

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

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

BRUNO PEREIRA ANTUNES<sup>1,2</sup>; RICARDO GEHRKE BECKER<sup>1,3</sup>; ANDRÉ TESAINER BRUNETTO<sup>3</sup>; BRUNO SILVEIRA PAVEI<sup>1</sup>; CAROLINE BRUNETTO DE-FARIAS<sup>3</sup>; LUÍS FERNANDO DA ROSA RIVERO<sup>4</sup>; JULIE FRANCINE CERUTTI SANTOS<sup>3</sup>; BRUNA MEDEIROS DE-OLIVEIRA<sup>3</sup>; LAURO JOSÉ GREGIANIN<sup>3,5</sup>; RAFAEL ROESLER<sup>3,6,7</sup>; ALGEMIR LUNARDI BRUNETTO<sup>3</sup>; FERNANDO PAGNUSSATO<sup>8</sup>; CARLOS ROBERTO GALIA<sup>1,2</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** determinar a expressão de neurotrofinas e seus receptores tirosina quinases em pacientes com osteossarcoma (OS) e sua correlação com desfechos clínicos. **Métodos:** biópsias de tumores primários de pacientes com OS tratados em uma única instituição, consecutivamente, entre 2002 e 2015, foram analisados através de imuno-histoquímica para expressão de receptores de tirosina quinase A e B (TrKA e TrKB), fator de crescimento neural (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). De forma independente, dois patologistas classificaram os marcadores de imuno-histoquímica como negativos (negativos e focais fracos) ou positivos (moderado focal/difuso ou forte focal/difuso). **Resultados:** foram analisados dados de 19 pacientes (10 do sexo feminino e 9 do masculino) com mediana de idade de 12 anos (5 a 17,3 anos). Dos tumores, 83,3% estavam localizados em membros inferiores e 63,2% dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico. A sobrevida global em cinco anos foi de 55,3%. BDNF foi positivo em 16 pacientes (84%) e NGF em 14 pacientes (73%). TrKA e TrKB apresentaram coloração positiva em quatro (21,1%) e oito (42,1%) pacientes, respectivamente. A análise de sobrevida não demonstrou diferença significativa entre receptores Trk e neurotrofinas. **Conclusão:** amostras de OS primário expressam neurotrofinas e receptores Trk através de imuno-histoquímica. Estudos futuros podem auxiliar na identificação do papel das mesmas na patogênese do OS e determinar se há possível correlação prognóstica.

**Descritores:** Osteossarcoma. Fatores de Crescimento Neural. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo. Receptor trkA. Receptor trkB.

### INTRODUÇÃO

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

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

O receptor de Trk B (TrkB) apresenta afinidade pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).

1 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Porto Alegre, RS, Brasil. 2 - Hospital Moinhos de Vento, Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Porto Alegre, RS, Brasil. 3 - Instituto do Câncer Infantil (ICI), Porto Alegre, RS, Brasil. 4 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia, Porto Alegre, RS, Brasil. 5 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Porto Alegre, RS, Brasil. 6 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Centro de Pesquisa Experimental, Laboratório de Câncer e Neurobiologia, Porto Alegre, RS, Brasil. 7 - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Departamento de Farmacologia, Porto Alegre, RS, Brasil. 8 - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Banco de Multitecidos, Porto Alegre, RS, Brasil.

O aumento da expressão do BDNF tem demonstrado estar intimamente relacionado à viabilidade tumoral, migração e invasão de tecidos saudáveis em diversas malignidades. Amostras diferentes de leiomiossarcoma uterino humano têm demonstrado expressão de BDNF e TrkB, e o aumento da expressão de TrkB e de seus ligantes nesta neoplasia mesenquimal tem sido associada com resistência a múltiplos agentes quimioterápicos. O aumento da expressão de TrkB e seus ligantes também tem sido associado a desfechos clínicos desfavoráveis em alguns tumores de origem neuroectodérmica<sup>11-18</sup>.

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

## MÉTODOS

### Pacientes e amostras histológicas

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

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

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

Todos os pacientes incluídos tiveram suas biópsias analisadas por imuno-histoquímica para os seguintes marcadores tumorais: BDNF, NGF, TrkA e TrkB. Informações médicas e cirúrgicas foram extraídas dos registros médicos dos pacientes. O grau de necrose tumoral foi graduado de acordo com a classificação Huvos-Ayala<sup>20</sup>.

