

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

PÂMELA ROSSI MENEGOTTO

**SILENCIAMENTO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA
(GRPR) INDUZ SENESCÊNCIA EM GLIOBLASTOMA MULTIFORME A172**

Porto Alegre

NOVEMBRO/2014

PÂMELA ROSSI MENEGOTTO

SILENCIAMENTO DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA
(GRPR) INDUZ SENESCÊNCIA EM GLIOBLASTOMA MULTIFORME A172

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(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Coorientadora: Dra. Patrícia Luciana Da
Costa Lopez

Porto Alegre

NOVEMBRO/2014

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Roesler, pela orientação e incentivo durante a execução desse trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Patrícia Luciana da Costa Lopez, por ter me permitido participar desse projeto e por ter me ajudado a ver a ciência com um olhar crítico e ao mesmo tempo instigante. Sou muito grata pelo voto de confiança para assumir esse projeto e por todos os ensinamentos. A sua parceria, dedicação e incentivo foram essenciais para o desenvolvimento e desse trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Câncer, em especial Bárbara de Souza Kunzler pela sua disponibilidade, mesmo que agora à distância. Certamente aprendi muito nesse pouco mais de um ano de experiência nesse laboratório.

Ao Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio técnico e pela possibilidade de utilizar os diversos ambientes e equipamentos à minha disposição.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por todas as oportunidades recebidas durante a graduação.

Aos colegas e amigos da turma 7 da Biomedicina, principalmente às minhas amigas e companheiras desde as primeiras semanas de UFRGS: Carla Basso, Édina Poletto, Giovana Bristot e Nicole Sartori Ribeiro. A presença de vocês foi essencial durante esses anos de UFRGS.

Agradecimento muito especial à minha família, pela compreensão da minha ausência, das horas de estudo mesmo quando os visitava, pela ajuda nos momentos difíceis, mas principalmente por me apoiarem e permitirem que eu seguisse os meus objetivos.

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
1. Introdução	
1.1 Características de gliomas.....	6
1.2 Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (Gastrin releasing peptide receptor – GRPR) e seu papel no câncer.....	9
1.3 Senescência	13
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos	17
Trabalho na forma de artigo científico.....	18
4. Conclusões.....	43
5. Perspectivas.....	44
6. Bibliografia adicional.....	45

RESUMO

Glioblastoma multiforme grau IV é a manifestação mais agressiva dos gliomas, sendo caracterizado pela proliferação excessiva, resistência a apoptose e invasibilidade. Em função da resistência aos tratamentos disponíveis, o prognóstico desses pacientes é bastante ruim. O peptídeo liberador de gastrina (*gastrin-releasing peptide*, GRP) e seu receptor (GRPR) contribuem para a malignidade de diversos tumores, incluindo gliomas, por ativar vias de proliferação, possivelmente atuando junto a outros receptores responsivos a sinais de proliferação como EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Com isso, nós buscamos estudar o efeito do silenciamento de GRPR em linhagem celular de glioblastoma A172, em especial o efeito na proliferação celular. O *knockdown* estável de GRPR foi realizado através de vetor lentiviral contendo uma sequência de interferência *short hairpin* RNAi. O silenciamento gerou alterações morfológicas, como aumento do tamanho celular, alterações no ciclo celular, além de diminuir a taxa de proliferação das células silenciadas. No entanto, o efeito mais proeminente do silenciamento de GRPR parece ser o potencial de indução de senescência nas células A172, como evidenciado na análise de morfologia nuclear (NMA) e no ensaio de SA- β -galactosidase.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme, grade IV glioma, is the most aggressive type of glioma, characterized by excessive cell proliferation, resistance to apoptosis and invasibility. Due to resistance to currently available treatment options, the prognosis for these patients is very dismal. Gastrin releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) contribute to the malignancy of many tumor types, including gliomas, because of their ability to activate proliferation pathways, possibly interacting with other receptors responsive to proliferation signals such as EGFR (epidermal growth factor receptor). With that, we intended to study the effect of GRPR silencing on glioblastoma cell line A172, specially its effect on cell proliferation. Stable GRPR knockdown was achieved by a lentiviral vector using a short hairpin interfering RNA sequence. Silencing caused morphological alterations, such as increase in cell size, cell cycle alterations, in addition to decreasing the silenced cells proliferation rate. However, the most prominent effect of GRPR silencing seems to be the potential do induce senescence on A172 cells, as confirmed by Nuclear Morphometric Analysis (NMA) and the SA- β -galactosidase assay.

1. Introdução

1.1 Características dos Gliomas

Gliomas são um dos mais frequentes tipos de tumores primários de cérebro e do sistema nervoso central, correspondendo a 28% dos casos divulgados para os Estados Unidos entre 2006 e 2010. Quando se consideram apenas tumores malignos de cérebro e sistema nervoso central, gliomas correspondem a 80% dos casos (Ostrom et al. 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), gliomas podem ser divididos em quatro graus em função de características imunohistoquímicas e do grau de diferenciação das células. Em relação ao tipo histológico presente, gliomas são separados em astrocitomas, oligodendrogliomas ou oligoastrocitomas. No caso de gliomas, essa classificação é essencial para determinar o prognóstico dos pacientes, visto que gliomas raramente fazem metástase fora do sistema nervoso central. Glioma grau I são benignos e usualmente a ressecção cirúrgica é o suficiente. No entanto, gliomas de grau II a grau IV são malignos, sendo grau IV o mais agressivo. Pacientes com glioma grau II podem evoluir para grau III ou IV dentro de 5-10 anos (Kleihues and Sobin 2000; Maher et al. 2001; Ware et al. 2003).

O glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como astrocitoma grau IV pela OMS e é a manifestação mais agressiva deste tipo de tumor, com sobrevida média de 9 a 12 meses, mesmo com as estratégias terapêuticas disponíveis. As principais características fenotípicas desses tumores são a proliferação celular excessiva, resistência a apoptose, invasibilidade e capacidade de neovascularização. Atualmente o tratamento preconizado é a ressecção cirúrgica quando indicada, mas principalmente a combinação de radioterapia com o quimioterápico temozolamida.

Contudo, há grande resistência ao tratamento e chance de recidiva de aproximadamente 90% (Maher et al. 2001; Stupp et al. 2005; de Oliveira et al. 2009; Easaw et al. 2011).

Algumas das características que tornam o glioblastoma multiforme tão agressivo são modificações genéticas em proteínas essenciais a vias de proliferação e controle de ciclo celular. Em cerca de 50% dos GBMs há a amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) e alguns estudos indicam que a amplificação desse receptor em gliomas de menor grau pode favorecer o processo de transformação maligna. Esse receptor pertence à família dos receptores tirosina cinase (receptor tyrosine kinase - RTK) e é capaz de ativar proliferação celular por diferentes cascatas de sinalização, como através da via da MAP cinase (*mitogen activated protein kinase* – proteína cinase ativada por mitógenos) e da PI3K (*phosphoinositide-3-kinase* – fosfatidilinositol-3-cinase). Além disso, o uso de inibidores de EGFR como erlotinib e gefitinib apresentam um efeito anti-proliferativos em diversas linhagens celulares de glioblastoma (Maher et al. 2001; Wen and Kesari 2008; Carrasco-Garcia et al. 2011).

Em um estudo publicado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) em 2008, EGFR foi o gene que mais apresentou amplificação focal dentre as amostras analisadas. De 91 amostras de glioblastoma avaliadas, 22 apresentaram amplificação focal de EGFR enquanto 16 amostras apresentaram tanto amplificação quanto alguma mutação nesse receptor. A mais comum delas é a mutação EGFRvIII, também conhecida como Δ EGFR, que apresenta deleção na porção extracelular do receptor. O Δ EGFR encontra-se constitutivamente fosforilado, embora o nível dessa ativação seja inferior quando comparado a ativação induzida por ligante (Maher et al. 2001; Cancer Genome Atlas Research Network 2008). Na

linhagem A172, está superexpressa uma outra forma mutada de EGFR (EGFR.TDM/18-26). Essa forma apresenta duplicações em tandem dos domínios tirosina cinase e de internalização mediada por cálcio, codificando uma proteína com 190-kDa em comparação a proteína *wild type* (170-kDa). Além disso, o EGFR.TDM/18-26 é ativado de forma menos intensa quando estimulado com EGF por apresentar menos sítios de ligação de alta afinidade por célula (Ciesielski and Fenstermaker 2000; Carrasco-Garcia et al. 2011).

Ainda de acordo com o estudo do TCGA, outra alteração genética bastante presente nas amostras de glioblastoma foi a inativação de genes supressores de tumor, cuja atividade é essencial para evitar a progressão tumoral. Em cerca de 87% das amostras avaliadas foram encontradas alterações na via de sinalização da p53, impedindo sua ativação. Já no caso da via do RB, um importante regulador do ciclo celular, foram encontradas alterações em 78% dos casos. Essas alterações incluem mutações no próprio p53 ou RB, mutação em proteínas *upstream*, ou amplificação de proteínas que modulam essas vias (Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Bleeker et al. 2014).

Outra proteína extremamente importante para a regulação da progressão tumoral é a PTEN, que encontra-se mutada em 36% das amostras de glioblastoma analisadas. O gene *PTEN* é considerado um importante gene supressor tumoral, assim como a p53. A atividade de 3' fosfoinositol fosfatase dessa proteína permite que ela degrade o produto da PI3K, evitando a ativação da via da AKT/PKB (*protein kinase B* – proteína cinase B) e consequentemente, a ativação de vias de proliferação e sobrevivência celular (Maher et al. 2001; Cancer Genome Atlas Research Network 2008). Além da sua importância na regulação da proliferação

celular, a PTEN também atua junto ao núcleo para a manutenção da integridade cromossômica (Shen et al. 2007; Choi et al. 2013).

1.2 Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (Gastrin releasing peptide receptor – GRPR) e seu papel no câncer

O peptídeo liberador de gastrina (*gastrin releasing peptide* – GRP), através da ativação do seu receptor, o GRPR, regula diversas respostas biológicas como a contração de músculo liso, secreção de ácido gástrico, esvaziamento intestinal e vesical, além da liberação da secreção de diversos hormônios como gastrina, somatostatina e glucagon (Jensen et al. 2008). Há evidências que o GRP liberado pelos terminais pré-sinápticos ao se ligar ao GRPR no terminal pós-sináptico, pode atuar como modulador da plasticidade sináptica e memória (Roesler et al. 2006; Roesler et al. 2010).

