

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

Influência de NMBR e EGFR sobre a viabilidade de células de meduloblastoma humano

MARIANE DA CUNHA JAEGER

Orientador: Prof. Rafael Roesler

**PORTO ALEGRE
MARÇO DE 2013**

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

Influência de NMBR e EGFR sobre a viabilidade de células de meduloblastoma humano

MARIANE DA CUNHA JAEGER

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Rafael Roesler

**PORTO ALEGRE
MARÇO DE 2013**

Instituição e Fonte Financiadora

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisas em Câncer, do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; número 303703/2009-1 concedido a Rafael Roesler); do Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, e da South American Office for Anticancer Drug Development (Fundação SOAD de Pesquisa do Câncer).

Agradecimentos

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho o meu sincero agradecimento.

*Ao meu orientador Rafael
Pela oportunidade e pelo exemplo*

*A todos do laboratório de Pesquisas em Câncer
Pela convivência e pela ajuda*

*A Carla e ao Daniel
Pelos momentos compartilhados e por toda a compreensão*

*A minha família
Pelo apoio, pelo incentivo e pelo carinho incondicional*

MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS!

INDICE GERAL

ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	
1.1 Meduloblastoma.....	10
1.2 Neuromedina B e Receptor de Neuromedina B.....	14
1.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico.....	19
2. Objetivos.....	24
3. Materiais e Métodos.....	25
4. Resultados	
4.1 Meduloblastoma expressa mRNA de NMBR e de NMB.....	28
4.2 Tratamento com NMB exógena e BIM-23127 não altera a viabilidade celular de meduloblastoma.....	29
4.3 Inibição de receptores similares a bombesina (BB1 e BB2) não altera viabilidade celular de meduloblastoma.....	29
4.4 Meduloblastoma expressa mRNA de EGFR	32
4.5 Viabilidade de Daoy, mas não de D283, é afetada pela inibição de EGFR.....	32
4.6 NMBR pode influenciar a atividade de EGFR.....	33
5. Discussão.....	35
6. Conclusões.....	41

7. Referências Bibliográficas.....	42
8. Curriculum Vitae resumido.....	53

Lista de Abreviaturas

BB	Bombesina (do inglês, <i>bombesin</i>)
BB1	Receptor de bombesina 1
BB2	Receptor de bombesina 2
BB3	Receptor de bombesina 3
CID-O	Classificação Internacional de Doenças para a Oncologia
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor do Fator de crescimento epidérmico (do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
ERK	Cinase reguladora de sinal extracelular (do inglês, <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)
GPCR	Receptores acoplados a proteína G (do inglês, <i>G protein-coupled receptors</i>)
GRP	Peptídeo liberador de gastrina (do inglês, <i>gastrin releasing peptide</i>)
GRPR	Receptor do peptídeo liberador de gastrina (do inglês, <i>gastrin releasing peptide receptor</i>)
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NMB	Neuromedina B (do inglês, <i>neuromedin B</i>)
NMBR	Receptor de Neuromedina B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, <i>platelet-derived growth factor receptor</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês, <i>protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês, <i>phospholipase C</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SHH	Sonic Hedgehog

Resumo

Meduloblastoma é o tumor maligno intracranial mais comum em crianças. Receptores de peptídeos similares à bombesina, como o receptor de neuromedina B (NMBR), podem possuir um papel no crescimento de tumores. Neste estudo, examinamos a expressão de neuromedina B (NMB) e de NMBR em linhagens de meduloblastoma humano Daoy e D283 e a influência desse receptor na viabilidade celular. Além disso, NMBR e GRPR compartilham vias de sinalização, então a influência dessa comunicação na viabilidade celular também foi investigada. Mostramos que, apesar de expressarem NMBR e NMB, a viabilidade de meduloblastoma não é afetada pelo tratamento por 48 h com NMB ou com antagonista de NMBR ou com a combinação de antagonistas de NMBR e de GRPR. Uma vez que há evidências de que a superexpressão de receptores da família ErbB esteja relacionada ao pior prognóstico em meduloblastoma, avaliamos a expressão e o efeito do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/ErbB1) sobre a viabilidade celular desse tumor. As duas linhagens estudadas expressam mRNA de EGFR, mas apenas a viabilidade de Daoy foi afetada pela inibição desse receptor. Avaliamos o efeito da inibição combinada de NMBR e EGFR sobre a viabilidade celular, uma vez que a ativação de receptores da família da bombesina é capaz de transativar EGFR em tumores. A inibição de NMBR parece facilitar a diminuição da viabilidade celular causada pela inibição de EGFR, indicando uma possível comunicação entre esses receptores. Assim, os resultados desse estudo demonstram a coexpressão de NMB e de NMBR e indicam uma possível relação desse receptor com EGFR.