### Imuno-histoquímica

Todas as amostras foram fixadas em parafina, cortadas em lâminas de 4µm de espessura, incubadas e re-hidratadas em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em um forno de micro-ondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas em peróxido de hidrogênio, e os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com soro normal. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, com uma diluição de 1:50, por 12 horas a 4°C, depois foram imunomarcadas com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e desenvolvidos com tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB Kit, Dako). Os anticorpos primários foram anti-NGF policlonal de coelho (sc-33603; Biotecnologia Santa Cruz), anti-BDNF (sc-20981, Biotecnologia Santa Cruz), TrkB policlonal de camundongo (sc-377218, Biotecnologia Santa Cruz) e anti-TrkA policlonal de cabra (sc-20539, Biotecnologia Santa Cruz).

As lâminas foram avaliadas independentemente por dois especialistas em patologia cirúrgica e imuno-histoquímica para a

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

### Estatística

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

## RESULTADOS

### Características e marcadores dos pacientes

De um total de 28 pacientes tratados por OS nesse Serviço, foram excluídos quatro por amostra insuficiente ou indisponível para realização do estudo imuno-histoquímico e cinco que não entraram no protocolo do BOTG V e GCBTO 2006 (por escolha do oncologista, do paciente ou condições clínicas que impossibilitassem realizar o tratamento).

Os pacientes que apresentaram má resposta à quimioterapia e necessitaram trocar a linha de tratamento durante o estudo não foram descartados. Analisamos, portanto, os dados de 19 pacientes (9 homens e 10 mulheres; com uma média de idade de 12 anos) de uma única instituição que foram incluídos nos estudos BOTG V e GCBTO 2006. As características da amostra foram salientadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Características da amostra.

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

Fonte: banco de dados do autor. \* DP= desvio padrão.

A mediana de idade foi de 12 anos (variação de 5 a 17,3 anos) e o tempo mediano de acompanhamento foi de 2,7 anos (amplitude de variação de 0,6 a 14 anos). Quinze tumores (78,9%) localizavam-se nas extremidades inferiores, dois (10,5%) nas extremidades superiores, um (5,3%) na pelve e um (5,3%) não teve registro de localização. Doze (63,2%) pacientes eram metastáticos e sete (36,8%) tinham tumor localizado. O principal sítio metastático foi o pulmão (83%), seguido por ossos (17%). A resposta à quimioterapia foi ruim em cinco pacientes, boa em seis e não registrada em oito pacientes.

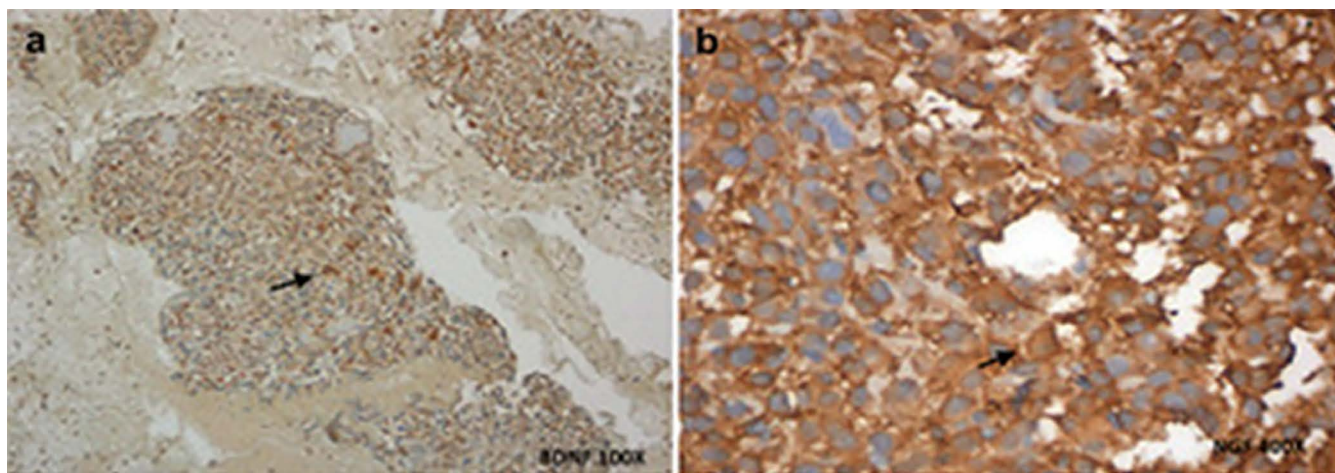
Quatro (21,1%) pacientes apresentaram progressão de doença, sendo dois locais e duas recorrências sistêmicas. Dos 19 pacientes, 17 foram operados, dos quais nove (52,9%) submetidos a procedimentos que permitiram a conservação do membro e oito (47,1%) à amputação.