O GRPR é um receptor que pertence a família dos receptores do tipo bombesina, que além do GRPR, ou BB₂, inclui o receptor de neuromedina B (BB₁) e um terceiro subtipo BB₃. Todos são receptores acoplados a proteína G com sete domínios transmembrana. O GRPR, mais especificamente, está ligado a família de proteínas G_q, que ativa diretamente a fosfolipase C (PLC – phospholipase C) e leva a um aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ (Figura I). Por sua vez, essas alterações causam a ativação das via de proliferação celular MAPK-ERK (Jensen et al. 2008; Flores 2009; Roesler et al. 2010).

Vários estudos já demonstraram a superexpressão de GRP e GRPR em diferentes tipos tumorais, como câncer de próstata, mama, ovário, útero, pulmão, cabeça e pescoço, neuroblastoma, coloretal e pancreático (Patel et al. 2006;

Cornelio et al. 2007). Em dados do nosso grupo de pesquisa, foi evidenciada a superexpressão do GRPR em gliomas em comparação ao tecido cerebral normal em humanos (de Oliveira et al. 2009; Flores et al. 2010).

A relação entre GRP e seu receptor com o aumento da proliferação celular tem sido demonstrada por diversos trabalhos até o momento. De Oliveira e colaboradores observaram o efeito anti-proliferativo do antagonista seletivo de GRPR, o RC-3095, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Pinski et al. 1994; Flores et al. 2008; de Oliveira et al. 2009). Esse antagonista sintético age bloqueando os sítio de ligação do GRP e análogos. Outros autores também estudam o potencial anticâncer de outros antagonistas de GRPR. Szereday e colaboradores desenvolveram um análogo citotóxico da bombesina, AN-215, que é composto de um análogo de bombesina ligado a uma derivado do quimioterápico doxorubicina, e os resultados indicaram uma redução de até 69,6% do volume tumoral, além de menor taxa de proliferação das células de glioblastoma U-87MG inseridas em camundongos null (Szereday et al. 2002).

Além do efeito proliferativo, que contribui para a malignidade de diversos tumores, os tratamentos com GRP ou agonistas de GRPR tem apresentado efeito anti-apoptótico através da diminuição da atividade do fator de transcrição Smad. Outro processo no qual GRPR parece estar envolvido é na angiogênese peritumoral, já que o GRP induz o aumento de marcadores pró-angiogênicos (Camby et al. 1996; Flores 2009).

O efeito anti-proliferativo do bloqueio de GRPR pode ser neutralizado pela ativação de vias compensatórias e um dos mecanismos compensatórios propostos para o GRPR em gliomas seria através da interação com o EGFR (Figura II). A

ativação do EGFR pelo respectivo ligante causa a ativação de uma cascata que envolve fosfolipase C (PLC- γ), Ras, Raf e MAPK. Isso induz o aumento da síntese de DNA e divisão celular, levando a uma taxa de proliferação celular elevada (Maruno et al. 1991). Foi demonstrado também que a utilização de inibidores específicos de EGFR bloqueia a ativação de proliferação mediada por GRP, indicando que o GRP também ativa a MAPK através da via do EGFR (Liu et al. 2007; Mattei et al. 2014).

Uma das formas pela qual a transativação do EGFR e GRPR possivelmente acontece, de acordo com Mattei e colaboradores, seria pela ativação da proteína G ligada ao GRPR transformando-a ao estado de trifosfato de guanosina, que por sua vez, desencadeia a liberação de prolifantes de EGFR dependente de metaloproteases. A liberação desses prolifantes causa a fosforilação do EGFR e a consequente ativação de vias como a da RAS/RAF/MAPK, uma importante via de proliferação celular (Thomas et al. 2005; Mattei et al. 2014). No entanto, Zhang e colaboradores sugerem que os efeitos sob a proliferação desencadeada por GRPR também podem ser independentes de EGFR. No tratamento de câncer de cabeça e pescoço, somente a utilização do inibidor de EGFR (erlotinib) não é o suficiente para obter uma boa resposta quando usado em monoterapia. Já quando o erlotinib foi utilizado em combinação com um antagonista de GRPR (PD176252), houve uma redução importante na proliferação das células de câncer de cabeça e pescoço (Zhang et al. 2007). Em função dessa controvérsia encontrada em diferentes tipos celulares, é preciso entender de que forma esses dois receptores interagem especificamente em gliomas. No entanto, considerando a elevada expressão de GRPR em tumores juntamente com os outros dados aqui apresentados, esse receptor se mostra um bom alvo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas

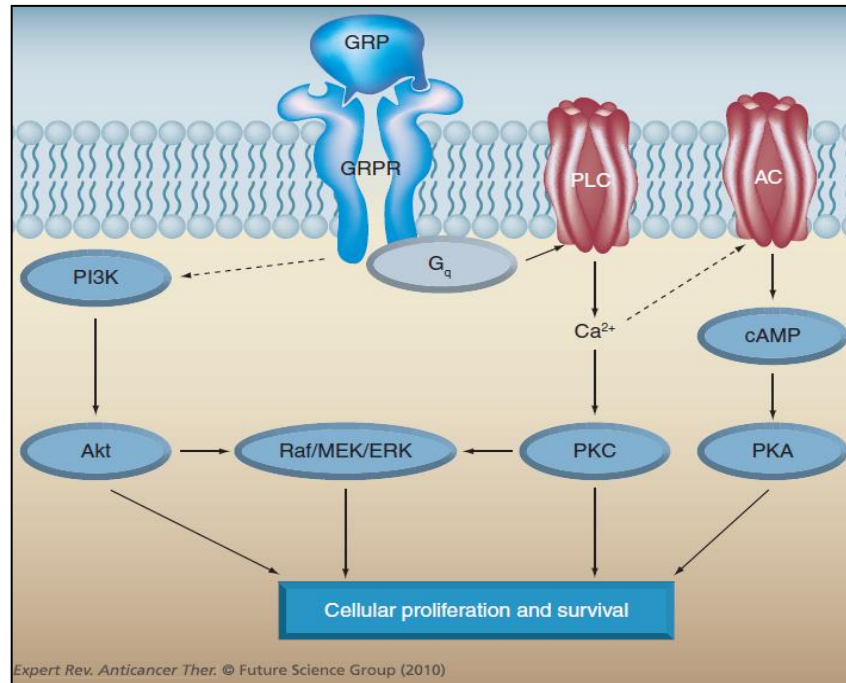


Figura I - Etapa inicial da ativação do GRPR. Após a ligação do GRP no seu receptor, a proteína G_q ativa PLC levando ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , que desencadeia a ativação de outras proteínas como a PKC (*protein kinase C* – proteína cinase C), PKA (*protein kinase A* – proteína cinase A), além da via da MAPK/ERK (também conhecida como via da Ras/Raf/MEK/ERK), para ativar a proliferação celular (Roesler et al. 2010).

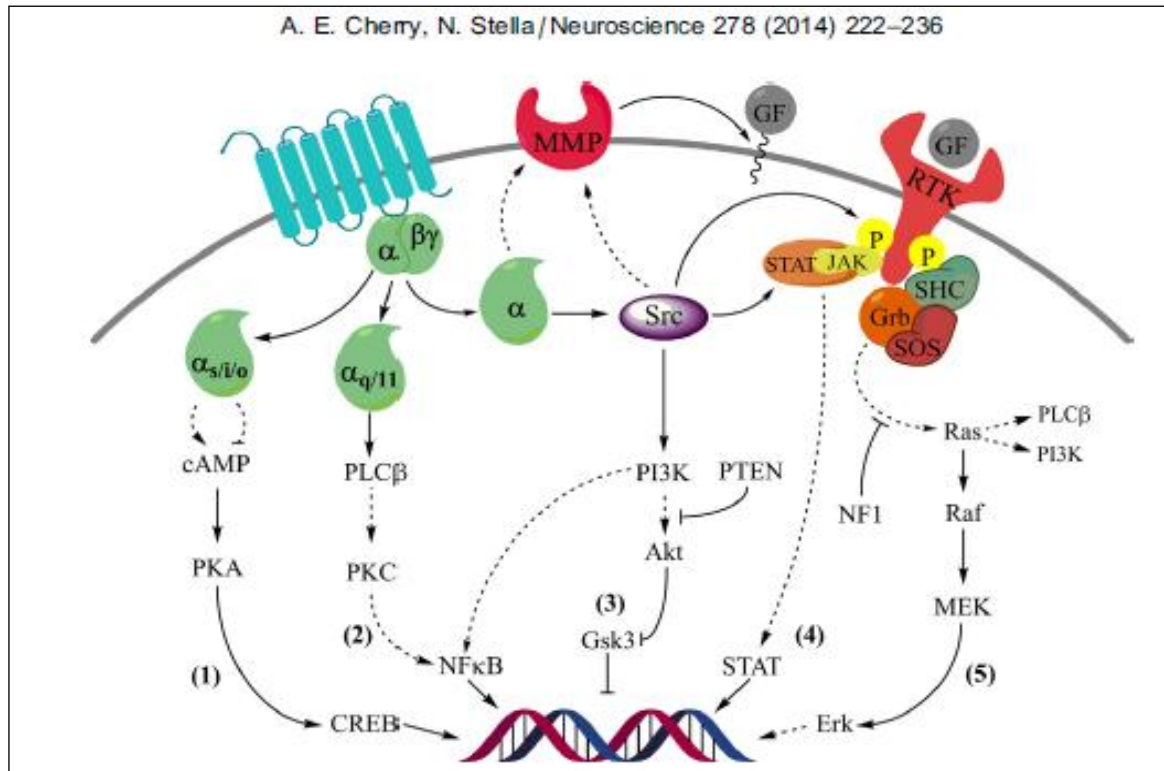


Figura II - Interação proposta entre o GRPR (em azul, com sete domínios transmembrana) e o EGFR, um receptor tirosina cinase (RTK). Nessa imagem podem ser vistas as diversas vias de sinalização ativadas por esses dois receptores resultando na ativação de fatores de transcrição e alteração de expressão gênica (Cherry and Stella 2014).

1.3 Senescência

Senescência é o estado que descreve células metabolicamente ativas que não possuem mais a habilidade de proliferar. Esse processo pode ser desencadeado pelo encurtamento dos telômeros, na chamada senescência replicativa, ou em função de estresse celular, como indução de dano ao DNA, estresse oxidativo ou pela ativação de algum oncogene. Ao trabalharmos com linhagens tumorais, que são linhagens imortais que expressam telomerase, a

presença de células senescentes se deve a algum fator de estresse celular (Serrano and Blasco 2001). Os principais sinais de células senescentes são as alterações morfológicas, incluindo aumento de tamanho celular e aparência achatada, além de marcadores moleculares como o aumento da atividade da enzima β -Galactosidase, avaliado pelo ensaio de SA- β -gal, alteração no perfil transcricional da célula e parada no ciclo celular em G1 (Dimri et al. 1995; Ohtani et al. 2012).