Abstract

Medulloblastoma is the most common brain tumor of childhood. The mammalian bombesin receptors, as neuromedin B receptor (NMBR), can play an important role in the growth of tumors. In this study, we evaluated the expression of neuromedin B (NMB) and NMBR in human medulloblastoma cell lines Daoy and D283 and the influence of this peptide in cellular proliferation. Besides that, NMBR and GRPR share common signaling pathways, so the influence of this possible crosstalking in medulloblastoma cells proliferation was investigated. We show that, despite expressing NMBR and NMB, the viability of medulloblastoma is not affected by the treatment for 48 h with NMB or antagonist of NMBR or the combination of NMBR and GRPR antagonists. Since there is evidence that the overexpression of ErbB receptors family is linked to worse prognosis in medulloblastoma, we evaluate the expression and effect of epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) on cell viability of this tumor. The two cell lines studied expressed mRNA of EGFR, but only the viability of Daoy was affected by the inhibition of this receptor. We evaluated the combined effect of inhibition of EGFR and NMBR on cell viability, since the activation of the bombesin receptor family is able to transactivate EGFR in tumors. The inhibition of NMBR may facilitate the reduction of cell viability caused by inhibition of EGFR, indicating a possible communication between these receptors. Thus, the results of this study demonstrate the coexpression of NMB and NMBR and indicate a possible relationship of this receptor with EGFR.

1.Introdução

1.1 Meduloblastoma

Tumores do sistema nervoso central (SNC) apresentam alta taxa de mortalidade e morbidade, sendo as neoplasias mais prevalentes em crianças depois das leucemias (HUSE & HOLLAND, 2010; SIEGEL *et al.*, 2012). De acordo com a quarta edição da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O), publicada em 2007 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), essas neoplasias são classificadas em: tumores dos tecidos neuroepiteliais; tumores de crânio e nervos para espinhais; tumores das meninges; linfomas e neoplasias hematopoiéticas; tumores de células germinativas; e tumores metastáticos (LOUIS *et al.*, 2007). Os tumores dos tecidos neuroepiteliais incluem, entre outros, os tumores embrionários, nos quais se enquadra o meduloblastoma (FULLER & SCHEITHAUER, 2007; LOUIS *et al.*, 2007).

Meduloblastoma, um tumor embrionário do cerebelo, é o tumor intracranial mais comum em crianças, com cerca de 1000 novos casos por ano no mundo e com uma população com média de idade de 3 e 7 anos (GIANGASPERO *et al.*, 2006; ROUSSEL & HATTEN, 2011). Em crianças, esse câncer é responsável por 20% de todos os tumores intracranianos e 40% de todos os tumores da fossa posterior, sendo a taxa de sobrevivência em 5 anos de 40% a 70% dependendo do critério de prognóstico clínico (CARLOTTI *et al.*, 2008; ROSSI *et al.*, 2008). Apesar de serem predominantes na infância, 30% de meduloblastomas ocorrem em adultos (ROSSI *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, de acordo com dados do *Central Brain Tumor Registry of the United States*, meduloblastoma apresenta uma incidência de aproximadamente 0,6 casos para cada 100.000 pacientes (GUESSOUS *et al.*, 2008) e aproximadamente 400 a 450 novos pacientes pediátricos são diagnosticados com essa doença por ano na América do Norte (GAJJAR *et al.*, 2012). No Brasil, poucos são os dados fornecidos sobre a incidência dessa neoplasia. De acordo com uma revisão de literatura, os tumores do SNC são predominantes no sexo masculino, ocorrem principalmente em crianças menores de 15 anos, com um pico na idade de 10 anos, e representam cerca de 20% dos tumores infantis. O mesmo estudo indica que o meduloblastoma, juntamente com o astrocitoma, é o tipo mais comum de tumor do SNC em crianças (MUTTI *et al.*, 2010).