O BDNF foi considerado positivo em 16 (84,2%) pacientes, enquanto o NGF foi positivo em 14 (73,7%) (Figura 1). Por outro lado, TrkA e TrkB foram mais frequentemente negativos do que positivos, apresentando quatro (21,1%) e oito (42,1%) casos de coloração positiva, respectivamente, dentre os 19 pacientes (Figura 2). Houve diferença significativa entre os marcadores positivos e negativos da amostra ( $P < 0,001$ ) (Tabela 2).

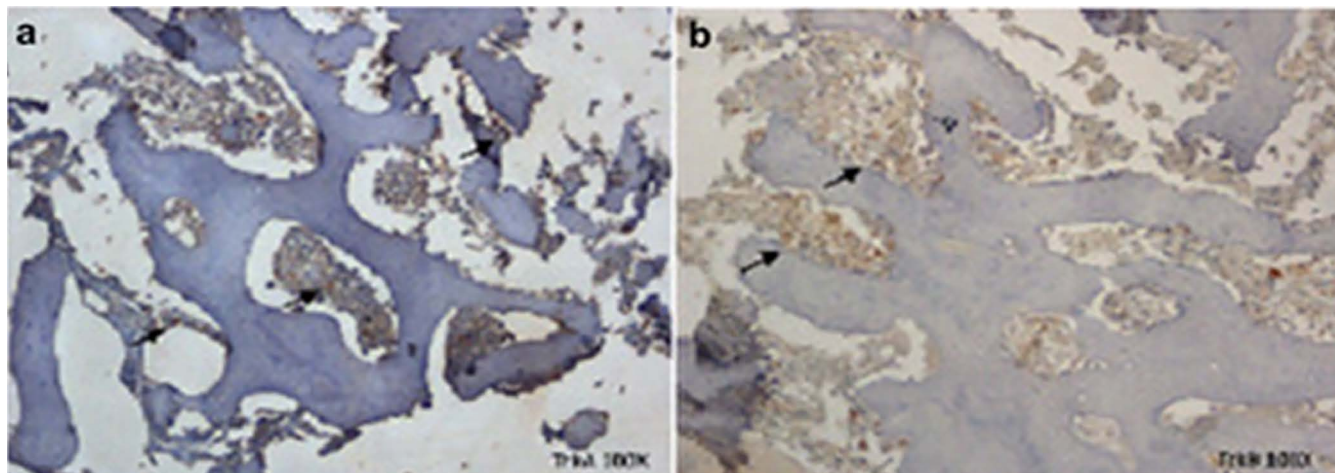
**Tabela 2.** Dados sobre os marcadores imuno-histoquímicos.

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

Fonte: banco de dados do autor. \* BDNF= fator neurotrófico derivado do cérebro; \*\* NGF= fator de crescimento nervoso; \*\*\* TrkA= receptor de tirosina quinase A; \*\*\*\* TrkB= receptor de tirosina quinase B. Houve diferença significativa na positividade entre os marcadores ( $P < 0,001$ ).



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



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

## Análise global

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

## Análise imuno-histoquímica

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

Apesar da conhecida afinidade entre TrkA e NGF, os tumores coraram positivamente para ambos os marcadores apenas em três (15,7%) casos, e negativos para ambos os marcadores em quatro (21,1%). Com relação à ligação TrkB-BDNF,

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

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar a expressão de neurotrofinas e seus receptores Trk em tumores primários de OS em humanos. Nós encontramos coloração positiva por imuno-histoquímica para BDNF, NGF, TrkA e TrkB em 19 amostras de tumores de pacientes com OS tratados em uma única instituição dentro dos ensaios BOTG V e GCBTO 2006 conduzidos por Petrilli *et al.*<sup>3,19</sup>. Além disso, o grupo analisado apresentou características semelhantes às relatadas nos estudos BOTG V e GCBTO 2006, com alta prevalência de metástase e taxa de sobrevida de aproximadamente 55%<sup>19</sup>. As taxas de sobrevida em relação à presença de metástases, recidiva e sexo (masculino), seguiram o padrão e valores aproximados aos já constatados em outros estudos, apesar de não se mostrarem estatisticamente significativos (provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra)<sup>3,19</sup>. Da mesma forma, a expressão dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica não foi significativamente associada à sobrevida, presença de metástases, recorrência ou resposta à quimioterapia. Porém houve tendência de associação entre sobrevida, recidiva e presença de TrkA positivo (p<0.20).