Ao mesmo tempo em que senescência pode ser vista como benéfica, evitando a proliferação de células que já passaram por diversas divisões que podem levar ao acúmulo de mutações, o processo de senescência também aumenta a expressão de genes que codificam citocinas, quimiocinas e fatores de remodelamento da matriz extracelular, que contribuem para a tumorigênese (Ohtani et al. 2012). A alta expressão desses SAGs (senescence-associated genes) já foi relacionada com o pior prognóstico de pacientes com glioma, sendo a taxa de sobrevida média de 14 meses para pacientes com um alto escore de senescência (considerando o nível de expressão dos SAGs) comparada com 28 meses para pacientes com um baixo escore de senescência. Nesse estudo, os genes avaliados foram genes envolvidos no controle do ciclo celular (CDKN1A), citocinas (CCL2, CCL7, CXCL1, IL-6 e IL-8), fatores de crescimento (IGFBP-3), fator de necrose tumoral (TNFSF-11 e TNFRSF-11B), entre outros (Coppola et al. 2014). Corroborando com a ideia que senescência pode apresentar um papel pró-neoplásico, em um artigo publicado por Stoczynska e colaboradores, células de glioma senescentes também são positivas para o marcador de células tronco tumorais SOX2, indicando que essas células tem potencial de auto-renovação além de serem responsáveis pela recidiva tumoral (Stoczynska-Fidelus et al. 2014).

A senescência induzida por oncogene (*oncogene-induced senescence* – OIS) é um dos mecanismos pelo qual pode ser desencadeado o processo de senescência (Figura III) . A noção de OIS começou com estudos de formas oncogênicas de ras que após uma fase inicial de hiperproliferação, acabavam induzindo parada no ciclo celular, característica de senescência. Atualmente, outros genes também têm sido considerados capazes de induzir OISs, como por exemplo, BRAF^{V600E}, AKT, ciclina E, Cdc6. Para a manutenção desse fenótipo, no entanto, é necessária também a inativação de genes supressores de tumor como PTEN e NF1 (Courtois-Cox et al. 2008).

Como mencionado anteriormente, Interleucina-6 (IL-6) é uma das proteínas superexpressas em células senescentes. Essas células expressam também proteínas como um receptor de IL-6 solúvel (sIL-6R), cuja expressão é mediada por mTOR. Garbers e colaboradores viram que a ativação de EGFR também era capaz de induzir a síntese de IL-6 e de sIL-6R via ativação de mTOR (Garbers et al. 2013). Xu e colaboradores também estudaram a via da PI3K/AKT/mTOR e a sua relação com senescência induzida por oncogene (OIS) (Xu et al. 2014). É importante ressaltar que a via da PI3K, AKT e mTOR podem ser ativadas pelo GRPR através do crosstalk com o EGFR.

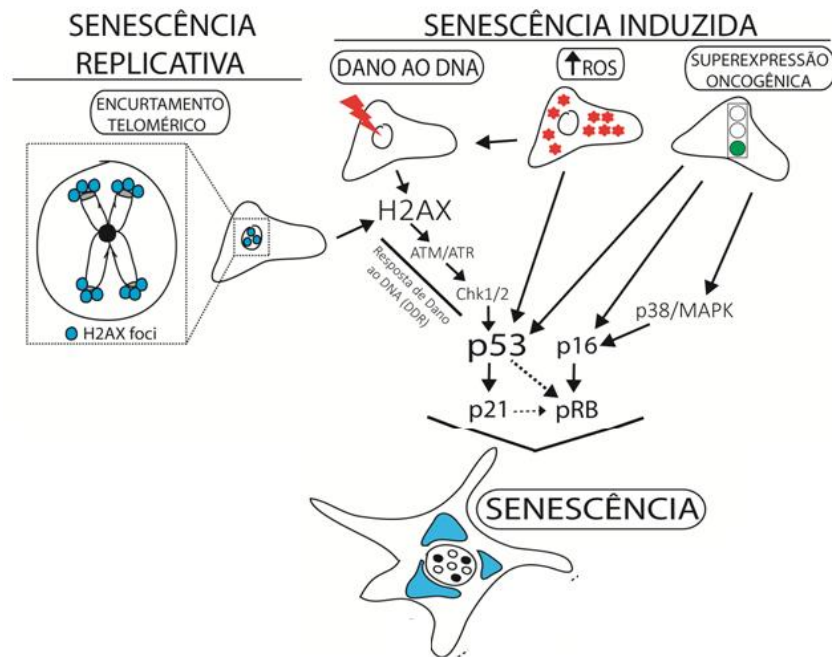


Figura III. Senescência desencadeada por estímulos diversos. Senescência pode ser replicativa, em função do encurtamento dos telômeros, ou induzida por dano ao DNA, estresse oxidativo ou superexpressão de oncogenes. Na senescência induzida, os diferentes mecanismos levam a ativação da via da p53 e pRb, desencadeando o processo de senescência. Figura cedida pelo Dr. Eduardo Fillipi-Chiela.

2. Justificativa

Tendo em vista que o GRPR está envolvido na proliferação celular e está superexpresso em diversos tipos tumorais, o presente trabalho visou estudar os efeitos do silenciamento desse receptor em linhagem humana de glioblastoma multiforme. Esse estudo é importante para avaliar o GRPR como alvo terapêutico para o tratamento de gliomas, explorando os efeitos que essa nova estratégia terapêutica traria.

3. Objetivo

Caracterizar os efeitos do silenciamento do GRPR em linhagem de glioblastoma multiforme humana A172.

Objetivos específicos:

- Avaliação dos efeitos na proliferação celular através do cálculo de population doubling level cumulativo (CPD);
- Análise de alterações no ciclo celular e viabilidade celular através de citometria de fluxo;
- Verificação de alterações na morfologia nuclear com o teste de NMA (análise de morfometria nuclear) como método de triagem de efeito celular;

Trabalho Experimental na Forma de Artigo Científico

Silenciamento do Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPR) induz senescência em Glioblastoma Multiforme A172

Pâmela Rossi Menegotto, Bárbara Kunzler Souza, Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, Guido Lenz, Caroline Brunetto de Farias, Algemir Lunardi Brunetto, Gilberto Schwartzmann, Patrícia Luciana da Costa Lopez, Rafael Roesler

Trabalho em preparação a ser submetido para o periódico:

Journal of Molecular Neuroscience

**Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) knockdown induces senescence
in Glioblastoma Multiforme A172**

Pâmela Rossi Menegotto, Bárbara Kunzler Souza, Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, Guido Lenz, Caroline Brunetto de Farias, Algemir Lunardi Brunetto, Gilberto Schwartzmann, Patrícia Luciana da Costa Lopez, Rafael Roesler

P. R. Menegotto, B.K. Souza, C. B. de Farias, G. Schwartzmann, A. L. Brunetto, P. L. C. Lopez, R. Roesler - **Cancer Research Laboratory**, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

C. B. de Farias, G. Schwartzmann, A. L. Brunetto - **Children's Cancer Institute (ICI-RS)**, Porto Alegre, RS, Brazil.

C. B. de Farias, G. Schwartzmann, A. L. Brunetto, P. L. C. Lopez, R. Roesler - **National Institute for Translational Medicine**, Porto Alegre, RS, Brazil.

R. Roesler – **Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, Brazil.

E. C. Filippi-Chiela, G. Lenz - **Laboratory of Cellular Plasticity and Signaling, Department of Biophysics**, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

E. C. Filippi-Chiela. **Gastrointestinal Sciences Graduate Program**, School of Medicine. HCPA- Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Pâmela Rossi Menegotto

Telephone: (51) 3359.7616 / (54) 9111.2325

Address: Cancer Research Laboratory

Rua Ramiro Barcelos, 2350, CPE, 2º andar - Porto Alegre, RS - 90035-903

E-mail: pamelamenegotto@gmail.com

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme, grade IV glioma, is the most aggressive type of glioma, characterized by excessive cell proliferation, resistance to apoptosis and invasibility. Due to resistance to currently available treatment options, the prognosis for these patients is very dismal. Gastrin releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) contribute to the malignancy of many tumor types, including gliomas, because of their ability to activate proliferation pathways, possibly interacting with other receptors responsive to proliferation signals such as EGFR (epidermal growth factor receptor). With that, we intended to study the effect of GRPR silencing on glioblastoma cell line A172, specially its effect on cell proliferation. Stable GRPR knockdown was achieved by a lentiviral vector using a short hairpin interfering RNA sequence. Silencing caused morphological alterations, such as increase in cell size, cell cycle alterations, in addition to decreasing the silenced cells proliferation rate. However, the most prominent effect of GRPR silencing seems to be the potential do induce senescence on A172 cells, as confirmed by Nuclear Morphometric Analysis (NMA) and the SA- β -galactosidase assay.

KEYWORDS: Glioblastoma; GRPR; Knockdown; EGFR; Senescence

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM), a grade IV glioma according to the World Health Organization, is the most aggressive type of primary brain tumor, characterized by excessive cell proliferation, resistance to apoptosis and invasibility. GBM accounts for nearly 70% of all malignant gliomas. The current standard treatment is based on surgical resection and radiotherapy associated with chemotherapy using the alkylating agent temozolomide. However, due to the resistance to the treatment options, the patients have a median overall survival of 12-15 months (Maher et al. 2001; Stupp et al. 2005; Wen and Kesari 2008; de Oliveira et al. 2009).

It has been observed that glioblastoma samples have deregulated growth factor signaling, especially the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway. There seems to be amplification of EGFR in 40 to 50% of patients with primary glioblastoma, as well as a constitutively activated version of this receptor in other patients. The activation of the EGFR pathway leads to cell proliferation through MAPK (mitogen activated protein kinase) and PI3K (phosphoinositide-3-kinase) signaling pathways (Furnari et al. 2007; Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Wen and Kesari 2008).