Alguns estudos com enfoque pediátrico apresentam dados mais específicos sobre a ocorrência dessa doença no Brasil. O estudo realizado na Universidade Federal do Paraná entre 1990 e 1996 analisou 3.318 biópsias de SNC, das quais 623 (18,7%) eram de pacientes pediátricos (entre cinco e 15 anos); entre esses pacientes, 9,95% apresentaram tumores classificados histologicamente como meduloblastoma (TORRES, 1997). Outro estudo realizado no Hospital de Clínicas de São Paulo entre 1974 e 2003 descreveu a ocorrência de 1.195 casos de tumores cerebrais pediátricos, tendo os pacientes uma faixa etária de 0 a 21 anos. Meduloblastoma ocorreu em 11% dos casos, sendo o astrocitoma pilocítico (18%) e o astrocitoma difuso (14%) os tumores de maior ocorrência (ROSEMBERG, 2005). O meduloblastoma apareceu como tumor mais frequente do SNC em um estudo realizado no Instituto de Oncologia Pediátrica/GRAAC, da Universidade Federal de São Paulo. Durante quatro anos, de 1993 a 1997, 70 casos de crianças e adolescentes (1 a 15 anos) foram registrados, dos quais 21 casos foram diagnosticados como meduloblastoma (SERAFIM, 2001).

De acordo com a OMS, o meduloblastoma apresenta cinco subtipos histológicos: meduloblastoma clássico, meduloblastoma desmoplásico/nodular, meduloblastoma com extensa nodularidade, meduloblastoma anaplásico e meduloblastoma de grandes células, sendo todas essas variantes consideradas, quanto à malignidade, tumores de grau IV (GILBERTSON & ELLISON, 2008). Um segundo método mais recente e preciso baseado no perfil de expressão gênica tem sido estabelecido, dividindo esse tumor em quatro subtipos: sonic hedgehog (SHH), WNT, Grupo 3 e Grupo 4 (TAYLOR *et al.*, 2012).

Os subgrupos definidos a partir do entendimento das bases genéticas e moleculares do meduloblastoma apresentam assinaturas de expressão gênica distintas, além de fenótipos clínicos divergentes. Essa classificação, que se baseia principalmente na determinação de vias de sinalização importantes na formação e/ou manutenção desse tumor, possibilita o entendimento da origem de meduloblastomas. A identificação de diferentes proteínas mutadas nos subgrupos e resultados obtidos em camundongos geneticamente modificados que desenvolvem meduloblastoma permitiram a determinação das células de origem desse tumor. Progenitores cerebelares e precursores de neurônios granulares cerebelares são exemplos de prováveis células de origem (NORTHCOTT *et al.*, 2012).

A classificação do meduloblastoma e o prognóstico do paciente estão correlacionados (Figura 1), sendo WNT/Clássico e Grupo 3/Anaplásico de grandes células os subtipos de melhor e pior prognóstico respectivamente (HATTEN & ROUSSEL, 2011). Outros três critérios são utilizados nas triagens clínicas: idade do paciente ao diagnóstico, resíduo tumoral posoperatório e metástase tumoral. Essas características determinam a divisão dos pacientes em pacientes de risco médio e pacientes de alto risco. Os primeiros são aqueles diagnosticados após os três anos de idade, que não apresentam metástase e que

realizaram ressecção cirúrgica total ou apresentam resíduo tumoral posoperatório menor que 1,5 cm². Pacientes que não se encaixam nesse perfil são considerados de alto risco (GILBERTSON, 2004).

