

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Mauro Miguel Masiero

**INFLUÊNCIA DO GRP NA PROLIFERAÇÃO E EXPANSÃO DE CÉLULAS
TRONCO TUMORAIS DE MEDULOBLASTOMA**

Porto Alegre
DEZEMBRO/2014

MAURO MIGUEL MASIERO

**INFLUÊNCIA DO GRP NA PROLIFERAÇÃO E EXPENSÃO DE CÉLULAS
TRONCO TUMORAIS DE MEDULOBLASTOMA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre
DEZEMBRO/2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao **Professor Rafael** e a **Carol** pela
oportunidade, cordialidade e humildade;

A **Mariane** pelo apoio, crítica construtiva e ensinamentos que permanecerão
guardados com muito carinho – eu jamais trabalharei na câmara da mesma forma!

Aos colegas do **LaPesc** pelas discussões sobre ciência e demais temas sempre
interessantes;

A **COMGRAD**, em especial ao **Luiz** e a **Irma** pela ajuda;

Aos meus **Amigos** e **Colegas**, que fizeram destes seis anos anos inesquecíveis
(esquecíveis em algumas noites)

Aos meus **Professores**, que sempre se esforçaram ao máximo para compartilhar
conhecimento;

E finalmente a minha **família**, a qual sempre me apoiou, e em especial ao meu
primo **Vinicius**, que quero deixar registrado, fará biomedicina e estará escrevendo um
outro TCC daqui a alguns anos!

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Meduloblastoma	8
1.2. Células Tronco Tumorais	11
1.3. Peptídeo Liberador de Gastrina e seu Receptor GRPR	14
2. OBJETIVOS	20
3. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	21
3.1. Abstract	23
3.2. Introduction	24
3.3. Materials and Methods	27
3.4. Results	30
3.5. Discussion	33
3.6. References	35
3.7. Figures caption	38
3.8. Figures	40
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	49
5. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL	51
6. ANEXOS	53

Lista de Abreviaturas

BB	<i>Bombesin</i> , Bombesina
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i> , Células tronco tumorais (CTT)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , Fator de Crescimento de Fibroblastos
GRP	<i>Gastrin-Releasing Peptide</i> , Peptídeo Liberador de Gastrina
GRPR	<i>Gastrin-Releasing Peptide Receptor</i> , Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina
MB	Meduloblastoma
MSA	<i>Medullosphere formation Assay</i> , Ensaio de Formação de Meduloesferas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
PNET	<i>Primitive Neuroectodermal Tumor</i> , Tumor Neuroectodérmico Primitivo
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> , Fosfatidilinositol 3-kinase
SHH	<i>Sonic Hedgehog Signaling</i> , Sinalização Celular via Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervoso Central
Wnt	<i>Wnt Pathway</i> , Sinalização Celular via Wnt

Resumo

Meduloblastoma (MB) é um tumor infantil da fossa posterior com origem neuroectodérmica, sendo o tumor do sistema nervoso central (SNC) mais comum em crianças. A sobrevida dos pacientes melhorou ao longo dos últimos 40 anos, passando de 30% para quase 70% a 80% de sobrevida em 5 anos. Apesar disso, o intenso tratamento deixa efeitos cognitivos intensos, sendo necessária a pesquisa de alvos terapêuticos mais específicos. Evidências mostram que MB é um câncer altamente heterogêneo, que ocorre durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, e que em alguns casos depende de vias de sinalização utilizadas no desenvolvimento normal. A hipótese de que alguns cânceres possuem uma população de células tronco tumorais (CSC), células capazes de se auto-renovar e ao mesmo tempo possuir a capacidade de divisão assimétrica, parece ser verdadeira em MB. Diversos estudos evidenciaram e caracterizaram estas células em tumores. O objetivo deste trabalho é testar a influência da sinalização do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor, o GRPR, na proliferação e expansão de células tronco tumorais, já que o GRPR foi identificado em outros tipos de cânceres em processos de migração, proliferação e ativação de outras vias, como Sonic Hedgehog. Neste trabalho, foi evidenciado que GRP é capaz de aumentar o tamanho médio das esferas em condição de supressão dos fatores de crescimento EGF, FGF, indicando que esta via de sinalização pode influenciar na proliferação, expansão ou diferenciação de CSC, bem como que vias a jusante ao receptor do EGF ou FGF poderiam ser compartilhadas com o GRPR, já que no meio suplementado com FGF e EGF, não houve aumento no tamanho das esferas.

Palavras-chave: Meduloblastoma, Peptídeo Liberador de Gastrina, Células Tronco Tumorais, Tumor do Sistema Nervoso Central, Meduloesfera, Câncer Infantil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Meduloblastoma

Meduloblastoma é o terceiro câncer mais comum do sistema nervoso central (SNC), e é responsável por 20% de todos os tumores do SNC (PUI et al., 2011). A sua incidência é maior em crianças, e em adultos é considerado um tumor raro, representando apenas 1% dos tumores do SNC em adultos (CHAN et al., 2011). A sobrevida atual varia de acordo com o subtipo do MB, sendo que atualmente apresenta uma sobrevida global de 70% a 80% em 5 anos, porém o seu prognóstico muda dependendo do perfil molecular, se a doença é local ou metastática e de acordo com os achados histológicos (AREF; CROUL, 2013). Houve uma melhora no tratamento da doença, nos cuidados paliativos e na estratificação do tumor, fato que proporcionou uma melhora na sobrevida, que era de apenas 30% em 5 anos na década de 70 (KOPELSON; LINGGOOD; KLEINMAN, 1983). MB apresentava uma incidência de 0,79 casos a cada 100 mil indivíduos nos Estados Unidos no período de 1973 a 2009, e não apresentou variação anual na incidência ao longo do tempo (MCKEAN-COWDIN et al., 2013). No Brasil, em uma amostra de 103 pacientes com tumores pediátricos, 38% apresentavam MB ou outro tumor neuroectodérmico primitivo (PNET, do inglês *primitive neuroectodermal tumor*), e a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 50% para este grupo (ARAUJO et al., 2011).

MB é classificado em cinco grupos histológicos distintos, com diferença no prognóstico e evolução da doença: Clássico, Desmoplástico, Anaplásico, de grandes células e com diferenciação miogênica e melanocítica, conforme ilustra a figura 1.

Destes, a variante anaplásica / grandes células apresenta o pior prognóstico, com alto potencial de metástases. (AREF; CROUL, 2013)

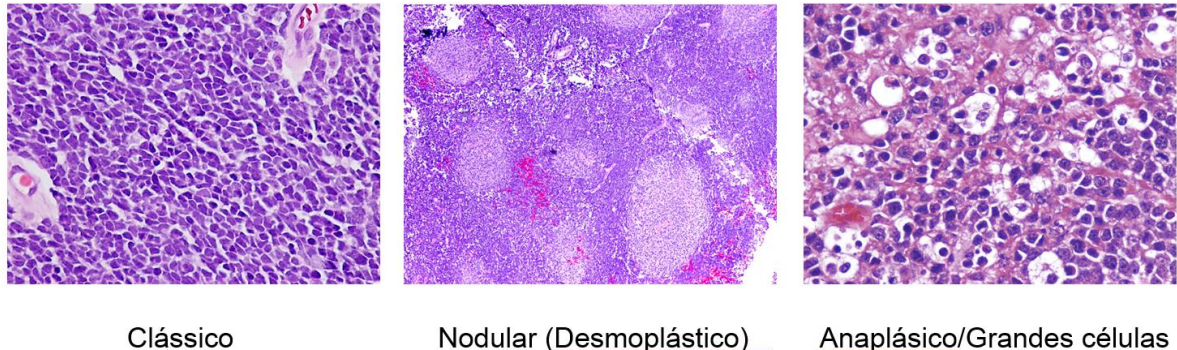


Figura 1. Diferentes subtipos histológicos de meduloblastoma. Nodular (Desmoplástico) apresentam tipicamente uma correlação com ativação da via de Sonic Hedgehog, e ocorre em maior proporção em adultos. Imagens obtidas do MedScape.

A estratificação molecular do MB é essencial para predizer risco, e atualmente é consenso uma subdivisão em 4 grupos: Wnt (Wingless), Sonic Hedgehog (SHH), Grupo 3 e Grupo 4 (SCHROEDER; GURURANGAN, 2014; TAYLOR et al., 2012). Enquanto Wnt e SHH possuem um melhor prognóstico, os grupos 3 e 4 estão associados com um prognóstico ruim e diminuição da sobrevida em 5 anos para 50% a 60% (SCHROEDER; GURURANGAN, 2014), como demonstrado na figura 2. No grupo 3, ocorre uma frequência maior de deleções cromossômicas e expressão do oncogene Myc, grupo este que habitualmente tem o pior prognóstico e é mais metastático, bem como apresenta com maior frequência algumas alterações citogenéticas com relação ao grupo 4, como a deleção do cromossomo 5q e 10q e ganho da porção 1q. Além disso, o grupo 3 possui uma frequência maior de histologia LCA (Tumor de grandes células anaplásico, do inglês, *Large Cell Anaplastic*). Já no grupo 4, a formação do isocromossomo 17q ocorre em 66% dos

casos, contra 26% no grupo 3 e muito raramente nos grupos SHH e Wnt (KOOL et al., 2012; TAYLOR et al., 2012).

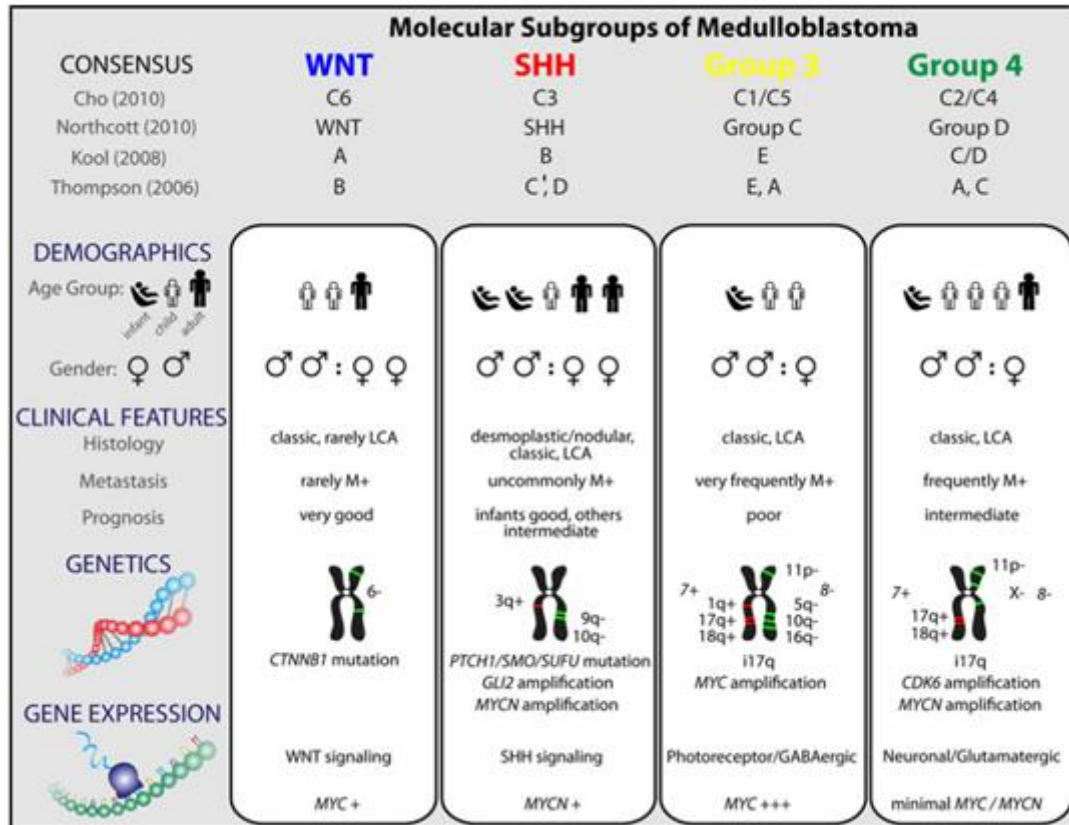


Figura 2. Descrição dos principais subgrupos moleculares do meduloblastoma. Conforme definido em consenso na literatura. Há uma definição histológica, genética e de incidência conforme gênero e idade, bem como variações na expressão gênica de acordo com o subtipo molecular (Ilustração retirada de TAYLOR et al., 2012). LCA: (Tumor de grandes células anaplásico, do inglês, Large Cell Anaplastic)