Another receptor seems to be linked to EGFR in order to induce cell proliferation: gastrin-releasing peptide receptor (GRPR). GRPR is a G-protein coupled receptor that is overexpressed in many tumor types including prostate, breast, lung, and head and neck cancer, as well as glioma (Patel et al. 2006; Cornelio et al. 2007; Flores et al. 2010). Research indicating that GRP and GRPR are important for tumor growth has led to the development of GRPR antagonists,

such as RC-3095, that seem to have an anti-proliferative effect in glioblastoma models (de Oliveira et al. 2009). Studies show that stimulation by GRP leads to activation of EGFR and also MAPK dependent on EGFR activation in lung cancer. The GRP-mediated activation of EGFR occurs through activation of matrix metalloproteases (MMPs), however, the exact molecules involved in the GRPR-EGFR crosstalk have not been elucidated (Thomas et al. 2005; Mattei et al. 2014).

Considering these findings, we sought to study the effect of the GRPR silencing on glioblastoma cell line A172. We performed the stable knockdown of this receptor through short hairpin RNAi in cells that overexpress EGFR (GBM cell line A172) (Ciesielski and Fenstermaker 2000; Carrasco-Garcia et al. 2011). Expression of GRPR reduced compared to wild type cells. We initially investigated the effect of GRPR knockdown on proliferation and cell cycle. A172 GRPRi (silenced) cells display proliferation at a different rate compared to control (A172 wild type – WT) as seen in the population doubling assay, without any effect on cell viability and cell cycle distribution. Silencing also alters cell's morphology, causing an increase in nuclear size, explained by the increase in senescent cells, indicating a possible role of GRPR in inducing senescence.

Materials and Methods

Cell Culture

Human GBM cell line A172 (ATCC® CRL1620™) was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, USA). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Low glucose (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin and streptomycin (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA),

with pH adjusted to 7.4. Cells were maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37° C.

shRNAi Transduction

shRNAi sequences were obtained from a Mission RNAi library in a pLKO.1 plasmid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA); the sequence used to silence human GRPR were CCGGCCACTGTCGATCATCTCTGTTCTCGAGAACAGAGATGATCGA CAGTGGTTTTT (NM_005314.1-1062s1c1) . Lentivirus production was performed by co-transfecting Hek 293t cells with SuperFect transfection reagent (Qiagen) complexed with three virus packaging plasmids: (1) RRE; (2) Rev, and (3) VSVG, and the shRNAi expression plasmid containing a puromycin resistance gene. As a control of transduction, we used a PLKO plasmid with a sequence targeting GFP (shGFP). The supernatants were first collected after 48 h and added to glioma A172 culture plus Polybrene 8 µg/ml. Puromycin selection was performed for 10 days after 72 h of transduction.

Western Blotting

A172 cells were lysed with a lysis solution containing SDS, Tris and EDTA, and quantified using Bradford protein assay (Pierce, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Same amount of proteins were used in SDS-PAGE. After protein transfer, the membrane was blocked with a blocking solution containing 10% nonfat dry milk, 0.2% Tween 20 in 1X TBS. The membrane was incubated overnight with the primary antibody against GRPR (1:500 Abcam ab133339) followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2,000; Cell Signaling, Beverly, USA) for 2 h at 4 °C, and chemoluminescence was detected using ECL Western Blotting substrate (Pierce, Thermo Scientific, USA) and analyzed

using ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Membrane was stained with Coomassie blue for protein load control. Immunodetection and load control were analyzed using ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

Cell Viability Assay

Cells were plated in 24-well plates. Twenty-four hours later, cells were treated with GRP at 1 nM, 30 nM or 100 nM, as previously used by our research group (Schmidt et al. 2010). After twenty-four hours of treatment, cells were trypsinized and centrifuged and washed with PBS twice. Then, cells were resuspended in a solution of 1 µl of propidium iodide per ml of PBS. Cells were incubated on ice for 15 minutes prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem – Life) and the Attune® software was used for analysis.

Cell Proliferation Assay

Cells were plated in 24-well plates in quadruplicates. After 3 or 4 days, cells were trypsinized, counted using a hemocytometer, and replated. The population doubling level (PDL) was calculated to determine the proliferation potential of the A172 wild-type cells versus the GRPRi cells. The PDL at each passage was calculated using the equation $PDL = (\log X_e - \log X_b) / \log 2$, where X_e is the cell number at the end of the incubation time and X_b is the cell number at the beginning of the incubation time, as described in the ATCC® Animal Cell Culture Guide. Data is displayed as cumulative PDL, calculated as the sum of all previous PDLs.

Cell Cycle Analysis

Cells were plated in 24-well plates. Twenty-four hours later, cells were treated with GRP at 1 nM, 30 nM or 100 nM. After twenty-four hours of treatment, cells were

trypsinized and centrifuged and washed with PBS twice. Then, cells were resuspended in 50 µg/mL propidium iodide (Sigma) and 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate solution. The volume added should be enough to keep the ratio of 1×10^6 cells per ml of this solution. Cells were incubated on ice for 15 minutes prior to analysis using the flow cytometer Attune® Acousting Focusing Cytometer (Applied Biosystem – Life) and data was analyzed using software FlowJo V10.

Nuclear Morphometric Analysis (NMA)

Cells were plated in 6-well plates. Twenty-four hours later, cells were fixed with 4% paraphomaldehyde in PBS. Cells were then washed with PBS and nuclei staining solution (4', 6-diamino-2-phenylindole, DAPI at 1 µl/ml of PBS) was added for 30 minutes. Photographs were obtained using inverted fluorescence microscope and the images were analyzed using the software Image Pro Plus 6.0 (IPP6-Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Area, roundness, aspect, radius ratio, and area box, which were quantified and grouped as Nuclear Irregularity Index (NII). Nuclei were classified as irregular (I), large and regular (LR), large irregular (LI), small and regular (SR), small (S), or small and irregular (SI). Nuclei were considered LR if above 2 SD of size and below 3 SD of NII and irregular when above 3 SD of the large population or above 5 SD of the normal-sized population (Filippi-Chiela et al. 2012).

Senescence-associated (SA) -β-galactosidase

A172 cells were plated in quadruplicates in 24-well plates. For the SA-β-galactosidase staining, we used the Senescence Cells Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. Cells were exposed to the solution containing the β-galactosidase substrate, X-Gal, for 2 h. Images were

obtained in a bright-field microscope and later analyzed using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

Statistics

All experiments included in the analysis were repeated at least three times. All data are expressed as mean±standard deviation of mean (SEM) and were analyzed using t-test or one way analysis of variance (ANOVA), when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered significantly different.

Results

GRPR knockdown confirmed by Western blotting

Stable GRPR knockdown was achieved by a lentiviral vector using a short hairpin interfering RNA sequence on glioma cell line A172. Silencing was confirmed by western blotting as seen on Figure 1. GRPR expression reduced approximately 60% on the GRPRi cells.

Stable knockdown of GRPR reduces glioblastoma proliferation rate

Over the course of 21 days, cells silenced for GRPR (GRPRi cells) displayed a reduced proliferation rate in comparison with control wild-type cells (WT) as seen in the Population Doubling Assay (Figure 2). Since day 3, GRPRi cells displayed a smaller population doubling level (PDL), becoming more stagnant over the following time points. After 17 days, A172 wild type cells also began proliferating at a smaller rate; however wild type PDL was still higher than GRPRi cells.

The proliferation effect seen in PDL was also evaluated for the cell cycle distribution. The software FlowJo was not able to fit the GRPRi distribution to the model equation in order to calculate the percentage of cells in each cell cycle phase, as it was able to do for all A172 WT experimental groups. The GRPRi cells displayed a peak fluorescence nearly at twice the peak of the WT cells (figure 3A and 3B). FlowJo was only able to analyze two separate samples of the GRPRi cells (control and 1nM treatment), and the comparison between the data can be seen in figure 3C. The results indicate GRP induces cell cycle progression in WT but not in GRPRi cells, since there were more S-phase cells as well as more poliploidy. Due to the inability of FlowJo to interpret cell cycle data for all samples, we proceeded to analyze it by hand using the same parameters for all samples, assuming the single peak as the cells in G1 phase, yielding the results shown in figure 3D, however no differences were found.

Cell viability is not affected by silencing of GRPR

Cells were treated with 1 nM, 30 nM or 100 nM doses of GRP for twenty-four hours prior to analysis through flow cytometry. In figure 4, it is possible to see representative images of cells prior to viability analysis for each of the conditions, and we observed the treatment did not affect cell aspect. Viability was analyzed by flow cytometry with propidium iodide, and the results are present in figure 5, however, there was no significant difference among the treatment groups.

Knockdown of GRPR induces senescence

Given the alterations seen in population doubling, viability and cell cycle results, such as peak location, we decided to analyze if there were any differences in nuclear size and morphology to justify a senescence effect. After analysis by

Nuclear Morphometric Analysis method (Filippi-Chiela et al. 2012), we observed crucial differences between A172 wild-type and GRPRi cells. On Figure 6A and 6B, we can see the distribution of these nuclei according to size and Nuclear Irregularity Index (NII), as well as the percentage of each nuclear population. There was a high percentage of large and regular (LR) nuclei, characteristic of senescent cells on the GRPRi cells. The differences between WT and GRPRi cells were also statistically significant when comparing normal (N), Large and Irregular (LI) and Irregular (I) nuclei parameters (Figure 6C).

We proceeded to confirm the senescent phenotype of the GRPRi cells through the Senescence-associated (SA)- β -galactosidase assay, in which senescent cells are stained blue (Figure 7A and 7B). The percentages of senescent cells according to the (SA)- β -galactosidase assay were similar to the values found on the Nuclear Morphometric Analysis for the GRPRi, confirming the senescent phenotype on the silenced cells (Figure 7C).

Discussion

The observation that Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is overexpressed in many tumor types including glioma, and that it seems to induce cell proliferation (Patel et al. 2006; Flores et al. 2010), led us to study of the effect of GRPR knockdown in the glioblastoma multiforme A172 cells. The silencing of this receptor appears to decrease these cells' proliferation rate without interfering on their proliferation capacity, corroborating with data from de Oliveira et al regarding the mitogenic effects of the GRPR (de Oliveira et al. 2009). Similar results were found by Lui et al showing that antibody-mediated neutralization of GRP resulted in growth

inhibition *in vitro* and *in vivo* in head and neck cancer, and by Qiao et al demonstrating that GRPR knockdown also reduces proliferation in neuroblastoma (Lui et al. 2003; Qiao et al. 2008). These findings indicate that GRPR is important for the replicative potential of A172 cells. However, it is not possible to affirm that the reduced proliferation is solely due to less GRPR activation, considering that other proliferation pathways, such as EGFR, could have been activated and therefore, could be masking the real effect of GRPR silencing.

