G. Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
27. Schmidt, A. L., **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. As Linhagens de Meduloblastoma DAOY e D283 Expressam o Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR), mas são refratárias ao seu antagonista, RC-3095, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
28. **Farias, C. B.**, Lima, R. C., Lima, L. O., Flores, D. G., Meurer, L. Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Roesler, R. Stimulation of Proliferation of U-138MG Glioblastoma Cells by Gastrin-Releasing Peptide in Combination with Agents that Enhance cAMP Signaling, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.

29. Abujamra, A. L., **Farias, C. B.**, Castro, C. G., Schwartzmann, G., Roesler, R., Brunetto, A. L. A Unidade Catalítica da telomerase, HTERT, se Encontra Elevada em Pacientes Diagnosticados com Leucemia Linfóide Aguda, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
30. Flores, D. G., **Farias, C. B.**, Leites, J., Oliveira, M. S., Lima, R. C., Kikuchi, A. S., Di Leone, L. P., Meurer, L. Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Lenz, G. Roesler, R. Gastrin-Releasing Peptide Receptors Regulate Proliferation of C6 Glioma, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
31. Schmidt, A. L., **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L., Roesler, R. BDNF Inibe a Viabilidade de Linhagens Celulares de Meduloblastoma Humano, 2008. In: XI Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Hotel Serrano, Gramado, RS. Inst.promotora: Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
32. Heinen, T. E., **Farias, C. B.**, Lima, R. C., Abujamra, A. L., Roesler, R., Veiga, A. B. G. Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2008. In: I Semana Científica da UFCSPA, 2008. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS.
33. Heinen, T. E., Veiga, A. B. G., Roesler, R., **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Lima, R. C., Nery, L. R. Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2008. In: 28° Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 15° Congresso de Pesquisa e Desenvolvimento em saúde do Mercosul, Porto Alegre, RS.
34. Almeida, V. R., Goulart, B. K., Lima, M. N. M., Reolon, G. K., **Farias, C. B.**, Stertz, L., Fries, G. R., Kapczinski, F. Schroder, N. Roesler, R. Administração Sistêmica de Cetamina Prejudica Consolidação da Memória de Reconhecimento e Reduz Níveis de BDNF no Hipocampo de Ratos, 2008. In: 4° Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções, Bento Gonçalves, RS.
35. Heinen, T. E., Roesler, R., **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Lima, R. C., Nery, L. R., Lubian, A. Brunetto, A. L., Veiga, A. B. G. Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2008. In: XX Salão de Iniciação Científica, XVII Feira de Iniciação Científica e III Salão UFRGS Jovem, Porto Alegre, RS.
36. Heinen, T. E., Roesler, R., **Farias, C. B.**, Abujamra, A. L., Nery, L. R., Lima, R. C., A. L., Veiga, A. B. G. Estudo dos Efeitos do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua* sobre a Proliferação e Viabilidade de Células Tumorais, 2008. In: XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Águas de Lindóia, SP.
37. Lima, R. C., **Farias, C. B.**, Lima, L. O., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G. Análise do Bloqueio de Receptores GRP por um Antagonista Sintético sobre a Proliferação de Gliomas Humanos *in vitro*, 2007. In: XIX Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
38. **Farias, C. B.**, Lima, R. C., Lima, L. O., Reis, S. V., Flores, D. G., Oliveira, M. S., Krai, J., Goulart, B. K., Brunetto, A. L., Schwartzmann, G., Roesler, R. Mecanismo de Sinalização Celular Envolvido no Crescimento Tumoral Induzido pela Ativação de Receptores GRP em Gliomas, 2007. In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Águas de Lindóia, SP.
39. Lima, R. C., **Farias, C. B.**, Brunetto, A. L., Schwartzmann, G. Efeito do Bloqueio de Receptores GRPR sobre o Crescimento de Gliomas Humanos *in vitro*, 2006. In: XVIII Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