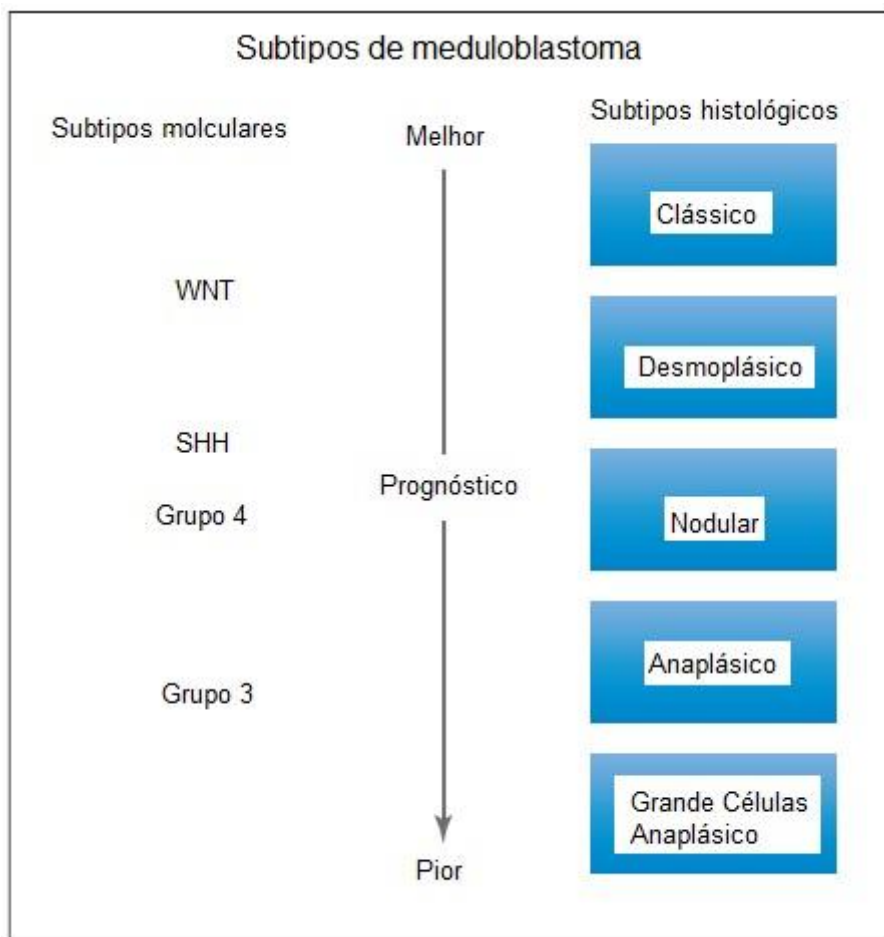


Fig. 1: Relação entre subtipos de meduloblastoma com o prognóstico clínico. Os cinco subtipos de meduloblastoma definidos histopatologicamente não se sobrepõem necessariamente com os subtipos definidos por análise molecular. (Adaptado de Hatten & Roussel, 2011)

Independentemente do perfil de risco, o tratamento padrão de todos os pacientes de meduloblastoma envolve ressecção cirúrgica máxima, quimioterapia baseada em cisplatina

intravenosa e radioterapia (PACKER *et al.*, 1999; ELLISON *et al.*, 2003). Com esse tratamento, apenas 60% dos pacientes são curados e a maioria sofre os efeitos negativos sobre a qualidade de vida a longo prazo (ELLISON *et al.*, 2003; GILBERTSON, 2004). Os efeitos colaterais mais comuns envolvem déficits neurocognitivos, resultantes da radioterapia utilizada, o que pode levar a diminuição nos quocientes de inteligência (RIS *et al.*, 2001; PALMER *et al.*, 2007). Outros efeitos tóxicos do tratamento consistem em desenvolvimento de sequelas endocrinológicas e tumores secundários, ototoxicidade, toxicidade ginecológica, complicações neonatais e toxicidade cardíaca e pulmonar, podendo estas complicações levar à morte (RIS *et al.*, 2001; PEREZ-MARTINEZ *et al.*, 2005; GESSI *et al.*, 2008).

Assim, como a maioria das terapias citotóxicas convencionais, a principal limitação dos tratamentos utilizados em meduloblastoma é a falta de especificidade. O entendimento das vias de sinalização envolvidas na patogênese poderia melhorar significativamente o manejo clínico dessa neoplasia (MARINO, 2005).