Although GRPR silencing affects cell proliferation, it does not interfere with glioblastoma cell viability after treatment with 1nM, 30nM and 100nM of GRP for twenty-four hours. Similarly, in medulloblastoma, neither GRP nor the GRPR antagonist RC-3095 were able to affect cell viability following treatment (Schmidt et al. 2010). One possibility to explain the lack of effect of GRPR is that cell viability is independent of GRPR signaling or that the GRP doses used were not enough to show any effects. Studies suggest that GRP has a role as a morphogen, acting by regulating differentiation instead of acting as a growth factor (Carroll et al. 2000; Qiao et al. 2008; Schmidt et al. 2010).

The main finding of this study, however, is the role of GRPR in senescence induction. Silenced cells have a higher percentage of senescent cells when compared to wild type cells and it was confirmed by NMA and by SA- β -Gal assay. Senescence is a state that describes cells that no longer can proliferate, but remain metabolically active. Considering we work with immortalized cancer cells, therefore it is a replicative-independent senescence, senescence was caused by an stressful event such as the knockdown of GRPR, in what is called oncogene-induced senescence (OIS) (Courtois-Cox et al. 2008; Ohtani et al. 2012). The knockdown procedure for other sequences, using shRNAi and lentiviral vector, was performed in

other occasions by our research group, without having been reported senescence-induction (Lopez et al. 2012). One of the triggers of OIS is p53; this transcription factor leads to expression of p21 and the consequent activation of Rb and blockade of cell cycle progression (Campisi 2011; Ohtani et al. 2012).

In A172 cells, p53 is in its wild type form, which is essential for a proper senescence response (Gorjala and Gary 2010). Sato et al evaluated senescence response of three glioblastoma cell lines to the treatment with TMZ. The cell lines were chosen based on their p53 profile. A172 cells had wild type p53, while T98G and YKG-1 had a mutated version. On the SA- β -Gal assay, 70% of A172 cells were stained and only 20% of T98G and YKG-1 (Sato et al. 2009)

In addition to that, GRPR has oncogenic properties and its overexpression can increase cell proliferation and lead to malignant transformation. The reduced expression of this receptor in GRPRi cells may favor the activation of other oncogenes known to induce senescence such as p38-MAPK and PI3K. Also, EGFR activation can help maintain senescence by inducing the expression of senescence associated secretory phenotype (SASP) molecules as Interleukin-6 (Garbers et al. 2013; Xu et al. 2014).

The A172 GRPRi senescent cells had an enlarged and flat morphology, enlarged nuclei as well as the increased SA- β -Gal activity, however we did not observe representative cell cycle arrest yet. The large nuclear heterogeneity on the GRPRi cells, seen on the NMA, did not yield data that FlowJo could fit to the cell cycle model, except for two samples. Even in those samples, the distribution of the cells in each step was very similar to what was found for the wild type cells.

When only the G1 peak was taken into account, there seems to be a slightly

higher percentage of GRPRi cells in G1 when treated with 30nM and 100nM of GRP for 24 hours. Also, the Nuclear Morphometric Analysis showed an increased percentage of LI and I nuclei on the GRPRi cells could indicate mitotic catastrophe or another nuclear damaging event (Filippi-Chiela et al. 2012), but it has not been further investigated.

While some studies indicate the tumor suppressor role of senescence, by stopping proliferation of cells that have undergone too many divisions or that carry mutations, senescence also can be a way of promoting tumor growth through the secretion of SASP molecules that create an inflammatory environment. Also, high senescence scores have been linked to poor prognosis (Campisi 2011; Ohtani et al. 2012; Coppola et al. 2014). Senescence is mediated by an intricate signaling network, so the exact pathway that led GRPR knockdown to induce senescence remains to be studied, as well as its role for tumor progression or suppression.

In conclusion, our data suggests that GRPR is necessary for cell proliferation but not viability. Also, GRPR silencing induces senescence in glioblastoma cells. GRPR is a gene that, in situations such as downregulation in combination with other elements, can cause intracellular stress large enough to induce senescence. The high senescence rate in the GRPRi cells could explain the reduction on proliferation rate found on the population doubling assay. To maintain proliferation rates, compensatory mechanisms, such as EGFR expression, may be active, explaining how some cells continue to proliferate.

Figures

Figure 1

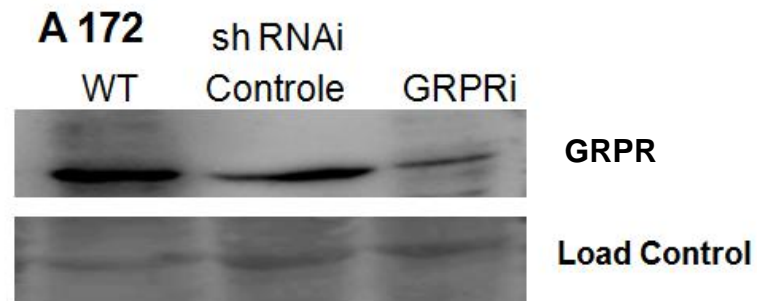


Figure 2

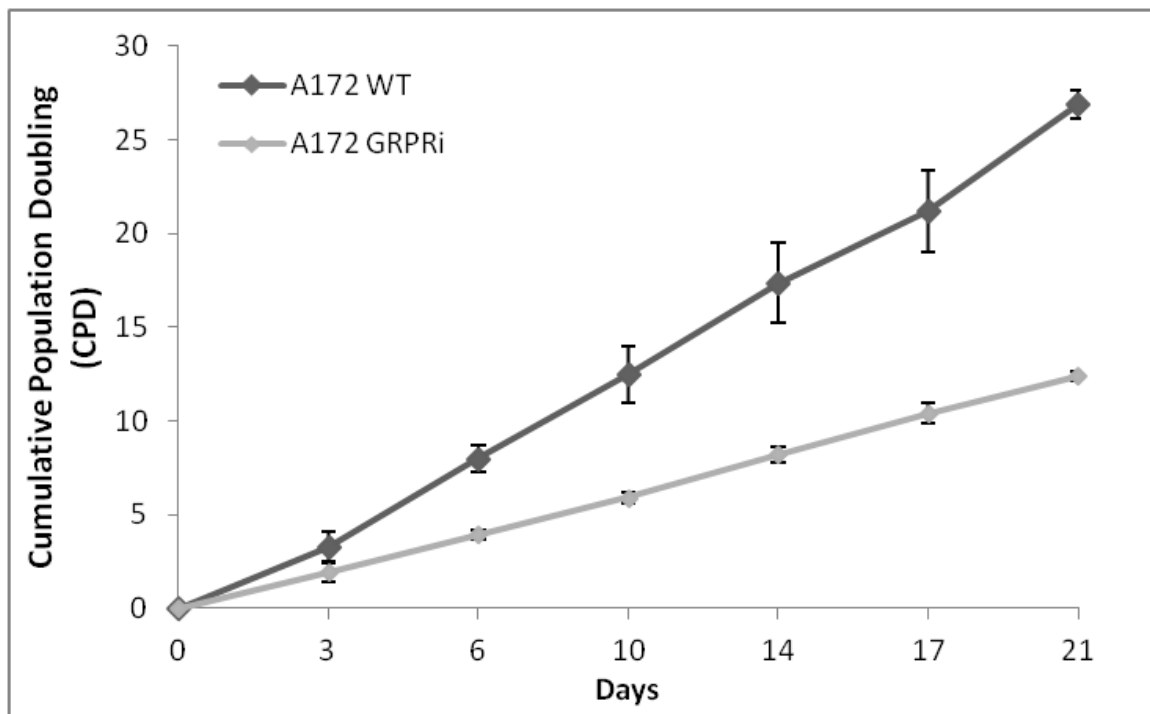
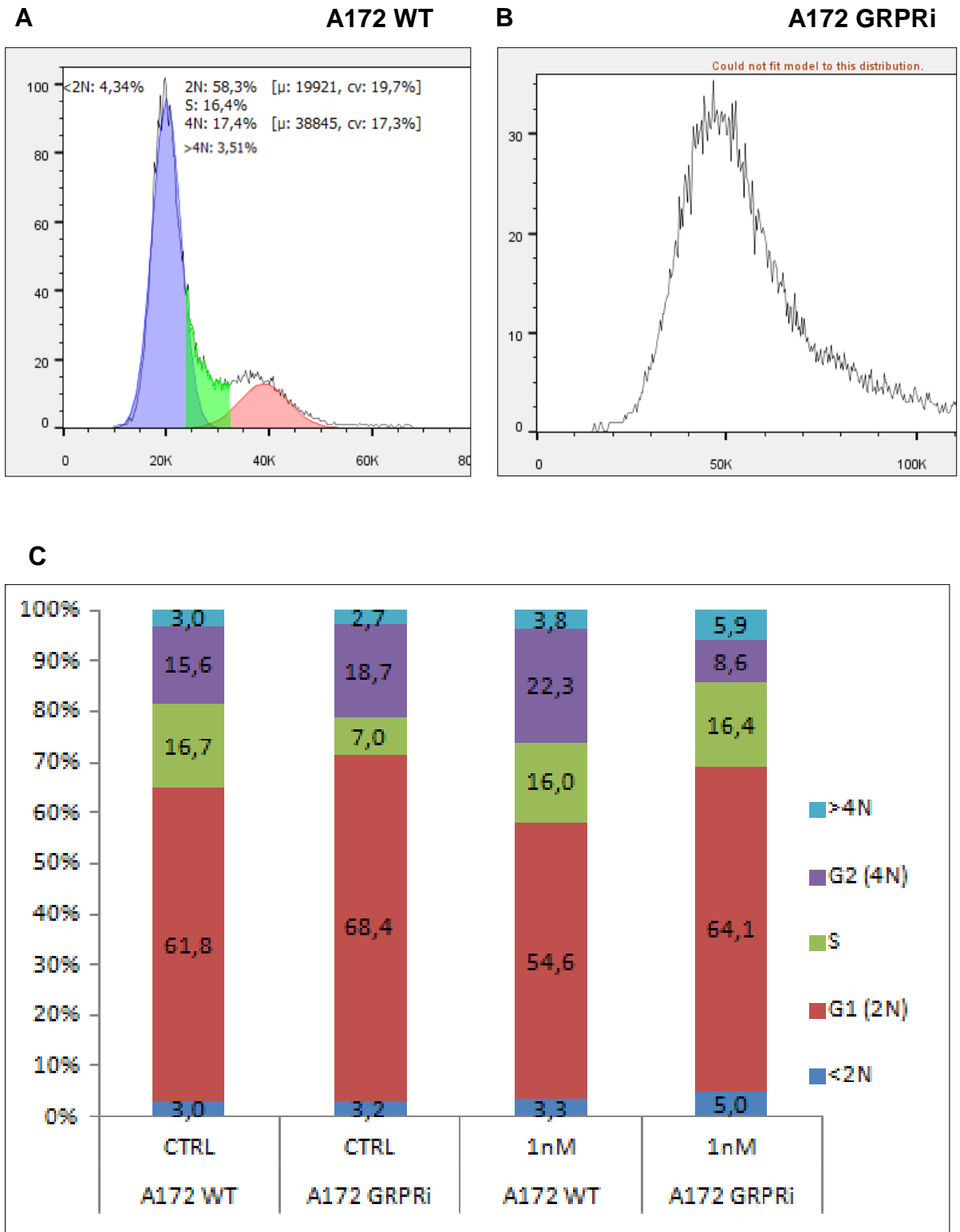