Embora a ligação TrkA-NGF esteja frequentemente presente no reparo e proliferação do tecido ósseo, estudos que investigam essas proteínas em células de OS são raros. Um estudo em células caninas de OS demonstrou que o bloqueio *in vitro* da ligação TrkA-NGF pode induzir apoptose e inibir a proliferação celular.

**Tabela 3.** Análise univariada.

Variáveis	Morte		
	5 anos	RR*(IC**95%)	P
Todos os pacientes (N)	55,3%	-	-
Idade (anos)		0,98 (0,74-1,30)	0,889
Sexo			
Masculino	30,0%	1,45 (0,29-7,24)	0,648
Feminino	68,6%	1,00	
Metástase			
Não	66,0%	1,00	
Sim	40,0%	2,04 (0,40-105)	0,392
Huvos-Ayala			
<90%	40,0%	¥	0,427
=90%	75,0%	1,00	
Recidiva			
Não	72,2%	1,00	
Sim	25,0%	3,02 (0,60-15,1)	0,178
BDNF***			
Negativo e focal fraco	33,3%	1,00	
Positivo, fraco e forte	61,3%	0,51 (0,09-2,80)	0,436
NGF****			
Negativo e focal fraco	33,3%	1,00	
Positivo, fraco e forte	66,7%	0,69 (0,13-3,81)	0,669
TrkA#			
Negativo e focal fraco	58,2%	1,00	
Positivo, fraco e forte	37,5%	3,48 (0,62-19,70)	0,158
TrkB##			
Negativo e focal fraco	56,3%	1,00	
Positivo, fraco e forte	54,7%	1,84 (0,37-9,20)	0,457

Fonte: banco de dados do autor. \* RR= relação de risco; \*\* IC 95%= intervalo de confiança de 95%; \*\*\* BDNF= fator neurotrófico derivado do cérebro; \*\*\*\* NGF= fator de crescimento nervoso; # TrkA= receptor de tirosina quinase A; ## TrkB= receptor de tirosina quinase B. ¥ O risco não pôde ser estimado devido ao pequeno tamanho da amostra.

Além disso, os receptores TrkA foram identificados em tumores primários e metástases pulmonares<sup>7</sup>. Encontramos coloração positiva para TrkA em 21% dos casos e para o seu ligante NGF em 73%. Nosso estudo sugere uma menor sobrevida com expressão positiva de TrkA quando comparada a expressão negativa (37% versus 58% em cinco anos, respectivamente). Ao analisar as amostras de

NGF, observou-se maior sobrevida em pacientes sem expressão de NGF (66% versus 33% aos cinco anos, respectivamente). Embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, talvez devido ao tamanho da amostra, a ligação de TrkA-NGF pode ter um papel potencial no prognóstico de OS.

A sinalização do TrkB, através do seu ligante BDNF, tem sido relacionada ao prognóstico de

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

No presente estudo, TrkB e BDNF foram expressos em 42% e 84% das amostras de OS, respectivamente. Entre os pacientes positivos para TrkB, 80% tiveram uma baixa taxa de necrose e 25% apresentaram recidiva do tumor. Entre os pacientes negativos para TrkB, apenas 16% tiveram uma baixa taxa de necrose e 18% apresentaram recorrência do OS. Os pacientes positivos para TrkB tendem a mostrar menor sobrevida do que os pacientes com coloração negativa, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ( $P=0,44$ ). Por outro lado, os pacientes com células que expressam BDNF

apresentaram maior taxa de necrose, apresentaram menor frequência de metástases e maior sobrevida do que aqueles com coloração negativa ( $P=0,42$ ). Mais estudos são necessários para investigar se o BDNF-TrkB desempenha um papel na patogênese do OS.

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

## AGRADECIMENTOS

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

## ABSTRACT

**Objective:** to determine the expression of neurotrophins and their tyrosine-kinase receptors in patients with osteosarcoma (OS) and their correlation with clinical outcomes. **Methods:** we applied immunohistochemistry to biopsy specimens of patients consecutively treated for primary OS at a single institution between 2002 and 2015, analyzing them for expression receptors of tyrosine kinase A and B (TrkA and TrkB), neural growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). Independently, two pathologists classified the immunohistochemical markers as negative (negative or weak focal) or positive (moderate focal/diffuse or strong focal/diffuse). **Results:** we analyzed data from 19 patients (10 females and 9 males), with median age of 12 years (5 to 17.3). Tumors' location were 83.3% in the lower limbs, and 63.2% of patients had metastases at diagnosis. Five-year overall survival was 55.3%. BDNF was positive in 16 patients (84%) and NGF in 14 (73%). TrkA and TrkB presented positive staining in four (21,1%) and eight (42,1%) patients, respectively. Survival analysis showed no significant difference between Trk receptors and neurotrophins. **Conclusion:** primary OS samples express neurotrophins and Trk receptors by immunohistochemistry. Future studies should explore their role in OS pathogenesis and determine their prognostic significance in larger cohorts.