40. Schunemann, D. P., Regner, A. P., Rocha, A. B., Grivicich, I., Diehl, C. L., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Lago, L., Schwartzmann, G. Glutamate Induces Toxicity and Modulates Superoxide Dismutase Activity in Human Glioma Cell Lines In: 94 th Annual Meeting, 2003, Toronto, Ontario. AACR American Association for Cancer Research. Toronto: Proc Am Assoc Cancer Res (1st ed.), 2003. v.44. p.1482 – 1482.
41. Rocha, A. B., Diehl, C. L., Regner, A. P., Grivicich, I., Schunemann, D. P., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Almeida, L., Braga Filho, A. P., Schwartzmann, G. Radioresistance is Associated to Up-regulation of Hsp70 Content in Human Glioma Cell Lines In: 94th Annual Meeting 2003, 2003, Washington. **AACR American Association for Cancer Research**. Washington: Proc Am Assoc Cancer Res (2nd ed.), 2003. v.44. p.1023 – 1023.
42. **Farias, C. B.**, Schunemann, D. P., Kovaleski, G., Mondadori, E., Diehl, C. L., Almeida, L., Lago, L. D., Grivicich, I., Rocha, A. B., Schwartzmann, G., Regner, A. P. Glutamate Induces Toxicity and Modulates Superoxide Dismutase Activity in Human Glioma Cell Lines. In: 4th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations and 6 Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2003, Florianópolis. **Supplement of 4th ICMHP and 6 SBMCTA**. São Paulo: Editorial and Business Office, 2003. v.26. p.95 – 95.
43. Kovaleski, G., Mondadori, E., **Farias, C. B.**, Schunemann, D. P., Diehl, C. L., Almeida, L., Braga Filho, A., Grivicich, I., Regner, A. P., Schwartzmann, G., Rocha, A. B. Radioresistance is Associated to Up-regulation of HSP70 in Human Glioma Cell Lines In: 4th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations and 6 Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental and 6 Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2003, Florianópolis. **Supplement of 4th ICMHP and 6 SBMCTA**. São Paulo: Editorial and Business Office, 2003. v.26. p.99.
44. Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Araújo, D. R., Leal, L. F., Schunemann, D. P., Grivicich, I., Mondadori, E., Regner, A. P., Rocha, A. B. Efeito do Glutamato na Liberação da Proteína S100B em Linhagens Derivadas de Gliomas Humanos. In: IV Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica - IX Salão de Iniciação Científica, 2003, Canoas.
45. Regner, A. P., Rocha, A. B., Grivicich, I., Diehl, C. L., Passos, D. T., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Cury, A., Schunemann, D. P., Schwartzmann, G. Glutamate-mediated Neurotoxicity in Human Glioma Cell Lines In: 93rd Annual Meeting, 2002, San Francisco. **93rd AACR Annual Meeting**. San Francisco: Proc Am Assoc Cancer Res, 2002. v.43. p.194 – 194.
46. Rocha, A. B., Grivicich, I., Mans, D. R. A., Lima, C., Almeida, L., Kurek, A. G., Passos, D. T., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Cury, A., Schunemann, D. P., Daudt, A. W., Schwartzmann, G. Potentiation of Etoposide-mediated Topoisomerase II Inhibition in U-373 MG Human Glioma Cells by Tamoxifen. In: 93rd Annual Meeting, 2002, San Francisco. Proc Am Assoc Cancer Res, 2002. v.43. p.249 – 250.
47. Rocha, A. B., Mans, D. R. A., Regner, A. P., Grivicich, I., Passos, D. T., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Cury, A., Schunemann, D. P., Schwartzmann, G. Involvement of Protein Kinases C (PKCs) alpha and epsilon in Vitro Glioma Cell Proliferation and Invasion. In: 93rd Annual Meeting, 2002, San Francisco. Proc Am Assoc Cancer Res, 2002. v.43, p.375 – 375.
48. Schunemann, D. P., Kurek, A. G., Rocha, A. B., Grivicich, I., Passos, D. T., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Schwartzmann, G., Regner, A. P. Human Glioma Cell Lines Present Susceptibility to Glutamate-mediated Toxicity In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia.
49. Kurek, A. G., Schunemann, D., Grivicich, I., Regner, A. P., Kovaleski, G., **Farias, C. B.**, Mondadori, E., Schwartzmann, G., Rocha, A. B. Potentiation of etoposide-mediated topoisomerase II inhibition in U-373 MG human glioma cell lines. In: 48 Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia.

50. Diehl, C. L., Grivicich, I., Mondadori, E., Rocha, A. B., Schwartzmann, G., **Farias, C. B.**, Regner, A. P., Kovaleski, G., Schunemann, D. P. Alterações no Conteúdo de HSP70 e Radiorresistência de Gliomas *in Vitro*. In: III Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica - VII Salão de Iniciação Científica, 2002, Canoas, RS.