MB é um tumor primordial de origem neuroectodérmica, possivelmente derivado das células granulares do cerebelo, sendo considerado altamente indiferenciado, de alto grau, além de estar associado a um tratamento difícil e com significativos impactos cognitivos na vida da criança após o tratamento. (BEHESTI; MARINO, 2009; SUTTER et al., 2010). O surgimento do MB tem ligação com o desenvolvimento do SNC (BARKER et al., 2010; SINGH et al., 2004), tanto que recentemente foram encontradas células tronco que são possivelmente as células

que darão origem ao tumor (SUTTER et al., 2010), o que será melhor discutido no tópico de células tronco tumorais.

Alguns estudos têm analisado vias de sinalização presentes no MB, que estão relacionadas com desenvolvimento neural e cerebelar e que apresentam-se ativadas no tumor, tal como a sinalização pelo SHH, para utilizá-las como potencial alvo terapêutico (MILLE et al., 2014; REMKE et al., 2011).

Fica evidente que o MB é um câncer altamente heterogêneo, e que a sua classificação tanto histológica como molecular é essencial para o prognóstico e definição terapêutica.

1.2 Células tronco tumorais

Células tronco tumorais (CTT, do inglês *Cancer Stem Cells, CSC*) são uma fração da massa tumoral que tem potencial de divisão assimétrica, de auto-renovação, de geração de metástases e de resistência a quimioterápicos (MANORANJAN et al., 2013; SARVI et al., 2014). Atualmente já foram descritas em um grande número de tumores, como o de mama, pulmão e de colo uterino. As CTT são hipotizadas como as responsáveis pela manutenção do tumor em função de seu potencial ilimitado de auto-renovação, enquanto que as demais células neoplásicas apresentariam um potencial proliferativo limitado, embora rápido, ou estão completamente diferenciadas e já não deteriam a capacidade proliferativa (FAN; EBERHART, 2008; SINGH et al., 2003; SINGH et al., 2004). Evidências experimentais indicam que MB segue essa hipótese. Células com característica

tronco tumoral foram as únicas capazes de iniciar o tumor em camundongos *nude* em um modelo xenográfico, enquanto que a fração celular que não continha os marcadores para células tronco tumorais não apresentaram esta capacidade (SINGH et al., 2004). As CTT, devido à capacidade de dar origem a tumores xenográficos, também podem ser definidas como células iniciadoras de tumor.

Em um trabalho que tentava investigar a influência de genes em células neuronais para a propensão de desenvolvimento de tumores, Zheng e colaboradores (2008) identificaram que inativação nos genes supressores de tumor PTEN e P53 era suficiente para produzir, em modelo de rato, astrocitomas de alto grau. Porém não havia uma especificidade do vetor viral para o tipo celular. Posteriormente, Marino e colaboradores (2010) complementaram este trabalho demonstrando que a fração celular que possuía esta capacidade eram, surpreendentemente, as células tronco neurais (NSC, do inglês *Neural Stem Cell*), e estas expressavam marcadores como CD133+, Sox2 e Bmi1. São os mesmos marcadores muitas vezes vistos em CTT.

As CTTs em meduloblastoma têm sido identificadas pela presença de proteínas de membrana como CD133, CD44, Oct4, Nanog, Nestina e B-catenina (SINGH et al., 2004; ZANINI et al., 2013), bem como pela capacidade de formar esferas não aderentes em culturas livres de soro fetal bovino (SFB) (ZANINI et al., 2013). O ensaio de formação de meduloesferas (MBS) é considerado válido para o estudo de CSC *in vitro*, onde ZANINI e colaboradores (2013), mostraram que linhagens de DAOY, UW-228 e ONS-76 apresentavam maiores níveis de marcadores de *stemness* na MSA, como CD133, Sox2, B-catenina e Oct-4 em

relação à monocamada, em proporções que variam com cada linhagem. Além disso, as células CD133+ demonstraram ser mais resistentes à radioterapia que as CD133- (BLAZEK; FOUTCH; MAKI, 2007).

Recentemente um estudo tentou buscar evidência de uma população heterogênea na massa tumoral, tanto em marcadores quanto em morfologia celular e características funcionais. Morrison e colaboradores separaram células únicas de MB (linhagem Daoy), e as cultivaram separadamente, acompanhando a migração de cada população em matriz tridimensional de colágeno, onde foi observado que há uma grande variação na migração entre os grupos celulares, bem como na morfologia das células em cultura. Neste estudo foi evidenciada diferenças nas características celulares nas células que apresentavam ou não os marcadores CD133 e CD271. O marcador CD133 estava mais fortemente evidenciado em células com capacidade migratória, que quando isoladas tinham uma capacidade muito maior de migrar no meio com colágeno em relação à população CD133 negativa. Neste estudo foi demonstrado também a presença de um marcador para auto-renovação, o CD271, que apresentava uma maior expressão na população de células que mantinham as melhores condições de formar novas esferas no meio, característica descrita pelos autores como “auto-renovação” (MORRISON et al., 2013). Este estudo fez a triagem de diversos marcadores de membrana, porém marcadores intracelulares como Sox-2 e Oct4 não foram avaliados.

Em uma revisão feita por Tam e Ng (2014), os autores colocam o fator de transcrição Sox2, como um dos principais determinantes na manutenção da *stemness* – e o descreve como “*um mentor na origem do câncer*”. Células que

possuem o gene *sox2* são capazes de iniciar o tumor e dar origem à heterogeneidade tumoral, enquanto que a deleção de *Sox2* acarreta em uma involução do tumor (TAM; NG, 2014).

Vanner e colaboradores (2014) demonstraram que a inativação do receptor *Patch1*, o qual torna a via SHH constitutivamente ativa (por parada na inibição de *Smo*), gera uma fração de células com baixa expressão de *Sox2*, e alta expressão de genes de diferenciação neuronal. Esta fração foi capaz de gerar um medulloblastoma anaplásico em camundongos imunodeprimidos, o que evidencia a importância de vias de sinalização na formação deste tipo de câncer. Além disso, células que apresentam *Sox2* também apresentaram um passo de proliferação menor, tanto em relação a outras células tumorais quanto às células normais (VANNER et al., 2014).

CTTs parecem estar envolvidas na migração e metástase, além de aumentarem sua proporção quando tratadas com quimioterápico. Portanto, terapias que promovam a regulação da proliferação de CTTs ou a diferenciação neuronal dessas células são potenciais recursos para tratamentos mais efetivos.

1.3 Peptídeo Liberador de Gastrina e seu receptor GRPR

Peptídeo Liberador de Gastrina (GRP - do inglês *Gastrin-Releasing Peptide*) é um neuropeptídeo endógeno, homólogo ao seu equivalente em anfíbios, Bombesina. O GRP está localizado no cromossomo 18, e contém três exons e dois íntrons (ISCHIA et al., 2009). A transcrição deste gene gera o pré-pró GRP, e este pode

apresentar três variações feitas por splicing alternativo descritas até o momento, gerando peptídeos com 148, 141 ou 144 aminoácidos (SAUSVILLE et al., 1986). O pré-próGRP é traduzido em um polipeptídeo com 148 aminoácidos, sofre uma remoção de 23 aminoácidos, o que forma o GRP₁₋₁₂₅. Posteriormente, ocorre uma clivagem no lado N-terminal nos aminoácidos 29-30, que são duas lisinas, para produzir o peptídeo composto pela fração C-terminal, proGRP₃₁₋₁₂₅. Posteriormente, uma reação de hidrólise por uma carboxi-peptidase remove as duas lisinas da posição 29-30 na fração N-terminal, descritas anteriormente, para produzir o GRP_{1-27gly}. Uma aminação da metionina na porção C-terminal forma o GRP_{1-27amina}, e uma clivagem na arginina 17 deste peptídeo o GRP_{18-27amina} (ISCHIA et al., 2009). Este peptídeo GRP_{18-27amina} é o que foi utilizado neste estudo, como demonstrado na figura 3 (ISCHIA et al., 2009).

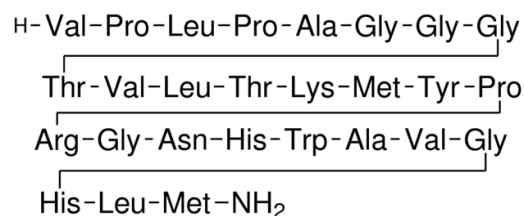


Figura 3. Esquema do peptídeo liberador de gastrina (GRP). A ilustração mostra a sua composição de 27 aminoácidos e sua aminação na porção C-terminal. Imagem retirada da Sigma-Aldrich.

Evidências recentes demonstram a influência do GRP na neurogênese no hipocampo de camundongos, e mostram que o *knock-down* do receptor deste peptídeo (GRPR) estimula a diferenciação neuronal (WALTON et al., 2014). Considerando as evidências recentes, é possível formular a hipótese de que alguma via de sinalização celular relacionada ao GRPR, possa ser um possível alvo na terapia contra o câncer. A expressão de GRPR foi confirmada em linhagens

celulares MB (SCHMIDT et al., 2010), e apesar de estudos iniciais demonstrarem que a modulação de GRPR não influencia na viabilidade destas células, não há nenhum estudo sobre a influência desse receptor em CTT de MB.