1.2 Neuromedina B e Receptor de Neuromedina B

O peptídeo bombesina (BB), composto por 14 aminoácidos, foi originalmente isolado da pele de rã *Bombina bombina* (ANASTASI *et al.*, 1971). Outros peptídeos estruturalmente similares a BB foram isolados da pele de anfíbios e foram, por isso, divididos em três grupos: família bombesina, família ranatensina e família filolitorina (Figura 2) (ERSPAMER *et al.*, 1984; OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2005). Em mamíferos, foram descobertos e isolados dois peptídeos homólogos à bombesina: o peptídeo liberador

de gastrina (GRP), isolado de tecido gástrico de suínos (MCDONALD *et al.*, 1979), e a neuromedina B (NMB) (MINAMINO *et al.*, 1983).

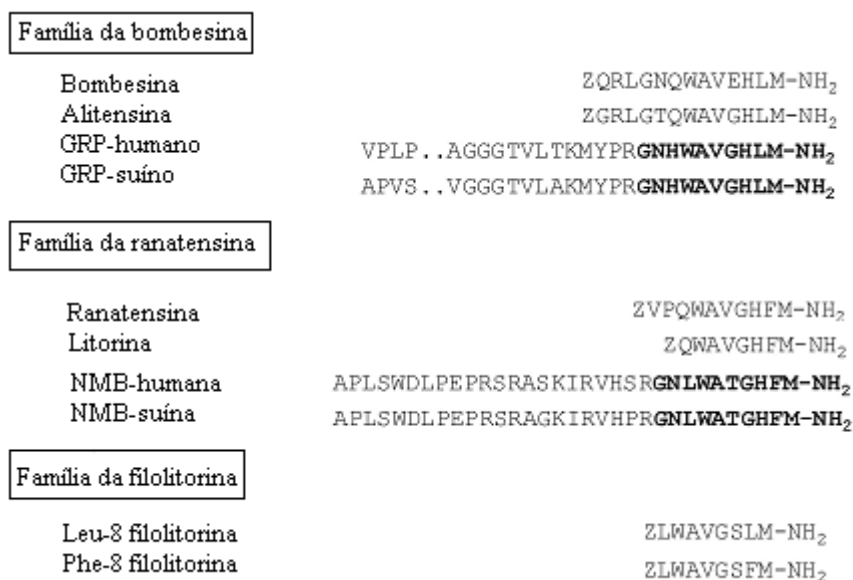


Fig 2. Estrutura da bombesina e peptídeos análogos (adaptado de Ohki-Hamazaki *et al.*, 2005).

A NMB, que apresenta similaridade com a ranatensina nos sete últimos aminoácidos da porção carboxi-terminal (MINAMINO *et al.*, 1983; 1985), contém 10 aminoácidos. Porém, esse peptídeo é inicialmente codificado como um precursor de 76 aminoácidos, a prepro-NMB, que é processado e metabolizado por enzimas similares à tripsina, resultando na NMB madura (MOODY *et al.*, 1995; GONZALEZ *et al.*, 2008;).

A presença de NMB ocorre em diferentes tecidos, incluindo diversas áreas do sistema nervoso central. As funções biológicas exercidas por NMB são similares a outros peptídeos análogos da bombesina, como o GRP, e a própria bombesina (OHKI-HAMAZAKI, 2000). Entre essas funções estão contração do músculo liso; secreção

exócrina e endócrina de tecidos gastrointestinais, pâncreas e pituitárias; e efeitos no SNC como termorregulação, efeitos comportamentais, manutenção do ritmo circadiano, inibição da liberação de tirotrófina, efeitos sobre saciedade e efeitos na transmissão sensorial espinal (ORBUCH *et al.*, 1993; JENSEN *et al.*, 2008). Além de processos fisiológicos, estudos demonstraram a influência de NMB e outros peptídeos similares à bombesina no crescimento e/ou na diferenciação de vários tumores como câncer de cólon, próstata, pulmão e alguns tumores ginecológicos (CUTTITTA *et al.*, 1985; SCHALLY *et al.*, 2000; JENSEN & MOODY, 2006).

Os efeitos de NMB são realizados pela ativação de receptores de superfície celular. Os três diferentes receptores ativados por bombesina em mamíferos, BB₁, BB₂ (também conhecido como GRPR) e BB₃, podem ser ativados por NMB. O BB₁ é o receptor que apresenta maior afinidade por NMB e, por isso, também é conhecido como receptor de neuromedina B (NMBR) (PATEL *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2008).