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

## REFERÊNCIAS

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

3. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, Camargo OP, Pena W, Péricles P, Davi A, Prospero JD, Alves MT, Oliveira CR, Macedo CR, Mendes WL, Almeida MT, Borsato ML, dos Santos TM, Ortega J, Consentino E; Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1161-8.
4. Liu MH, Cui YH, Guo QN, Zhou Y. Elevated ASCL2 expression is associated with metastasis of osteosarcoma and predicts poor prognosis of the patients. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1431-40.
5. Ram Kumar RM, Boro A, Fuchs B. Involvement and clinical aspects of MicroRNA in osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):877.
6. Ding L, Congwei L, Bei Q, Tao Y, Ruiguo W, Heze Y, et al. mTOR: an attractive therapeutic target for osteosarcoma? *Oncotarget.* 2016;7(31):50805-13.
7. Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Immunohistochemical expression of vegf and her-2 proteins in osteosarcoma biopsies. *Acta Ortop Bras.* 2013;21(4):233-8.
8. Aubert L, Guilbert M, Corbet C, Génot E, Adriaenssens E, Chassat T, et al. NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget.* 2015;6(12):9807-19.
9. Yue XJ, Xu LB, Zhu MS, Zhang R, Liu C. Over-expression of nerve growth factor- $\beta$  in human cholangiocarcinoma QBC939 cells promote tumor progression. *PLoS One.* 2013;8(4):e62024.
10. Astolfi A, Nanni P, Landuzzi L, Ricci C, Nicoletti G, Rossi I, et al. An anti-apoptotic role for NGF receptors in human rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer.* 2001;37(13):1719-25.
11. Cameron HL, Foster WG. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. *PLoS One.* 2009;4(1):e4303.
12. Shi J. Regulatory networks between neurotrophins and miRNAs in brain diseases and cancers. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(2):149-57.
13. Pinski J, Weeraratna A, Uzgare AR, Arnold JT, Denmeade SR, Isaacs JT. Trk receptor inhibition induces apoptosis of proliferating but not quiescent human osteoblasts. *Cancer Res.* 2002;62(4):986-9.
14. Jin W, Yun C, Kim HS, Kim SJ. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res.* 2007;67(20):9869-77.
15. Martens LK, Kirschner KM, Warnecke C, Scholz H. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14379-88.
16. Lin CY, Chen HJ, Li TM, Fong YC, Liu SC, Chen PC, et al.  $\beta 5$  integrin up-regulation in brain-derived neurotrophic factor promotes cell motility in human chondrosarcoma. *PLoS One.* 2013;8(7):e67990.
17. Makino K, Kawamura K, Sato W, Kawamura N, Fujimoto T, Terada Y. Inhibition of uterine sarcoma cell growth through suppression of endogenous tyrosine kinase B signaling. *PLoS One.* 2012;7(7):e41049.
18. Heinen TE, Dos Santos RP, da Rocha A, Dos Santos MP, Lopez PL, Silva Filho MA, et al. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget.* 2016;7(23):34860-80.
19. Petrilli AS, Brunetto AL, Cypriano Mdos S, Ferraro AA, Donato Macedo CR, Senerchia AA, Almeida MT, Costa CM, Lustosa D, Borsato ML, Calheiros LM, Barreto JH, Epelman S, Carvalho E, Alves MT, Petrilli Mde T, Penna V, Pericles P, de Camargo OP, Garcia-Filho On Behalf Of The Brazilian Osteosarcoma Treatment Group RJ. Fifteen years' experience of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group (BOTG): a contribution from an emerging country. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2013;2(4):145-52.
20. Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
21. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM, et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):689-96.



22. Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, Takiguchi S, Yasuda T, Miyata H, et al. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*. 2008;75(1-2):17-26.
23. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(7-8):755-9.
24. Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(22):6462-6.
25. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 2002;62(22):6756-63.
26. Li Z, Jaboin J, Dennis PA, Thiele CJ. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res*. 2005;65(6):2070-5.
27. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1995;55(8):1798-806.
28. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994;14(1):759-67.

Recebido em: 21/12/2018

Aceito para publicação em: 05/02/2019

Conflito de interesse: nenhum.

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

**Endereço para correspondência:**

Ricardo Gehrke Becker

E-mail: rbecker@hcpa.edu.br