O ligante do GRP liga-se ao receptor GRPR, um receptor de membrana com 7 domínios transmembrana, que é acoplado aos membros heterodiméricos da Proteína G, como os da família Gq11 e G12/13 (FRUCHT et al., 1992). Diversos trabalhos demonstraram a capacidade deste receptor em ativar cascatas de sinalização celular ligadas ao câncer, bem como sua atuação em outros processos fisiológicos, como formação de memória ao medo (ROESLER et al., 2014), a sua influência em processos de inflamação e coceira (ANDOH et al., 2011; SUN; CHEN, 2007) e na quimiotaxia de neutrófilos (CZEPIELEWSKI et al., 2012). O receptor tem como mensageiro secundário o AMP cíclico (cAMP), e através deste ativa diversos nodos de sinalização celular como a fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) (ISHOLA et al., 2007) e leva a influxo de cálcio em neurônios ou mesmo a liberação de cálcio do retículo na formação de memórias (ROESLER et al., 2006), desencadeando a ativação de complexos cálcio-dependentes intracelulares. Além disso, a transativação de complexos GTPases Rho através de receptores acoplados à Proteína G foi relacionada a processos mitogênicos. Foi demonstrada a ativação da G α 13 através da estimulação com GRP pela via PDZ-RhoGEF (PDZ), por sua vez ativa RhoA/ROCK (PATEL, M. et al., 2014). Esta via (Rho) foi capaz de aumentar a capacidade de migração em células de câncer de colo uterino através do aumento dos níveis de Ciclooxygenase-2 (Cox-2).

O receptor GRPR foi descrito também em uma via de ativação da sinalização SHH por *crosstalk* através da ativação de transcrição do ligante hedgehog em câncer de pulmão de pequenas células (CASTELLONE et al., 2014). Foi demonstrado que a proteína G acoplada ao receptor GRPR, nas subunidades $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12/13}$, ativa a GTPase Rho, sendo que esta comunica ao NF κ B (YE, 2001) a ativação da transcrição do gene hedgehog, o qual inibindo o receptor Patch, deixa de inibir Smo e como destino final ativa a via SHH, que atua em um sistema autócrino e parácrino.

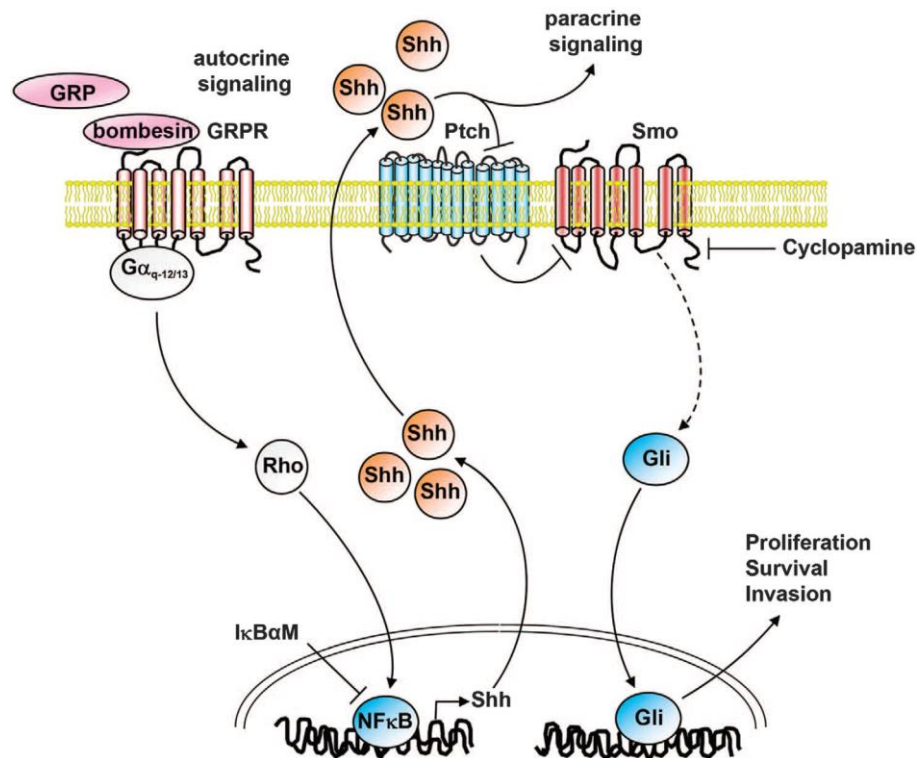


Figura 4. Modelo de ativação do NF- κ B pela sinalização por GRP e seu receptor GRPR. Neste exemplo, feito por Castellone e colaboradores (2014), é demonstrado como o receptor acoplado à proteína G GRPR pode ativar o fator de transcrição NF- κ B. (Imagem retirada de CASTELLONE et al., 2014)

Um trabalho feito por LI e colaboradores em 2010, com linhagens de células de carcinoma hepatocelular demonstrou a presença de GRP e GRPR, nestas células, e constatou que há um aumento da proliferação tanto em células HepG2

quanto em MHCC97H em concentrações que atingiram um *plateau* na proliferação em 100 nM de GRP. De acordo com os autores, que trabalharam sob condição de supressão de SFB, o efeito do GRP estaria relacionado à ativação da via ERK, pela fato de ocorrer um aumento na fosforilação de ERK na presença de GRP. ERK é uma proteína da via de sinalização das MAPK, que habitualmente está à jusante do receptor tirosina quinase EGFR, e apresentou-se mais fosforilada na condição de tratamento com GRP 100 nM em relação ao controle, indicando que a sinalização por GRPR pode estimular vias atuantes na proliferação, invasão e metástase. (LI et al., 2010).

Fica evidente portanto a importância do estudo do GRPR e seu ligante nos diversos tipos de cânceres que o expressam, tanto para entender a biologia tumoral, quanto para predizer novos alvos terapêuticos, tanto em monoterapia ou em adjuvância. Outro benefício do entendimento da biologia tumoral, é o novo conceito de letalidade sintética (MCLORNAN; LIST; MUFTI, 2014), cujo racional é ter como alvo duas vias importantes para a manutenção celular, que de modo ao atingi-las, o impacto seria tão grande que levaria à morte celular. Um exemplo é o conceito do uso de inibidores de PARP para atingir células que possuem o reparo de DNA defeituoso, o que leva a um efeito cumulativo de dano ao DNA que terá por fim a morte celular (AUDEH, 2014).

A importância deste entendimento permite criar estratégias inteligentes para a terapia contra o câncer, e propicia, por exemplo, utilizar um anticorpo anti-receptor conjugado a um quimioterápico ou a um mRNA, para dar mais especificidade à

terapia e diminuir os efeitos colaterais da doença, que já são tão intensos e devastadores.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa entender qual a resposta e função da via de sinalização do GRP e GRPR na proliferação e expansão de células tronco tumorais de medulloblastoma.

Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão de mRNA do marcador de célula tronco tumoral Sox2 por meio da técnica de transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em esferas tratadas ou não com GRP e RC-3095, o antagonista do receptor do GRP;
- Avaliar os efeitos do GRP e do antagonista do seu receptor, o RC-3095 na proliferação e expansão de células tronco tumorais da linhagem celular D283 de medulloblastoma.

3. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Câncer (LaPesc) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob orientação de Rafael Roesler durante o período de julho de 2014 a dezembro do mesmo ano.

Apoio financeiro: HCPA, INCT-TM, ICI-RS e CNPq.

A revista escolhida foi a *Journal of Molecular Neuroscience*, pois ela visa entender a função do SNC com ênfase à clínica, bem como divulgar avanços na ciência básica. Estes, portanto, foram os critérios de escolha da revista.

Fator de impacto (2013): 2,757

GRP Increases Medullosphere Size of D283 Cells in the Absence of EGF/FGF

Mauro Miguel Masiero¹, Mariane Jaeger^{1,2}, Caroline Brunetto de Farias^{1,2,3}, Gilberto Schwartzmann^{1,5}, Rafael Roesler^{1,2,4}

Filiation

¹ Cancer Research Laboratory, Center for Experimental Research (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, RS, Brazil

² National Institute for Translational Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Children's Cancer Institute (ICI-RS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

To whom the correspondence should be addressed:

Rafael Roesler, Pharmacology Department, Federal University of Rio Grande do Sul.
Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro, UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
90046-900

Phone: +55 51 33083183; fax: +55 51 33083121

Email: rroesler@terra.com.br

Abstract

Medulloblastoma (MB) is a highly undifferentiated solid tumor, often featuring remarkable cellular heterogeneity and the association with neural development. Cancer stem cell (CSC) is a model that is important for tumor initiation, progression and resistance to treatment, and studies have showed CSC characteristics in MB samples and cell lines. GRP receptor (GRPR) plays an important role in many cancer types, but few studies aimed at the understanding of its function in medulloblastoma. The aim of this study is to test the influence of gastrin-releasing peptide (GRP) in the maintenance of CSC. To do this, we used a cancer stem cell-enrichment model, defined as medullospheres formation assay (MSA), to select and expand the CSC population, that we found to be Sox2 positive. Also, sphere morphometric analysis was performed to evaluate the growth of medullospheres (MBS), and we found that GRP increased significantly the Sox2+ MBS size under the depletion of growth factors EGF and FGF in the MSA. So far, we sought a better understanding of the role of GRP in MB, as well to find new potential therapies targets or risk factors for the disease.

Keywords: Medulloblastoma, Gastrin-releasing peptide, Cancer stem cells, Brain tumor, Medullosphere, Childhood cancer.

Introduction

Medulloblastoma is a primitive neuroectodermal tumor with origins in the cerebellum, probably derived from brain progenitors during inter or post-neural development (Singh et al., 2003; Marshall et al., 2014). MB is more frequent in children, and the incidence ranges from a double peak in age 3 to 4 and 7 to 8 (GIORDANA et al., 1999). During the past four decades, significant improvement has been made to increase global survival and diminish disease burden, and such efforts increased the survival in 5 years from around 40% in 1970 decade (Kopelson et al., 1983) to 70% to 80% in 2013 (Aref; Croul, 2013). This was possible due to more efficient chemotherapy protocols, craniospinal radiotherapy and adjuvant care. Despite the improvement, MB still has a harsh prognostic, especially considering the cognitive impairments resulting from the intensive treatment (Gerber et al., 2014). Currently is consensus the stratification of MB into four molecular subgroups: Sonic Hedgehog (SHH), Wnt (Wingless), Group 3 and Group 4. Each group predict prognosis, potential of metastasis and are age-dependent (Taylor et al., 2012).

Gastrin-Releasing Peptide is a small peptide, with a role in a multitude of physiological process, such as memory consolidation (Roesler et al., 2006) , neuronal differentiation (Walton et al., 2014), neutrophil chemotaxis (Czepielewski al., 2012), and in cancer, GRP has been found to promote proliferation, enhance cancer cell migration and cell cycle progression (Patel; Shulkes; Baldwin, 2006, Ishola et al., 2007). Beyond that, its receptor GRPR, that is coupled to the G protein, has been found to crosstalk with Sonic hedgehog (Shh) signaling through transcriptional activation of Patch's ligand hedgehog in small cell lung carcinoma (Castellone et al., 2014). In neuroblastoma, GRP receptor downregulated PTEN, an

inhibitor of PI3K (Ishola et al., 2007), which is an important pathway in cancer due to phosphorylation of its downstream Akt and activation of genes that are related to cell cycle progression and inhibition of apoptosis (Liang; Slingerland, 2003).