Figure 3



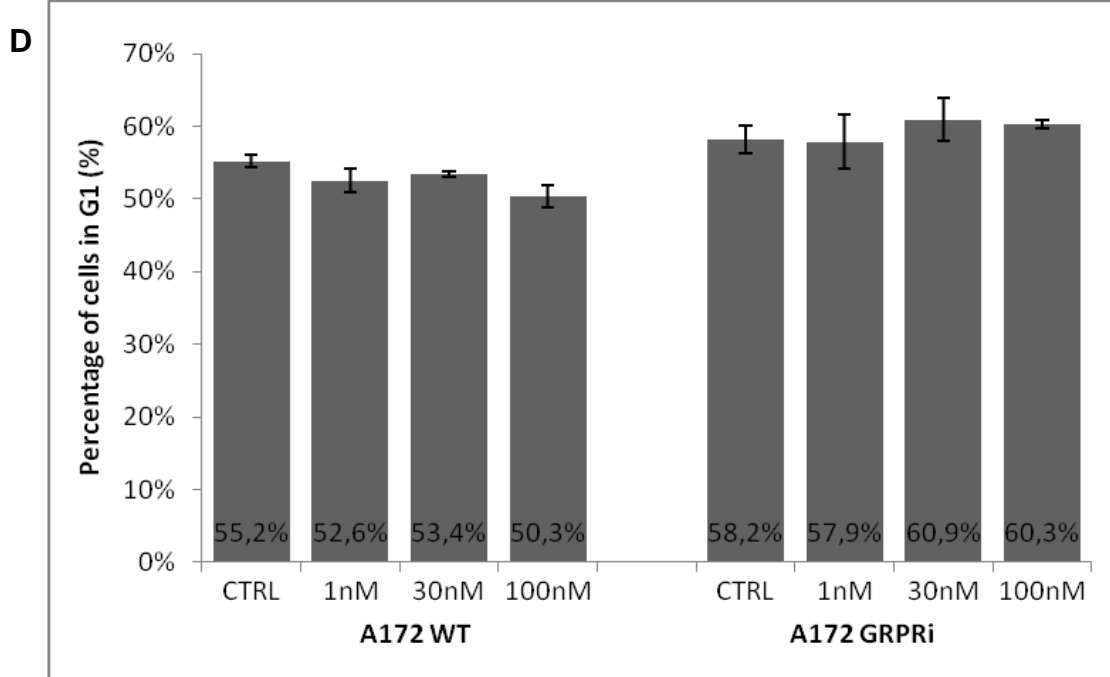


Figure 4

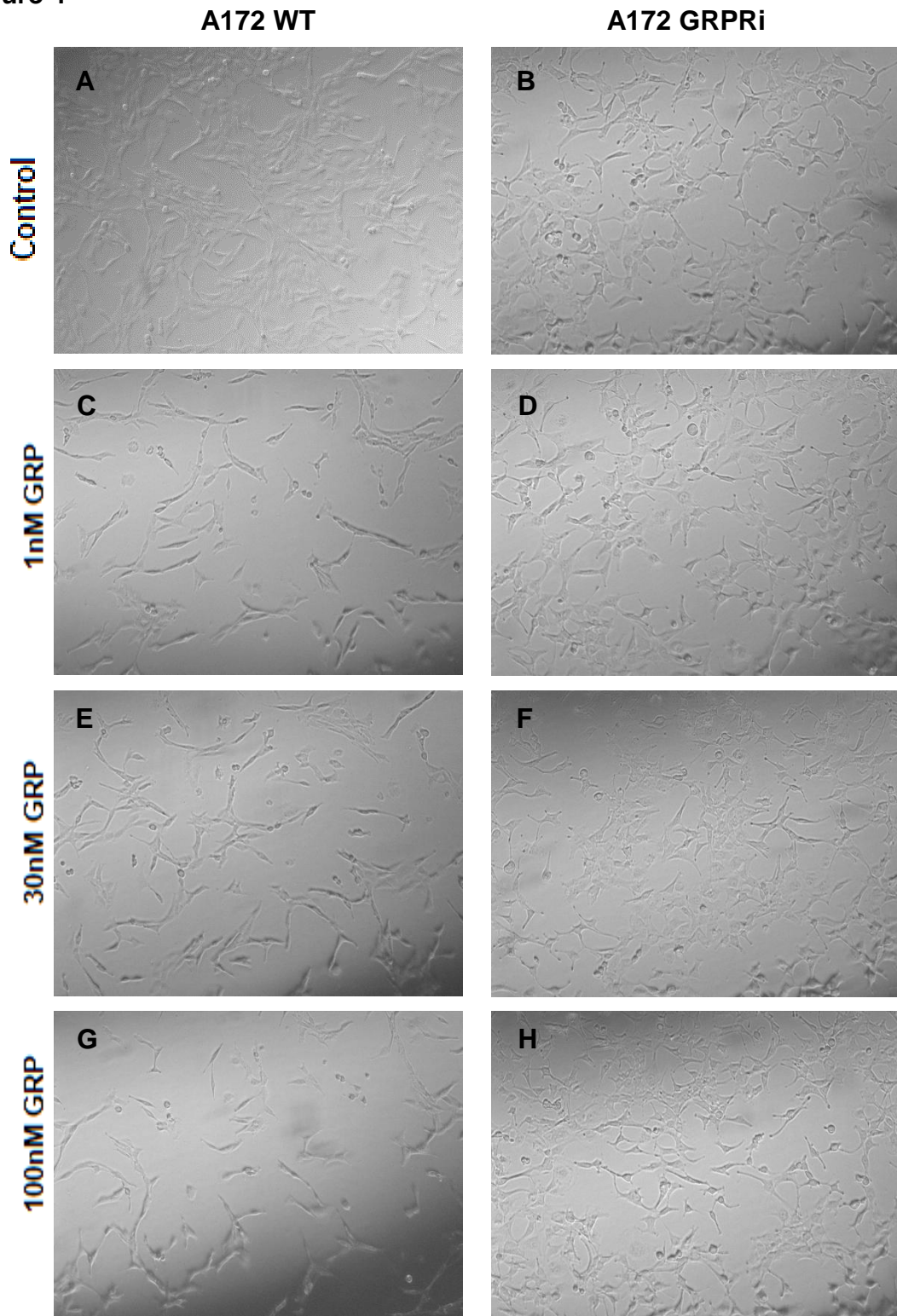


Figure 5

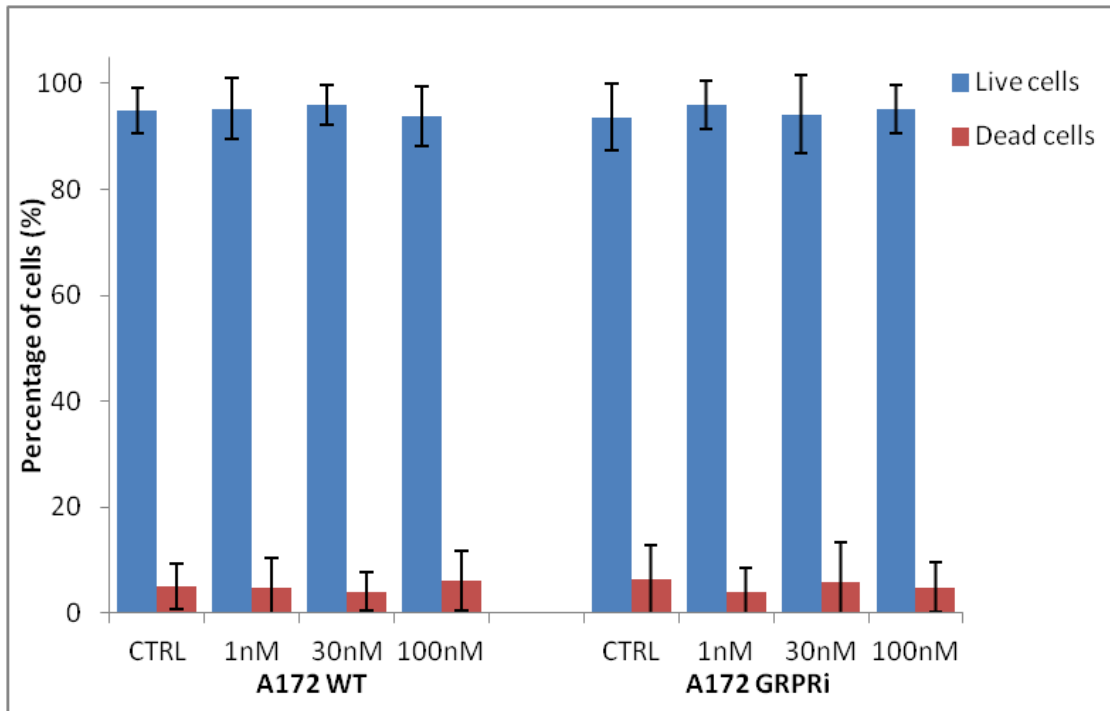
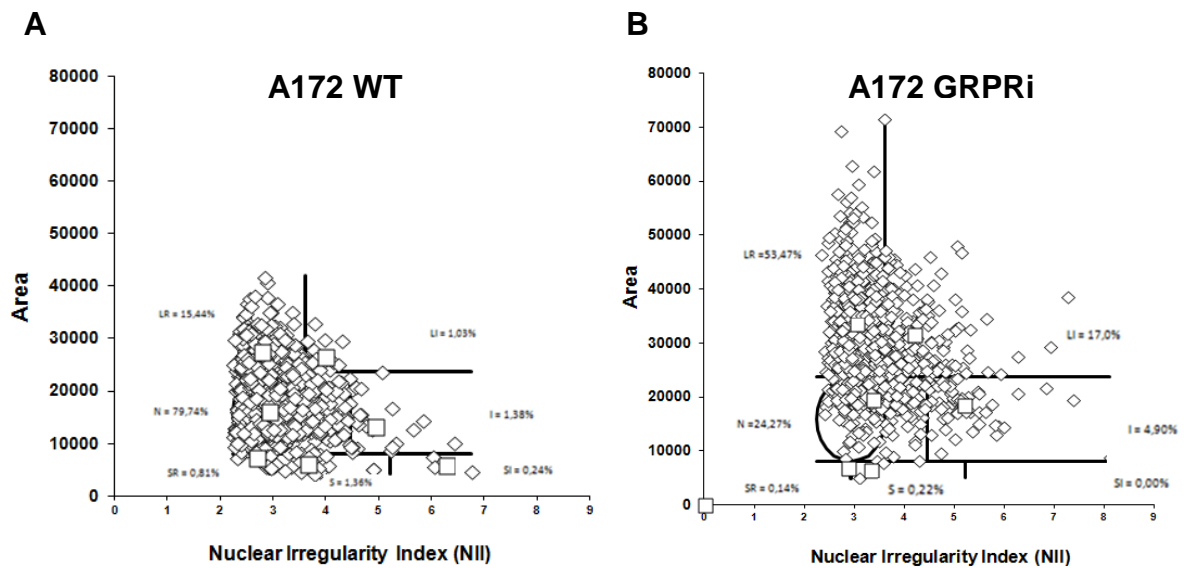