51. Schunemann, D. P., Schwartzmann, G., Diehl, C. L., Grivicich, I., Regner, A. P., **Farias, C. B.**, Rocha, A. B., Kovaleski, G., Mondadori, E. Caracterização da Neurotoxicidade Mediada pelo Glutamato em Linhagens Celulares de Gliomas Humanos In: III Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica - VII Salão de Iniciação Científica, 2002, Canoas, RS.

52. Rocha, A. B., Regner, A. P., Pizzol, F. D., Cury, A., **Farias, C. B.**, Kovaleski, G., Klamt, F., Andrades, M. E., Frota Jr, M. L. C., Grivicich, I., Moreira, J. C. F., Braga Filho, A., Schwartzmann, G. Effect of gama-radiation on superoxide dismutase (SOD) activity in human glioma cell lines. In: XXXVII Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia.

53. Regner, A. P., Rocha, A. B., Cury, A., **Farias, C. B.**, Kovaleski, G., Grivicich, I., Moreira, J. C. F., Schwartzmann, G. Protein kinases c (PKCs) alpha and epsilon cooperate with the epidermal growth factor receptor (EGFR) in the induction of ornithine decarboxylase (ODC) mRNA expression in cultured human glioma cells. In: XXXVII Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia.

54. Mondadori, E., Kovaleski, G., Cury, A., **Farias, C. B.**, Schunemann, D. P., Rocha, A. B. Envolvimento da Superóxido Dismutase (SOD) na Resposta à Radiação Gama de Gliomas Humanos Cultivados In: II Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica - VII Salão de Iniciação Científica, 2001, Canoas, RS.

Apresentação Oral de Trabalhos

1. Abujamra, A.L., **Farias, C. B.**, Cornelio, D. B.

Empreendedorismo Translacional, 2011. (Seminário).

Evento: Tópicos de Integração em Ciência, Tecnologia e Inovação; Inst.promotora/financiadora: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - NIT-Saúde/UFCSPA. Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre, RS.

2. **Brunetto de Farias**, Caroline, Abujamra, A.L.

Pesquisa Básica, 2011. (Conferência ou palestra)

Evento: Treinamento de monitoria Clínica- Protocol Sulamericano para o Tratamento de Pacientes com Tumores da Família Ewing Não-Metastático e Metastático. Local: Instituto do Câncer Infantil do RS, Porto Alegre, RS.

3. **Farias, C. B.**

GRPR Regula a Expressão e Secreção de BDNF em Células de Câncer Colorretal Humas através de um Mecanismo Dependente de EGFR, 2010. (Conferência).Evento: VI Congresso Franco Brasileiro de Oncologia. Local: Rio de Janeiro, RJ. Inst.promotora: Sociedade Franco Brasileira de Oncologia.

4. **Farias, C. B.**

Desenvolvimento de terapias-alvo antitumorais, 2009. (Seminário)

Evento: Disciplina de Farmacologia Biomédica II (CBS 09007). Local: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS.

5. **Farias, C. B.**

A Utilização de Cultura Celular para o Desenvolvimento de Novas Drogas Anticâncer, 2005. (Palestra)

Evento: Projeto Sexta Científica da Biologia – Seminários. Local: ULBRA, Canoas, RS. Inst.promotora/financiadora: Universidade Luterana do Brasil.

Bancas**Participação em banca de trabalhos de conclusão – Graduação**

1. Participação em banca de Laura Stertz. **Inibição da Enzima Histona Desacetilase na Amígdala e Hipocampo de Ratos Wistar Tratados com Estabilizadores de Humor e Butirato de Sódio**, 2008. (Biomedicina) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientações e Supervisões**Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Débora Schoenfeld Prusch. **O papel de GRP/GRPR em linhagens celulares de tumores femininos**. 2011. Curso (Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Amanda Valle Pinhatti. **Avaliação in vitro da atividade antiproliferativa de benzofenonas isoladas de Hypericum carinatum Griseb**. 2010. Curso (Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3. Fabiano Brandão De Moura. **FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) E O CÂNCER**. 2009. Curso (Biomedicina) - Universidade Luterana do Brasil.