Our group has previously demonstrated the presence of GRPR in D283 cell line, but there was no difference in the viability when MB cell lines were treated with the agonist of the receptor, GRP. Although the result did not show difference, the importance of the receptor in other cancers indicate that the influence of this signaling in MB requires more investigation (Schmidt et al., 2010).

MB has a well-characterized population of Cancer Stem Cells (CSC) (Fan; Eberhardt, 2008; Manoranjan et al., 2013). CSC are hypothesized to be the cancer initiating cells, due to the capability to initiate xenographic tumors in NOD/SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficient) mice (Singh et al., 2003). Furthermore, in a medulloblastoma-induced model, the neural stem cells (NSCs) derived population presented markers for CSC, such as Sox2 and Nestin, whereas the cancer population derived from granule cell layer did not present these markers. The NSC-derived cells were able to generate MB in mice in quantities as few as 100 cells, and when comparing to granule cells, the tumor burden was more significant (Sutter et al., 2010). Sutter (2010) also showed that Sox2 expression in MB lead to a decrease in disease-free survival, when comparing to the patients who are Sox2 negative.

Beyond that, Sox2 cells demonstrated lower proliferative capacity, increased resistance to anti-mitotic therapy, with Sox2 population being enriched after that, and also could drive MB progression by stimulating SHH subgroup proliferation (VANNER et al., 2014). Besides, a recent study showed differences in CSC markers

for migration and stemness. While CD133+ cells had higher migration capabilities, CD271 was endowed with self-renewing characteristics. (Morrison et al., 2013).

Considering the potential harm that CSC may have, and the evidences showing that GRP and its receptor might be linked to pathways that drive cancer progression, our aim with this study was to better understand the function of GRP in CSC, as well to track for evidences that allow the creation of more specific therapies that can target these cells.

Materials and Methods

Cell culture

D283 cell line was purchased from ATCC – American Type Culture Collection (Rockville, USA). D283 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Low (DMEM/Low, Gibco, Grand Island, USA) containing 10% Fetal Bovine Serum (SBF, Gibco, BRL), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, BRL) and 1% Fungizone (Gibco, BRL) in T25 flasks (TPP, Switzerland). The cells were maintained in 5% CO₂ at 37°C.

Medullosphere formation assay (MSA)

This method was described previously by (Nor et al., 2013) with small modifications. When reaching a confluence higher than 80% in monolayer, cells were trypsinized and maintained in serum-free DMEM/F12, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,1% Fungizone, 20 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 20 ng/mL basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, Sigma-Aldrich), 1X B27 (Gibco, BRL), 1X N-2 supplement liquid (Life Technologies, USA), 50 ug/mL of bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) and plated in 96 well plate (TPP, Switzerland), at 1×10^3 cells/mL with FGF/EGF supplementation or in the privation of these factors. Cells were kept at 37°C for 5 days or until optimal sphere growth was observed. New medium was added at day three, or when there was signals of acidification. Each experiment was repeated at least three times. Spheres that contained more than seven visible cells were counted.

Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

To perform RNA extraction, we maintained 1×10^4 D283 cells/mL in 12 well plate, (TPP, Switzerland) for 5 days as a MSA, otherwise until the sphere formation was optimum for extraction. Cells were kept at 37°C and CO₂ at 5%. In order to demonstrate that our cells express the markers for CSC, we isolate RNA through TriZol (Invitrogen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instruction. RNA was quantified using Nanodrop (Thermo-Scientific, Waltham USA). To obtain higher yields of pure RNA, we performed RQ1 RNase-Free DNase protocol (Promega, Fitchburg, USA), according to the manufacturer's protocol, followed by SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Promega, Fitchburg, USA) to obtain cDNA. PCR was performed under optimal conditions for each primer, with GoTaq Green Master Mix (Promega, Fitchburg, USA), starting with a first cycle of 5 minutes at 94 °C, as requested in manufacturer's protocol, followed by 32 cycles of the sequence: denaturation at 95°C for 60s, annealing at the optimum temperature for each primer (at ~60°C) for 40s, and an extension at 72°C for 40s, followed by a final extension at 72°C for 5 minutes. The amplified fragments were separated in 1% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The primers were bought by IDT (Coralville, USA) and the sequences are: β -actin Forward 5' AAA CTG GAA CGG TGA AGG TG 3', β -actin Reverse 5' AGA GAA GTG GGG TGG CTT TT 3'; Sox2 Forward 5' ACACCAATCCCATCCACACT 3', Reverse 5' GCAAACCTTCCTGCAAAGCTC 3'.

Medullosphere morphometric analysis and statistics

To evaluate medullosphere (MBS) volume size, we used ImageJ software. Spheres that presented more than seven cells were counted, using an ImageJ contrast threshold. We defined the relation pixel per μ M using as pattern a bar generated by

the microscope Olympus IX71 software, ensuring that all samples have the same scale. Data is shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between mean values were evaluated by one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc tests when appropriate. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Oncogene databank analysis

In order to have a preliminary notion about the expression of GRPR, we first assessed Oncogene databank and checked for the comparison between the GRPR transcription in cancer versus cancer condition, and also the differences between cancer and normal cerebellum tissue. The mRNA expression profile provided by Oncogene databank was generated in a microarray *Affymetrix* platform. The data source analyzed was identified as Ramaswamy Multi-Cancer Statistics and Pomeroy Brain Statistics.

Results

Tumor databank Oncogene shows higher expression of GRPR in medulloblastoma rather than in other brain tumors

We analyzed the relative expression of the GRPR mRNA by RNA microarray data provided by Oncogene. The relative expression of GRPR was higher in MB (Figure 1) when compared to other tumors. Some samples of MB showed higher expression of GRPR even when compared with another CNS cancer, glioblastoma, and also in comparison to lung adenocarcinoma. In addition, when comparing to the normal tissue of cerebellum, some types of medulloblastoma showed a relative increase in the expression of GRPR (Figure 2).

D283 medullospheres show transcription factor Sox2 as a CSC marker

The expression of Sox2 in MBS was analyzed in comparison to a control of β -actin. In figure 3, we show that our model of CSC population have the CSC marker Sox2, in either MBS or MBS treated with 100 nM GRP group (LI et al., 2010). The expression of Sox2 indicates that our model of CSC is consistent to the literature, and can stand as an assay to test our treatment.

GRP does not increase the number of medullospheres

The effect of GRPR ligand, GRP, and its antagonist RC-3095 was investigated. Figure 4 shows that GRP at a concentration of 100 nM does not increase the relative number of medullospheres when compared to the control. We also tested the hypothesis that MBS might have an autocrine signaling, and this does not seem to be true, because in the group with 500 nM RC-3095 we did not find significant

changes in sphere number. This group had the supplementation of FGF and EGF. In figure 5, we also compared sphere number, but under privation of the growth factors FGF and EGF, and also no difference was found in the GRP and RC-3095 groups.

GRP increases medullosphere size in the lack of EGF and FGF growth factors

In order to check if there is any effect on the average size of medullosphere, we performed a MSA for 5 days under the FGF/EGF growth factor supplementation or in privation of them. In figure 6, we supplemented the medium with FGF/EGF and no significant size difference was observed between the control group, GRP 100 nM and RC-3095 500 nM. RC-3095 was used in order to check if MBS are secreting GRP, as a autocrine signaling, but no significant change between this group and the control was observed. In figure 7, we cultured MBS under privation of EGF and FGF, and surprisingly we found that GRP, under this condition, can increased sphere volume size. Again, no significant difference among the 500 nM RC-3095 group and the control was observed. The representative images are showed in figure 8.

The increase in MBS size in the privation of EGF and FGF indicates that some downstream of EGF or FGF receptor may crosstalk with the downstream of GRPR. Previous evidences of the interaction between GRPR and a downstream of ERK pathway have been described in hepatocellular carcinoma (Li et al., 2010), which is a common node of both pathways.

We can also see an increase in the frequency of bigger MBS in the treatment with GRP (Figure 9E) when comparing to control (Figure 9D), indicating that some downstream pathway of GRPR can act increasing the volume size of MBS. It is not possible to see this difference is MBS size in the group with FGF/EGF

supplementation when comparing GRP (Figure 9B) to the control group (Figure 9A), with a similar plot profile among these groups.

Discussion

GRP and GRPR play an important role in many cancer types, so refined strategies are being tested to target and investigate this signaling pathway (Sioud; Mobergslie, 2012). Although previous studies were made to understand GRPR signaling in MB (Schmidt et al., 2010), little is known about the effect of GRPR in CSC. MB presents itself as a highly heterogeneous tumor, with many types of cells that show different morphology and have a variety of responses that differ from each protein expression profile (Morrison et al., 2013). Our study shows that GRP can increase MBS size only under depletion of growth factors FGF and EGF in medulloblastoma CSC. It is still unknown if gastrin-releasing peptide can enhance CSC self-renewal and proliferation or if it stimulates the differentiation of these cells into cells that possess higher proliferative capacity to then, increase MBS size.

A previous study showed that stimulation GRPR with its agonist GRP can induce ERK phosphorylation in hepatocellular carcinoma (Li et al., 2010), which is a downstream of EGF, and this may be the reason to the lack of response to GRP in the supplemented medium with EGF and FGF.

We did not find any response to the RC-3095 treatment in either group, so the hypothesis of MB CSC having GRP as an autocrine signaling did not appear to be right. So far, another group showed that glioblastoma cultured as monolayer does not alter its proliferation when treated with GRPR antagonist RC-3095, so it does not seem credible that GRP-GRPR function as an autocrine signaling (Kiaris et al., 1999).

For the future, is it necessary to clarify which pathway is driving the increase in MBS size, and if it is involved with CSC differentiation, generating a population that replicates faster, or if it directly increases CSC proliferation.

References

- Aref, D. & Croul, S. 2013. Medulloblastoma: recurrence and metastasis. *CNS Oncol*, 2(4), pp 377-85.
- Castellone, M. D., Laukkanen, M. O., Teramoto, H., Bellelli, R., Ali, G., Fontanini, G., Santoro, M. & Gutkind, J. S. 2014. Cross talk between the bombesin neuropeptide receptor and Sonic hedgehog pathways in small cell lung carcinoma. *Oncogene*.
- Czepielewski, R. S., Porto, B. N., Rizzo, L. B., Roesler, R., Abujamra, A. L., Pinto, L. G., Schwartzmann, G., Cunha Fde, Q. & Bonorino, C. 2012. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(2), pp 547-52.
- Fan, X. & Eberhart, C. G. 2008. Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol*, 26(17), pp 2821-7.
- Gerber, N. U., Mynarek, M., von Hoff, K., Friedrich, C., Resch, A. & Rutkowski, S. 2014. Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer Treat Rev*, 40(3), pp 356-65.
- Giordana, M. T., Schiffer, P., Lanotte, M., Girardi, P. & Chio, A. 1999. Epidemiology of adult medulloblastoma. *Int J Cancer*, 80(5), pp 689-92.
- Ishola, T. A., Kang, J., Qiao, J., Evers, B. M. & Chung, D. H. 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1770(6), pp 927-32.
- Kiaris, H., Schally, A. V., Sun, B., Armatis, P. & Groot, K. 1999. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncogene*, 18(50), pp 7168-73.
- Kopelson, G., Linggood, R. M. & Kleinman, G. M. 1983. Medulloblastoma. The identification of prognostic subgroups and implications for multimodality management. *Cancer*, 51(2), pp 312-9.
- Li, X., Lv, Y., Yuan, A., Yi, S., Ma, Y. & Li, Z. 2010. Gastrin-releasing peptide promotes the growth of HepG2 cells via EGFR-independent ERK1/2 activation. *Oncol Rep*, 24(2), pp 441-8.
- Liang, J. & Slingerland, J. M. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2(4), pp 339-45.
- Manoranjan, B., Venugopal, C., McFarlane, N., Doble, B. W., Dunn, S. E., Scheinemann, K. & Singh, S. K. 2013. Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett*, 338(1), pp 23-31.