Figure 6



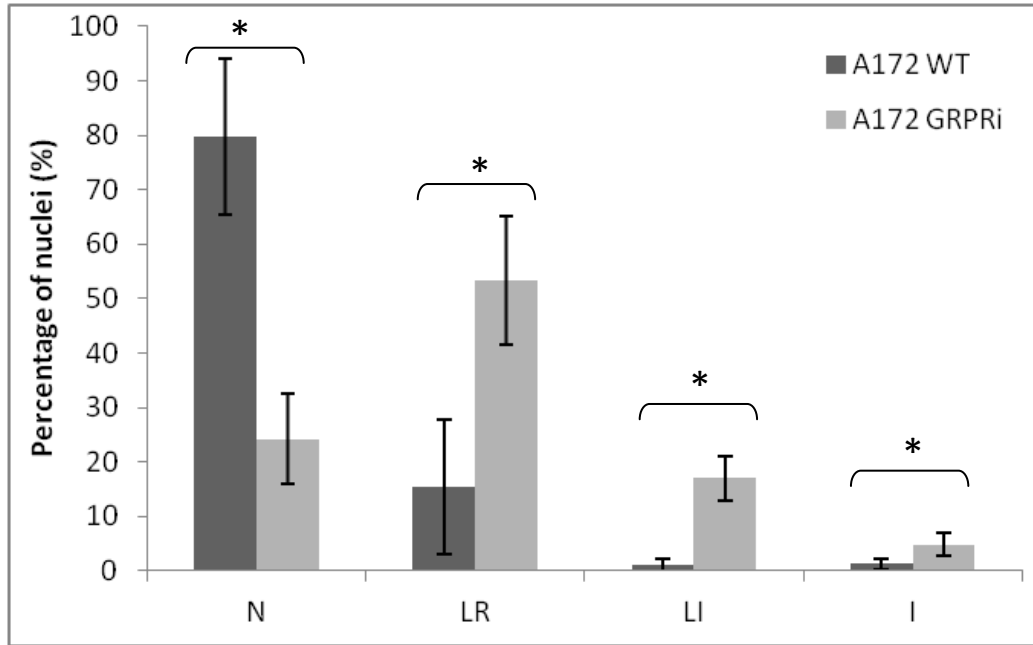
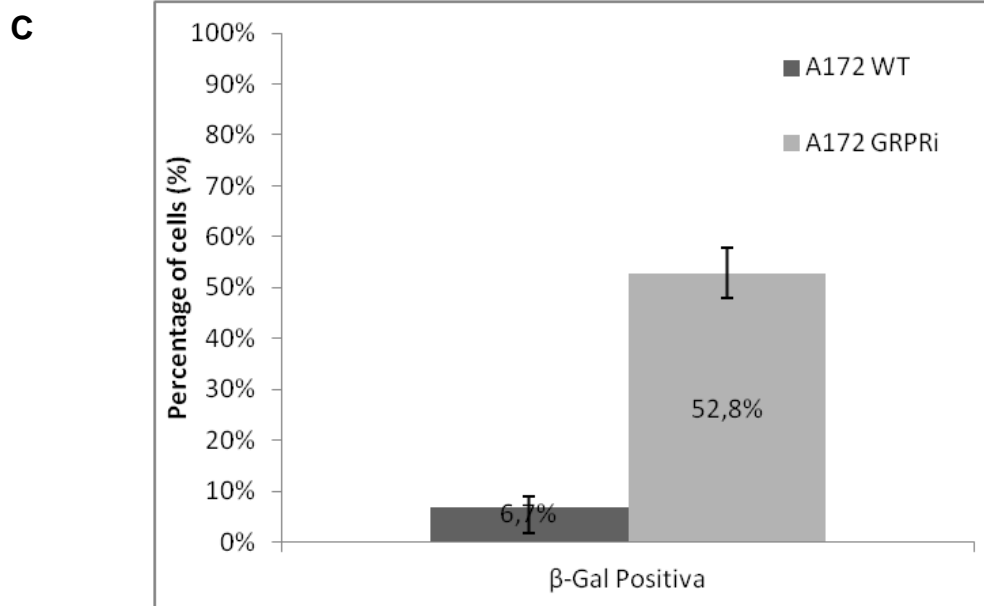
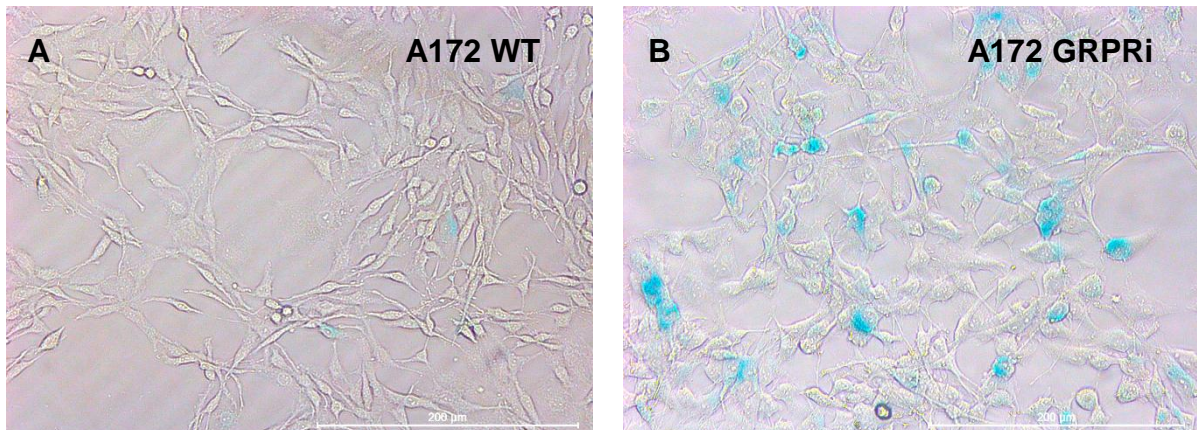


Figure 7



Captions

Figure 1. GRPR knockdown confirmed by western blotting. GRPR expression reduced approximately 60% on silenced cells (GRPRi). Ctrl represents the shRNAi control. LD (load control) is the control for the quantity of protein applied as seen in the membrane stained with Comassie blue.

Figure 2. Proliferation Assay of wild type and silenced cells. 1×10^4 cells were plated in 24-well plates in quadruplicates and cumulative population doubling level (PDL) was calculated over 21 days. GRPR silencing reduces proliferation rate on A172 cells. Data expressed as Cumulative PDL Mean \pm SD at certain time points of the experiment. N=3 until Day 17 and N=2 on day 21.

Figure 3. Cell cycle effects on A172 WT and GRPRi cells treated with GRP. We plated 2×10^4 cells in 24-well plates and after twenty-four hours cells were treated with 1 nM, 30 nM or 100 nM of GRP. After the following twenty-four hours, cells were prepared for cell cytometry. As seen by the representative images, GRPRi cells display the G1 peak propidium iodide fluorescence at 50K (**B**), while A172 WT cells have the G1 peak at 20K (**A**). Also, it wasn't possible to see the G2 peak in most GRPRi samples. In **C** we have the analysis made on FlowJo software for the two treatments that yielded a distribution the program could fit to the cell cycle model, since it was one of the few GRPRi samples in which it was possible to see the G2 peak N=1. On **D**, we have the percentage of cells in G1 for each condition. This percentage was calculated by hand considering the width of the single peak using FlowJo. N=3

Figure 4. Representative images of A172 cells treated with GRP for 24 hours (A-H). Treatment with GRP did not alter cell aspect. Photos were taken prior to trypsinization and cell cytometry analysis. 10x magnification.