- Morrison, L. C., McClelland, R., Aiken, C., Bridges, M., Liang, L., Wang, X., Di Curzio, D., Del Bigio, M. R., Taylor, M. D. & Werbowski-Ogilvie, T. E. 2013. Deconstruction of medulloblastoma cellular heterogeneity reveals differences between the most highly invasive and self-renewing phenotypes. *Neoplasia*, 15(4), pp 384-98.
- NOR, C. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol*, v. 48, n. 3, p. 533-43, Dec 2013.
- Patel, O., Shulkes, A. & Baldwin, G. S. 2006. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1766(1), pp 23-41.
- Roesler, R., Kent, P., Luft, T., Schwartzmann, G. & Merali, Z. 2014. Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. *Neurobiol Learn Mem*, 112(44-52).
- Schmidt, A. L., de Farias, C. B., Abujamra, A. L., Kapczinski, F., Schwartzmann, G., Brunetto, A. L. & Roesler, R. 2010. BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci*, 40(3), pp 303-10.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18), pp 5821-8.
- Sioud, M. & Mobergslien, A. 2012. Efficient siRNA targeted delivery into cancer cells by gastrin-releasing peptides. *Bioconjug Chem*, 23(5), pp 1040-9.
- Sutter, R., Shakhova, O., Bhagat, H., Behesti, H., Sutter, C., Penkar, S., Santuccione, A., Bernays, R., Heppner, F. L., Schuller, U., Grotzer, M., Moch, H., Schraml, P. & Marino, S. 2010. Cerebellar stem cells act as medulloblastoma-initiating cells in a mouse model and a neural stem cell signature characterizes a subset of human medulloblastomas. *Oncogene*, 29(12), pp 1845-56.
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M. & Pfister, S. M. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, 123(4), pp 465-72.
- Vanner, R. J., Remke, M., Gallo, M., Selvadurai, H. J., Coutinho, F., Lee, L., Kushida, M., Head, R., Morrissy, S., Zhu, X., Aviv, T., Voisin, V., Clarke, I. D., Li, Y., Mungall, A. J., Moore, R. A., Ma, Y., Jones, S. J., Marra, M. A., Malkin, D., Northcott, P. A., Kool, M., Pfister, S. M., Bader, G., Hochedlinger, K., Korshunov, A., Taylor, M. D. & Dirks, P. B. 2014. Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma. *Cancer Cell*, 26(1), pp 33-47.

- Walton, N. M., de Koning, A., Xie, X., Shin, R., Chen, Q., Miyake, S., Tajinda, K., Gross, A. K., Kogan, J. H., Heusner, C. L., Tamura, K. & Matsumoto, M. 2014. Gastrin-releasing peptide contributes to the regulation of adult hippocampal neurogenesis and neuronal development. *Stem Cells*, 32(9), pp 2454-66.
- Zanini, C., Ercole, E., Mandili, G., Salaroli, R., Poli, A., Renna, C., Papa, V., Cenacchi, G. & Forni, M. 2013. Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 cells: increased stem cell population and proteomic modifications. *PLoS One*, 8(5), pp e63748

Figures Caption

Fig 1. GRPR expression in several cancer types. The GRP receptor expression is higher in medulloblastoma in comparison to other cancer types, even to others central nervous system cancers, like glioblastoma. In this image, generated from Oncogene databank, was used an Affymetrix HumanGeneFL Array, Hu35KsubA platform to verify the mRNA expression of several primary cancer samples.

Fig. 2. GRPR expression compared to the cerebellum normal tissue. The GRPR expression is increased in some MB samples in relation to the cerebellum normal tissue. The image shows the receptor being expressed in MB while in others CNS cancers like glioma and PNET, GRPR has a low expression profile. In this image, generated from Oncogene databank, was used a Affymetrix HumanGeneFL Array platform to verify the mRNA expression of several primary cancer samples compared to a normal cerebellum tissue.

Fig. 3 RT-PCR shows the expression of sox2 in both MBS and MBS treated with GRP 100 nM. MSA in the presence of EGF and FGF was performed as described previously, and cDNA was analyzed by RT-PCR. The PCR product size was 190 base pair (bp) for β -actin and 224 bp for Sox2.

Fig. 4 GRP does not increases medullosphere number in FGF/EGF supplemented medium. 1×10^3 cells/well were plated in serum-free DMEM-F12 medium with FGF/EGF supplementation, and in the presence of GRPR agonist (GRP) or with GRPR antagonist RC-3095. No difference was found between the groups. (mean \pm SEM)

Fig. 5 GRP does not increases medullosphere number in FGF/EGF free medium. 1×10^3 cells/well were plated in DMEM-F12 medium without FGF/EGF

supplementation, and in the presence of 100 nM GRPR agonist (GRP) or with 500 nM GRPR antagonist RC-3095. (mean \pm SEM)

Fig. 6 GRP does not increase medullosphere size in FGF/EGF supplemented medium. 1×10^3 cells/well were plated in DMEM-F12 medium with FGF/EGF supplementation, and in the presence of 100 nM GRPR agonist (GRP) or with 500 nM GRPR antagonist RC-3095. (mean \pm SEM)

Fig. 7 GRP increases medullosphere size in FGF/EGF free medium. 1×10^3 cells/well were plated in DMEM-F12 medium with or without FGF/EGF supplementation, and in the presence of GRPR agonist (GRP) or with GRPR antagonist RC-3095. Significant difference was found between the control group and GRP 100 nM. (mean \pm SEM; *. $P = < 0,038$)

Fig. 8 Representative photomicrograph of the MBS at 100x magnification. Groups A-C were supplemented with FGF/EGF or deprived of EGF/FGF, groups D-F. Groups B and E were treated with 100 nM GRP, whereas groups C-F were treated with 500 nM RC-3095. The scale bar represents 500 nM.

Fig. 9 Distribution of medullospheres according to their size. It is possible to see that GRP 100 nM can increase MBS size in the FGF/EGF deprived medium (E) when comparing to control, but this does not happen when the medium was supplemented with EGF/FGF. This indicated that the GRPR downstream action might be related to the downstream signaling of FGF or EGF.

Ramaswamy Multi-cancer Statistics

Reporter: M73481_at ▼

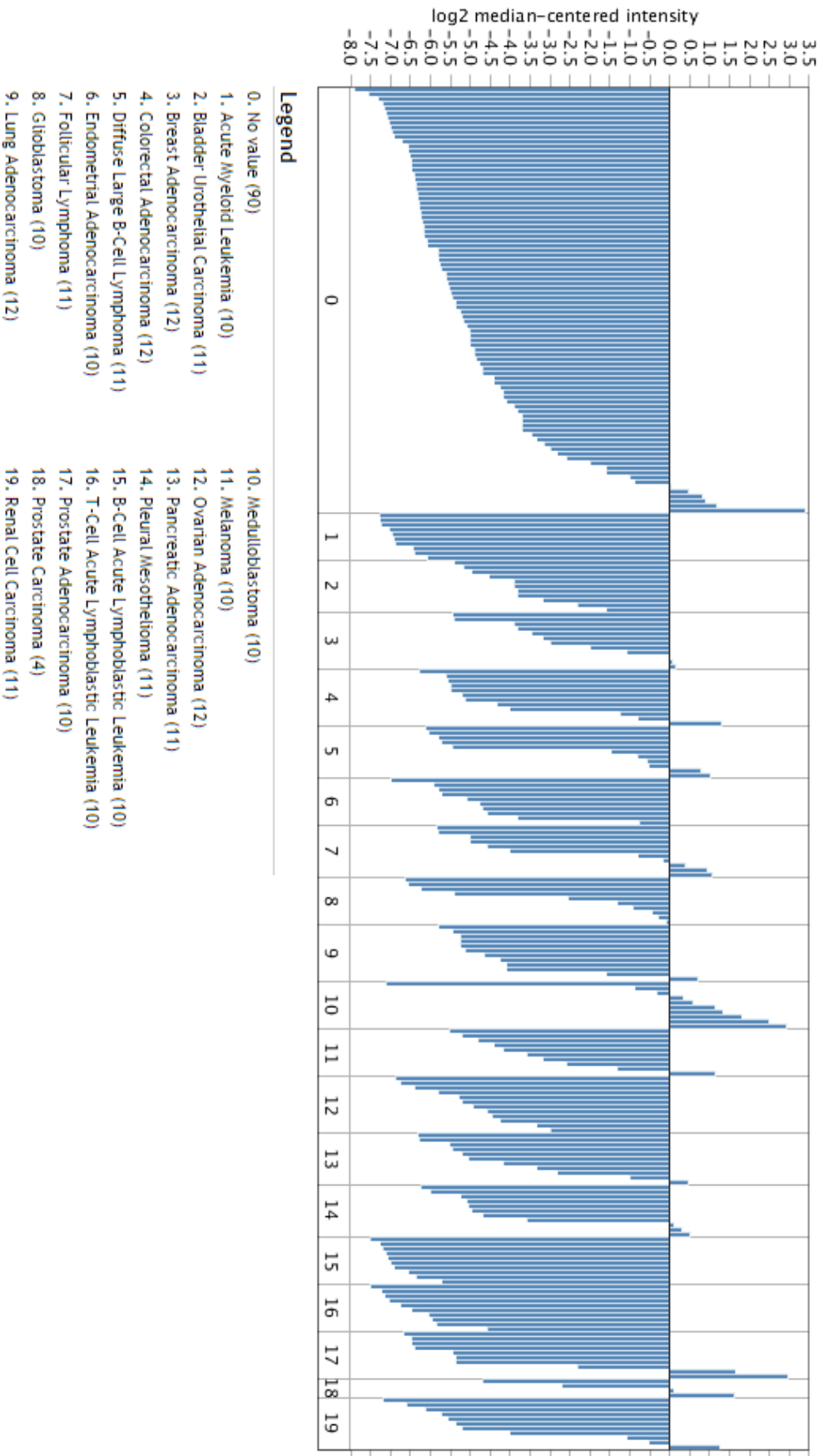


Figure 1

Figure 2

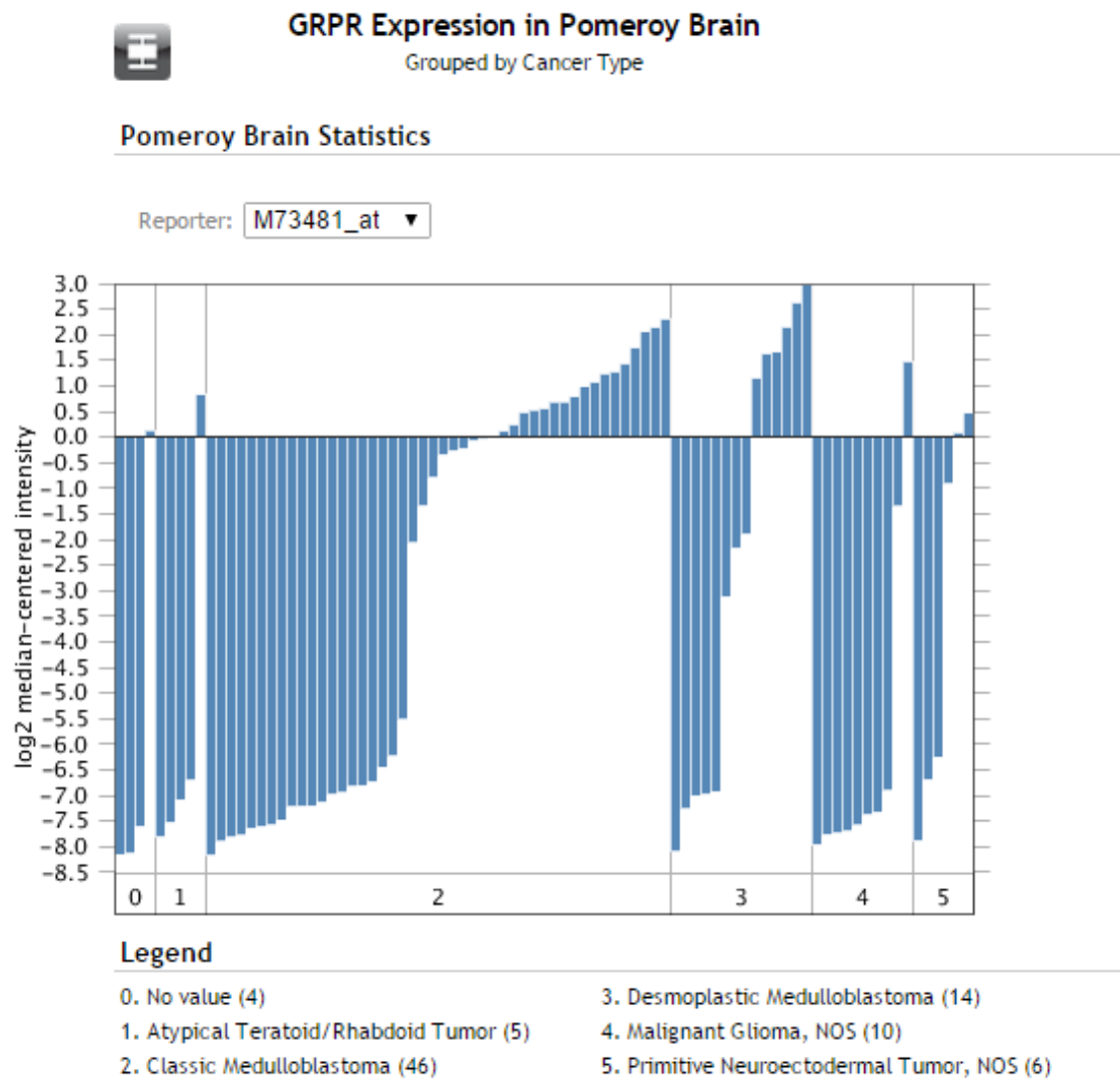


Figure 3

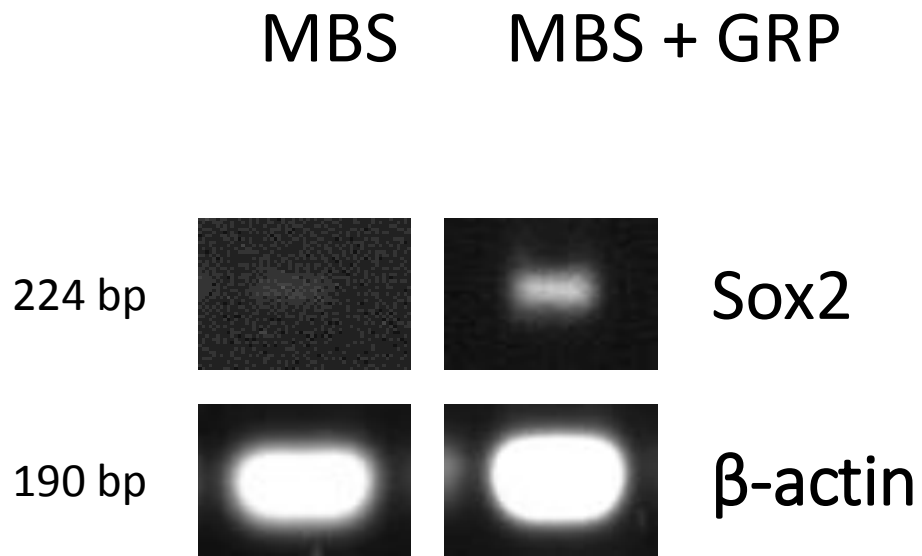


Figure 4

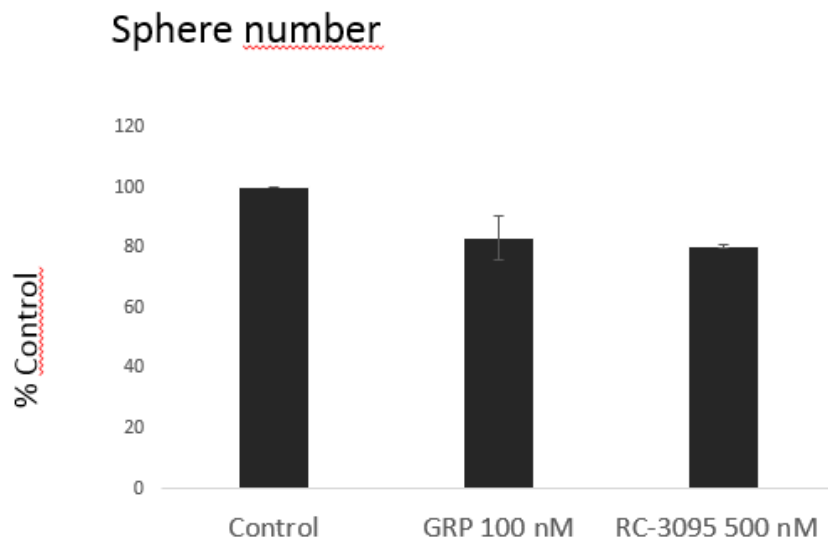


Figure 5

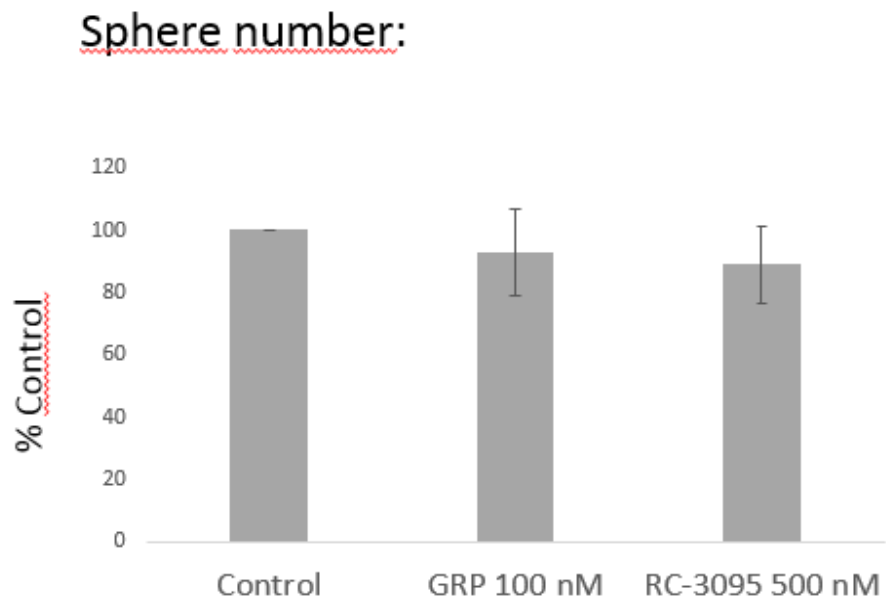


Figure 6

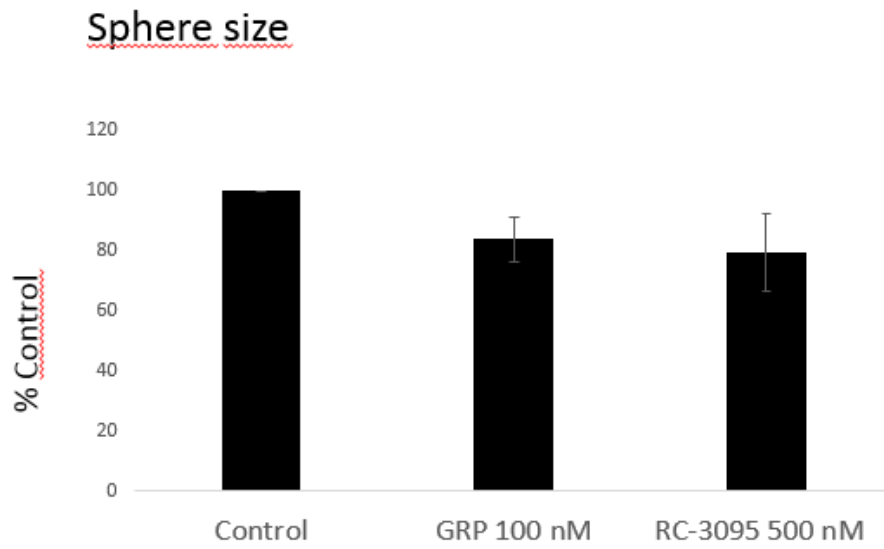


Figure 7

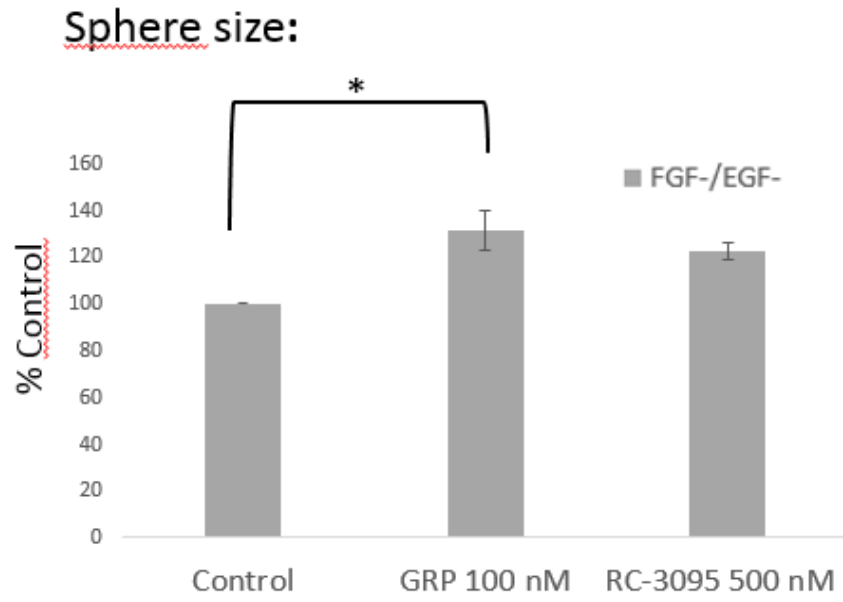


Figure 8

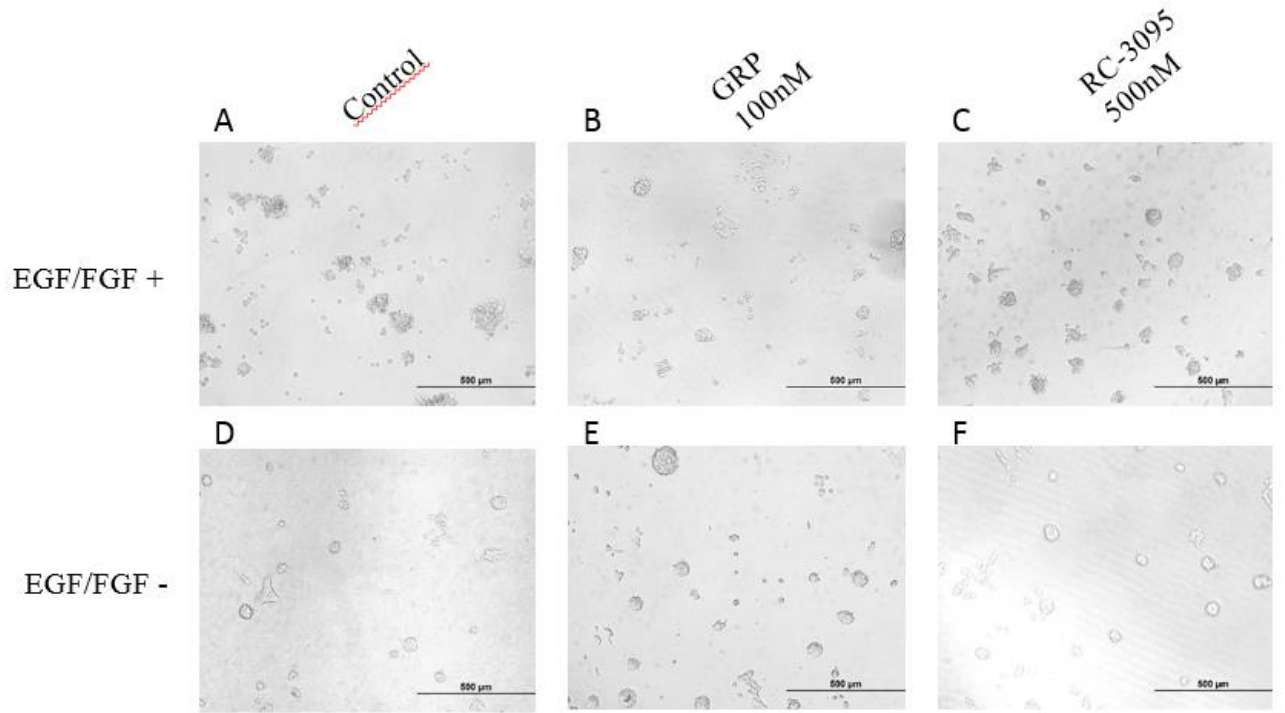
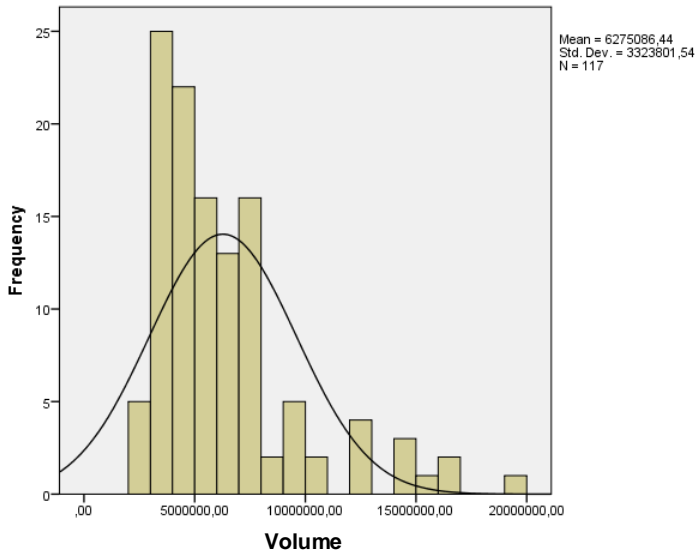


Figure 9

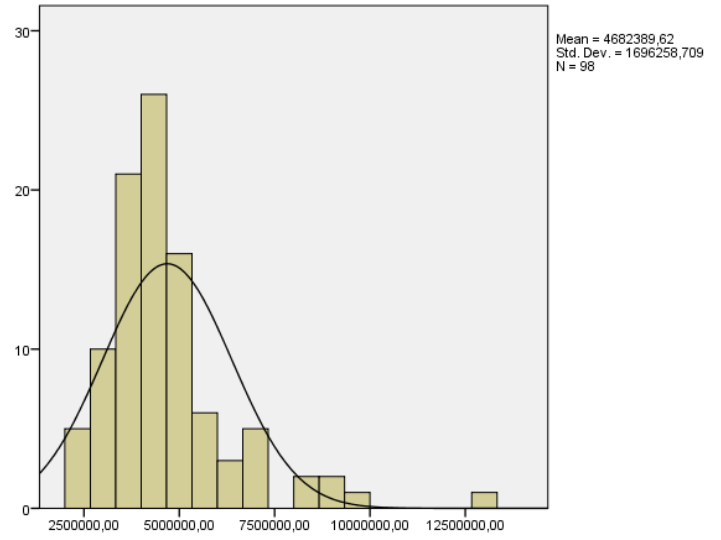