Figure 5. Cell viability following a 24-hour treatment with GRP. We plated 2×10^4 cells in 24-well plates and after twenty-four hours cells were treated with 1 nM, 30 nM or 100 nM of GRP. After the following twenty-four hours, cells were prepared for cell cytometry. Treatment of A172 cells with GRP for twenty-four hours does not affect cell viability. Data expressed as mean percentage \pm SD. N=3

Figure 6. Differences in nuclear morphology between GRPRi and WT cells on the Nuclear Morphometric Assay (NMA). We plated 5×10^4 cells in 24-well plates and after twenty-four hours, cells were fixated using paraformaldehyde 4% and stained with DAPI 1 μ l/ml. Images were obtained in a inverted fluorescence microscope at 40x magnification, and then analyzed using Image Pro Plus. Distribution of A172 Wild-type **(A)** and A172 GRPRi **(B)** nuclei according to area and nuclear Irregularity Index (NII). Numbers in boxes denote the percentage of nuclei in each category (N – Normal; S – Mitotic; SR – Apoptotic; SI – Small and irregular; LR – Senescent; LI – Large and irregular; I – Irregular). On **C** is the percentage of nuclei according to nuclear morphology indicating that GRPR silencing induces senescence when compared to wild –type cells. * $p < 0,05$. N=4

Figure 7. Senescence-associated (SA) - β -galactosidase assay. Representative image of the SA- β -galactosidase activity on A172 Wild-type **(A)** and GRPRi **(B)** 40X magnification. Silencing of GRPR increases the percentage of senescent cells based on cell count using ImageJ **(C)**. Preliminary data N=1

References

- Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* 21(1), 107-112.
- Cancer Genome Atlas Research Network, T. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216), 1061-1068.
- Carrasco-Garcia, E., M. Saceda, S. Grasso et al. (2011). Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 317(10), 1476-1489.
- Carroll, R. E., K. A. Matkowskyj, M. S. Tretiakova, J. F. Battey and R. V. Benya (2000). Gastrin-releasing peptide is a mitogen and a morphogen in murine colon cancer. *Cell Growth Differ* 11(7), 385-393.
- Ciesielski, M. J. and R. A. Fenstermaker (2000). Oncogenic epidermal growth factor receptor mutants with tandem duplication: gene structure and effects on receptor function. *Oncogene* 19(6), 810-820.
- Coppola, D., L. Balducci, D. T. Chen et al. (2014). Senescence-associated-gene signature identifies genes linked to age, prognosis, and progression of human gliomas. *J Geriatr Oncol*.
- Cornelio, D. B., R. Roesler and G. Schwartzmann (2007). Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18(9), 1457-1466.
- Courtois-Cox, S., S. L. Jones and K. Cichowski (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27(20), 2801-2809.
- de Oliveira, M. S., G. Cechim, E. Braganhol et al. (2009). Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *J Neurooncol* 93(2), 191-201.
- Filippi-Chiela, E. C., M. M. Oliveira, B. Jurkovski, S. M. Callegari-Jacques, V. D. da Silva and G. Lenz (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* 7(8), e42522.
- Flores, D. G., C. B. de Farias, J. Leites et al. (2008). Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 5(2), 99-105.

- Flores, D. G., L. Meurer, A. F. Uberti et al. (2010). Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain Res Bull* 82(1-2), 95-98.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21(21), 2683-2710.
- Garbers, C., F. Kuck, S. Aparicio-Siegmund et al. (2013). Cellular senescence or EGFR signaling induces Interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR). *Cell Cycle* 12(21), 3421-3432.
- Gorjala, P. and R. K. Gary (2010). Beryllium sulfate induces p21 CDKN1A expression and a senescence-like cell cycle arrest in susceptible cancer cell types. *Biometals* 23(6), 1061-1073.
- Lopez, P. L., E. C. Filippi-Chiela, A. O. Silva et al. (2012). Sensitization of glioma cells by X-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown. *Oncology* 83(2), 75-82.
- Lui, V. W., S. M. Thomas, Q. Zhang et al. (2003). Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 22(40), 6183-6193.
- Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo et al. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15(11), 1311-1333.
- Mattei, J., R. D. Achcar, C. H. Cano et al. (2014). Gastrin-releasing peptide receptor expression in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* 138(1), 98-104.
- Ohtani, N., A. Takahashi, D. J. Mann and E. Hara (2012). Cellular senescence: a double-edged sword in the fight against cancer. *Exp Dermatol* 21 Suppl 1, 1-4.
- Patel, O., A. Shulkes and G. S. Baldwin (2006). Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766(1), 23-41.
- Qiao, J., J. Kang, T. A. Ishola, P. G. Rychahou, B. M. Evers and D. H. Chung (2008). Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35), 12891-12896.
- Sato, Y., A. Kurose, A. Ogawa et al. (2009). Diversity of DNA damage response of astrocytes and glioblastoma cell lines with various p53 status to treatment with etoposide and temozolomide. *Cancer Biol Ther* 8(5), 452-457.

- Schmidt, A. L., C. B. de Farias, A. L. Abujamra et al. (2010). BDNF and PDE4, but not the GRPR, regulate viability of human medulloblastoma cells. *J Mol Neurosci* 40(3), 303-310.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10), 987-996.
- Thomas, S. M., J. R. Grandis, A. L. Wentzel, W. E. Gooding, V. W. Lui and J. M. Siegfried (2005). Gastrin-releasing peptide receptor mediates activation of the epidermal growth factor receptor in lung cancer cells. *Neoplasia* 7(4), 426-431.
- Wen, P. Y. and S. Kesari (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359(5), 492-507.
- Xu, Y., N. Li, R. Xiang and P. Sun (2014). Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci* 39(6), 268-276.

4. Conclusões

Reunindo todos os dados obtidos até o momento podemos concluir que 60% de silenciamento de GRPR funciona como indutor de senescência na linhagem celular de glioblastoma multiforme A172. O *GRPR* pode ser um gene que em situações de redução de sua expressão pode gerar um estresse grande o suficiente para a célula, que em conjunto com algumas mutações possivelmente já presentes em tecidos tumorais, pode desencadear o processo de senescência.

A alta taxa de senescência nas células GRPRi pode ser responsável pela redução da taxa de proliferação dessas células quando comparadas aos controles, que apresentam taxas de senescência muito baixas. No entanto, os resultados do Population Doubling Level também podem indicar que a sinalização via GRPR é essencial para manter o potencial replicativo dessas células.

Considerando que o GRPR ainda não tem a sinalização bem definida e que o uso do inibidor RC-3095 tem efeito anti-proliferativo, se faz necessário maiores estudos de caracterização dessa via. A compreensão do papel do GRPR na indução de senescência em gliomas poderá possibilitar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, dependendo se a senescência favorece a progressão ou supressão tumoral nesse caso (Ohtani et al. 2012.). Desvendando a via de sinalização do GRPR para a indução de senescência, podem ser desenvolvidos inibidores ou ativadores para pontos específicos dessa via, podendo melhorar o prognóstico dos pacientes com glioblastoma multiforme.

5. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos até o momento, o principal passo é reiniciar o cultivo da linhagem A172 RNAi controle para a execução dos mesmos experimentos realizados até o momento para conferirmos se os dados obtidos não são artefato da técnica. Contudo, baseando-se em trabalhos realizados anteriormente envolvendo silenciamento com *short hairpin RNAi* e transdução com vetor lentiviral, indução de senescência nunca foi observada. É também importante a avaliação do efeito do silenciamento em outras linhagens de glioma e também em cultivo primário. Além disso, pretendemos investigar possíveis causas para o aumento da quantidade de núcleos irregulares (I) e grandes e irregulares (LI), visando a análise de integridade genômica e de dano ao DNA.

Outra área de investigação que pode ser abordada será o papel da senescência nessa linhagem celular, visto que ela pode servir como supressor tumoral e também como um processo que favorece a progressão tumoral. Pretendemos também analisar causas para a alteração de tamanho celular, parcialmente, mas não totalmente, explicado pelo aumento de células senescentes. Outras perspectivas são a avaliação de expressão gênica (utilizando PCR em tempo real) e do perfil protéico (via Western Blot) dessas células, visando entender o mecanismo de ação através do qual o GRPR é capaz de desencadear o processo de senescência nessa linhagem de glioblastoma multiforme.

6. Bibliografia adicional

- Andrade, C. M., P. L. Lopez, B. T. Noronha et al. (2011). Ecto-5'-nucleotidase/CD73 knockdown increases cell migration and mRNA level of collagen I in a hepatic stellate cell line. *Cell Tissue Res* 344(2), 279-286.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5), 961-976.
- Bleeker, F. E., S. Lamba, C. Zanon et al. (2014). Mutational profiling of kinases in glioblastoma. *BMC Cancer* 14, 718.
- Camby, I., I. Salmon, A. Danguy et al. (1996). Influence of gastrin on human astrocytic tumor cell proliferation. *J Natl Cancer Inst* 88(9), 594-600.
- Cherry, A. E. and N. Stella (2014). G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: Emerging therapeutic avenues. *Neuroscience* 278C, 222-236.
- Choi, B. H., Y. Chen and W. Dai (2013). Chromatin PTEN is involved in DNA damage response partly through regulating Rad52 sumoylation. *Cell Cycle* 12(21), 3442-3447.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20), 9363-9367.
- Easaw, J. C., W. P. Mason, J. Perry et al. (2011). Canadian recommendations for the treatment of recurrent or progressive glioblastoma multiforme. *Curr Oncol* 18(3), e126-136.
- Flores, D. G., Lenz, G. , Roesler, R. , Schwartsmann, G. (2009). Gastrin-releasing peptide receptor signaling in cancer. *Cancer Therapy* Vol 7, 331-345.
- Jensen, R. T., J. F. Battey, E. R. Spindel and R. V. Benya (2008). International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60(1), 1-42.

- Kleihues, P. and L. H. Sobin (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88(12), 2887.
- Liu, X., D. L. Carlisle, M. C. Swick, A. Gaither-Davis, J. R. Grandis and J. M. Siegfried (2007). Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res* 313(7), 1361-1372.
- Maruno, M., J. S. Kovach, P. J. Kelly and T. Yanagihara (1991). Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and proliferating potential in benign and malignant gliomas. *J Neurosurg* 75(1), 97-102.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, P. Farah et al. (2013). CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 15 Suppl 2, ii1-56.
- Pinski, J., A. V. Schally, G. Halmos, K. Szepeshazi and K. Groot (1994). Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. *Cancer Res* 54(22), 5895-5901.
- Roesler, R., A. T. Brunetto, A. L. Abujamra, C. B. de Farias, A. L. Brunetto and G. Schwartzmann (2010). Current and emerging molecular targets in glioma. *Expert Rev Anticancer Ther* 10(11), 1735-1751.
- Roesler, R., J. A. Henriques and G. Schwartzmann (2006). Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(2), 197-204.
- Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13(6), 748-753.
- Shen, W. H., A. S. Balajee, J. Wang et al. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 128(1), 157-170.
- Stoczynska-Fidelus, E., W. Och, P. Rieske et al. (2014). Spontaneous in vitro senescence of glioma cells confirmed by an antibody against IDH1R132H. *Anticancer Res* 34(6), 2859-2867.

- Szere day, Z., A. V. Schally, A. Nagy et al. (2002). Effective treatment of experimental U-87MG human glioblastoma in nude mice with a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215. *Br J Cancer* 86(8), 1322-1327.
- Ware, M. L., M. S. Berger and D. K. Binder (2003). Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol* 18(1), 207-216.
- Zhang, Q., N. E. Bhol a, V. W. Lui et al. (2007). Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Mol Cancer Ther* 6(4), 1414-1424.