A

Control EGF+/FGF+



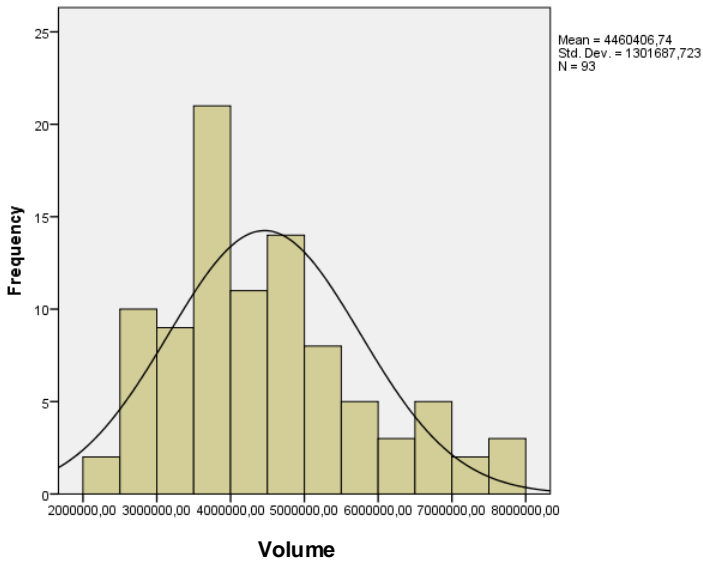
B

GRP 100 nM EGF+/FGF+



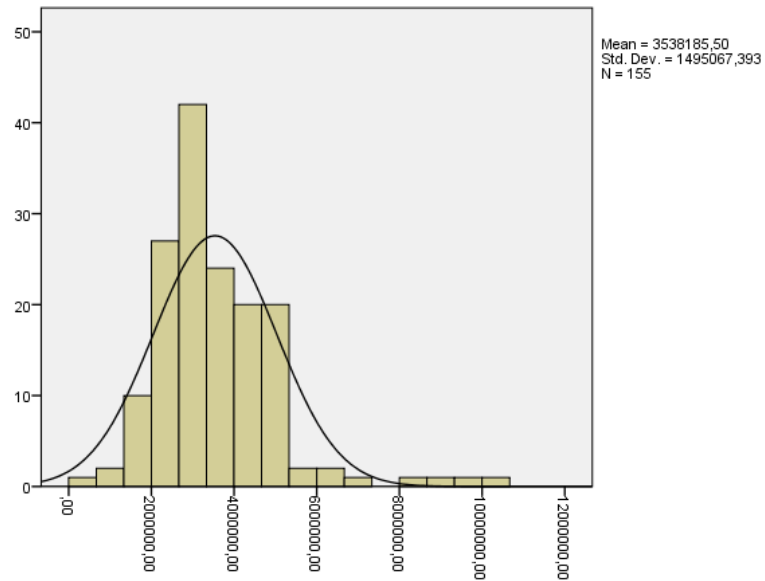
C

RC-3095 500 nM EGF+/FGF+



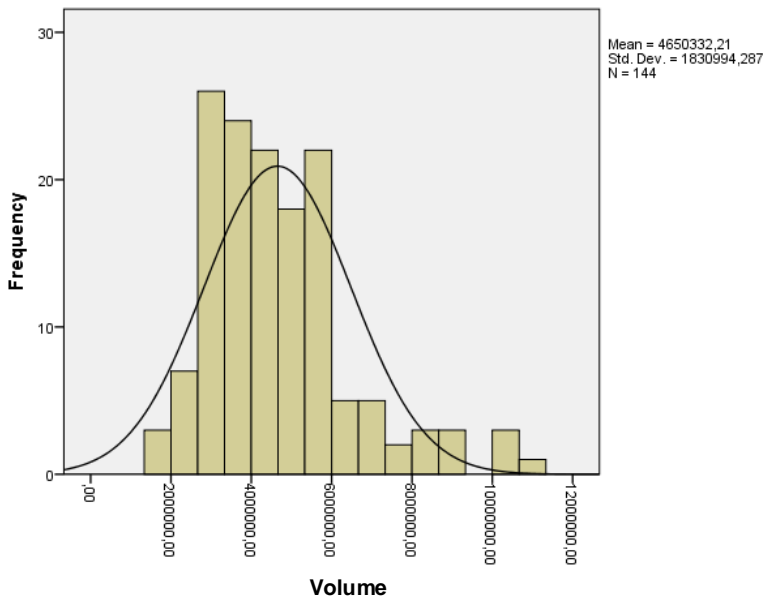
D

Control EGF-/FGF-



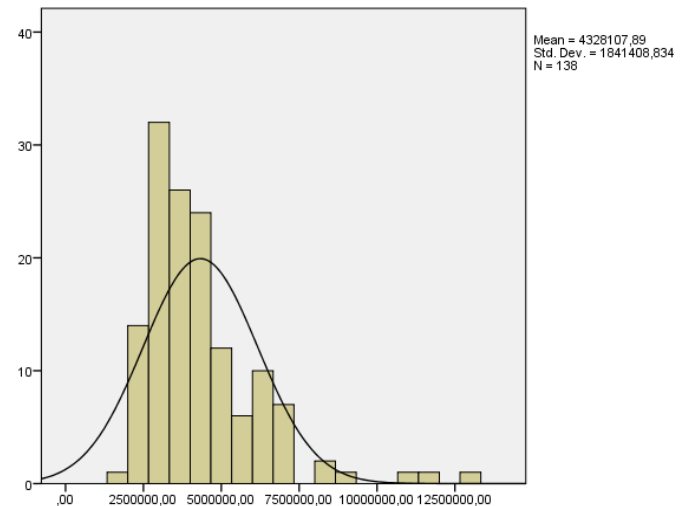
E

GRP 100 nM EGF-/FGF-



F

RC-3095 500 nM EGF-



4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do GRP na proliferação e expansão de CSC, bem como se havia alguma sinalização autócrina entre o GRP e o GRPR, através da utilização do inibidor do receptor RC-3095.

Considerando que a influência desta sinalização já está descrita em diversos tipos de tumores, e muitos estudos mostram que esta sinalização é importante e se comunica com diversos nodos envolvidos na tumorigênese, o estudo do desta via pode indicar novos alvos terapêuticos, bem como fornecer novas informações sobre mecanismos envolvidos na biologia tumoral.

Este trabalho mostrou que o GRP aumenta significativamente o tamanho das meduloesferas na condição de ausência de EGF e FGF. Isto mostra que tanto o GRP influencia na expansão ou diferenciação de células tronco tumorais, bem como que alguma via *downstream* ao FGF e EGF pode estar envolvida nesta sinalização, já que não houve resposta do GRP na condição de suplementação com estes fatores.

Identificamos também que as MBS expressam Sox2, um marcador de CSC que está ligado a indiferenciação celular e cuja expressão está presente em progenitores neurais. Este dado indica que o modelo de meduloesferas é válido, e que estas células representam uma população com característica de CSC, de acordo com o que vem sendo descrito na literatura.

Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares, e mais estudos são necessários para complementá-lo. Por exemplo, realizar o *know-down* do receptor e inibir as vias de sinalização como a ERK ou PI3K, que são vias *downstream* do receptor GRPR, poderão no futuro servir como estratégias viáveis para melhor compreender a função deste receptor. A superexpressão de GRPR tanto em MB quanto em fibroblastos para avaliar proliferação e diferenciação também seriam estratégias interessantes no futuro. Caracterizar como ocorre este aumento no volume das esferas, bem como por qual via o receptor GRPR está atuando, será necessário para elucidar a influência deste receptor em MB.

5. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

ANDOH, T. et al. Gastrin-releasing peptide induces itch-related responses through mast cell degranulation in mice. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2098-103, Oct 2011.

ARAUJO, O. L. et al. Analysis of survival and prognostic factors of pediatric patients with brain tumor. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 5, p. 425-32, Sep-Oct 2011.

AUDEH, M. W. Novel treatment strategies in triple-negative breast cancer: specific role of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibition. **Pharmgenomics Pers Med**, v. 7, p. 307-16, 2014.

BARKER, D. J. et al. The prenatal origins of lung cancer. II. The placenta. **Am J Hum Biol**, v. 22, n. 4, p. 512-6, Jul-Aug 2010.

BEHESTI, H.; MARINO, S. Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 3, p. 435-45, Mar 2009.

BLAZEK, E. R.; FOUTCH, J. L.; MAKI, G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 67, n. 1, p. 1-5, Jan 1 2007.

CHAN, M. D. et al. Radiation-induced adult medulloblastoma: a two-case report and review of the literature. **J Neurooncol**, v. 103, n. 3, p. 745-9, Jul 2011.

FRUCHT, H. et al. Characterization of functional receptors for gastrointestinal hormones on human colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 52, n. 5, p. 1114-22, Mar 1 1992.

ISCHIA, J. et al. Gastrin-releasing peptide: different forms, different functions. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 69-75, Jan-Feb 2009.

KOOL, M. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 4, p. 473-84, Apr 2012.

MARSHALL, G. M. et al. The prenatal origins of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 4, p. 277-89, Apr 2014.

MCKEAN-COWDIN, R. et al. Trends in childhood brain tumor incidence, 1973-2009. **J Neurooncol**, v. 115, n. 2, p. 153-60, Nov 2013.

MCLORNAN, D. P.; LIST, A.; MUFTI, G. J. Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer. **N Engl J Med**, v. 371, n. 18, p. 1725-35, Oct 30 2014.

MILLE, F. et al. The shh receptor boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. **Dev Cell**, v. 31, n. 1, p. 34-47, Oct 13 2014.

NOR, C. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 3, p. 533-43, Dec 2013.

PATEL, M. et al. Galpha13/PDZ-RhoGEF/RhoA signaling is essential for gastrin-releasing peptide receptor-mediated colon cancer cell migration. **Mol Pharmacol**, v. 86, n. 3, p. 252-62, Sep 2014.

PUI, C. H. et al. Challenging issues in pediatric oncology. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 9, p. 540-9, Sep 2011.

REMKE, M. et al. Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 19, p. 2717-23, Jul 1 2011.

ROESLER, R. et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 2, p. 350-7, Aug 2006.

SARVI, S. et al. CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist. **Cancer Res**, v. 74, n. 5, p. 1554-65, Mar 1 2014.

SAUSVILLE, E. A. et al. Expression of the gastrin-releasing peptide gene in human small cell lung cancer. Evidence for alternative processing resulting in three distinct mRNAs. **J Biol Chem**, v. 261, n. 5, p. 2451-7, Feb 15 1986.

SCHROEDER, K.; GURURANGAN, S. Molecular variants and mutations in medulloblastoma. **Pharmgenomics Pers Med**, v. 7, p. 43-51, 2014.

SINGH, S. K. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Res**, v. 63, n. 18, p. 5821-8, Sep 15 2003.

SUN, Y. G.; CHEN, Z. F. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 700-3, Aug 9 2007.

TAM, W. L.; NG, H. H. Sox2: masterminding the root of cancer. **Cancer Cell**, v. 26, n. 1, p. 3-5, Jul 14 2014.

YE, R. D. Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 6, p. 839-48, Dec 2001.

6. ANEXO

Cr terios da revista para submiss o do artigo

Journal of Molecular Neuroscience

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors, and reviewers of the Journal of Molecular Neuroscience the use of our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible, we request authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option of tracking the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://jomn.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for the Journal of Molecular Neuroscience offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts, Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX; for figures, TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. PDF is not an acceptable file format.

Note: In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Please take note that the Journal of Molecular Neuroscience requires the Corresponding Author to furnish a signed electronic document (ms word or pdf) attesting that all Authors have agreed to submit their manuscript to the peer review process of JOMN.

The Journal of Molecular Neuroscience is committed to the rapid publication of original findings that increase our understanding of the molecular structure, function,

and development of the nervous system. The criteria for acceptance of manuscripts will be scientific excellence, originality, and relevance to the field of molecular neuroscience. Manuscripts with clinical relevance are especially encouraged because the journal seeks to provide a means for accelerating the progression of basic research findings toward clinical utilization. All experiments described in the Journal of Molecular Neuroscience that involve the use of animal or human subjects must have been approved by the appropriate institutional review committee and conform to accepted ethical standards.

Types of papers published: The Journal of Molecular Neuroscience will consider four types of papers:

1. Full papers should report substantial findings and should follow the sequence Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion.
2. Brief communications should present new ideas or data and will receive accelerated review and handling. These manuscripts should not take up more than four printed pages. To conserve space, authors have the option of incorporating the Materials and Methods into the body of the text or of combining Results and Discussion.
3. Short reviews will occasionally be published. These reviews will run four to six printed pages and will constitute summaries of the current status of important areas of molecular neuroscience. Although unsolicited reviews will be considered, prospective authors are encouraged to contact the editor before preparing any review. Reviews will be subject to peer review.
4. For the Record will publish a brief documentation of confirmatory cDNA clones, monoclonal antibodies, or family linkage studies. Because the purpose of these brief articles is to document for the scientific community the existence of

particular cDNA clones, monoclonal antibodies, or patterns of inheritance of disease loci, they should not be divided into separate sections. Authors are allowed one figure and no more than five references. DNA sequences should not be given, but should be submitted to the appropriate database and the accession number listed in the article. Authors requiring help with this format are encouraged to contact the editorial office.

Copyright

All manuscripts submitted must be accompanied by a signed copyright transfer agreement, in favor of Humana Press.

Manuscripts

Type manuscript in English, giving full first and last names and full affiliations for all authors. Provide address and phone and fax numbers, and E-mail address for the corresponding author. Type manuscript double-spaced on one side of consecutively numbered pages with 1- to 1-1/2-inch margins. Include all figures and tables.

Computer Disks: Once your manuscript has been accepted, be sure to include an electronic version in Microsoft Word document. PC-prepared disks are also acceptable. Manuscripts and electronic versions must match. Revised electronic versions cannot be submitted without a corresponding reprinted manuscript.

Abstracts

Abstracts should be a single paragraph of 100–200 words. Abbreviations and reference citations should be avoided.

Index Entries

Include 3–6 index entries/key words.

Artwork

Illustrations: All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us. For Computer Graphic submission specs, see below.

Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be capital letters. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation.

Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.

Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

Photographs: Photographs should be glossy prints of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.

Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator versions 5 and up; Adobe Photoshop versions 5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi. Please submit electronic artwork on CD-R, CD-RW, or DVD. A printed copy of all electronic artwork must accompany the disk. Only figures will be returned in the case of rejected manuscripts.

Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provide titles for all tables. Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail.

References

References should be cited in the text by author and year (Brown, 1993); multiple citations in chronological order, alphabetical order for references within the same year (Smith, 1991; Brown, 1992; Jones, 1992). List at the end in alphabetical order. Manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, may be cited in the text, but should not be included in the list of references. Please list all authors when there are six or fewer; when seven or more, list only the first three and add “et al.”

Follow style indicated below:

Journal reference:

1. Nakane P. K. and Kawaoi A. (1974) Title of article. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1084–1088.

Chapter in book:

2. Rilke R. M. and Thomas D. (1984) Title of chapter, in *Applied Biopoeisis*, vol. 3, Lowell R., ed., Humana, Totowa, NJ, pp. 99–108.

Book reference:

3. Bergmeyer H. (1974) *Methods in Enzymatic Analysis*, 2nd ed., Academic, New York.

Report/document:

4. Sansarci H. (1980) PhD thesis, First Technical University, Istanbul, Turkey.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer

publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz English editing for scientists