O NMBR, juntamente com GRPR e BB₃, é um receptor acoplado à proteína G. Ele é composto por 390 aminoácidos, apresentando sete domínios transmembrana (CORJAY *et al.*, 1991; JENSEN *et al.*, 2008) (Figura 3).

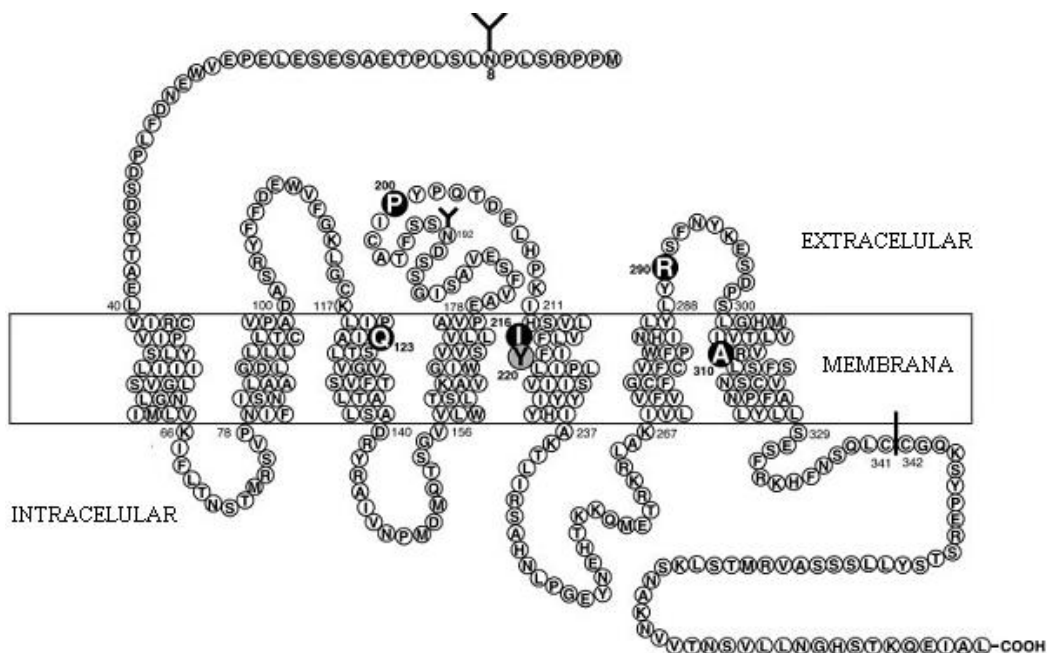


Fig. 3: Estrutura do receptor de NMB (adaptado de Jensen et al., 2008).

Assim como seu ligante, o mRNA de NMBR foi descrito diferentes espécies incluindo ratos, camundongos e primatas (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2000; SANO *et al.*, 2004). Nessas espécies, esse receptor foi encontrado em diferentes regiões como SNC, trato gastrointestinal e células de músculo liso. A expressão de NMBR também ocorre em um amplo espectro de tumores incluindo câncer de pulmão de pequenas células ou de não pequenas células, carcinóides intestinais, tímicos e bronquiais, cânceres epiteliais ovarianos, linhagens de glioblastomas e linhagem de células de câncer pancreático (DEMICHELE *et al.*, 1994; JENSEN *et al.*, 2008).

NMBR e GRPR são estruturalmente relacionados e apresentam vias de sinalização em comum (JIAN *et al.*, 1999). A ativação desses receptores ocorre através de uma cascata de sinalização envolvendo a atividade de fosfolipase C (*phospholipase C*, PLC). Após a ligação entre receptor e agonista, ocorre a ativação de PLC que, por sua vez, resulta na quebra de fosfoinosítídeos, mobilização de cálcio intracelular e ativação da proteína cinase

C (*protein kinase C*, PKC). A ativação da via da PLC/PKC leva também à ativação da via da proteína cinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). A ativação de fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), a qual regula o crescimento tumoral pela fosforilação de Akt, também pode estar associada a esses receptores (OHKI-HAMAZAKI *et al.*, 2000; JENSEN *et al.*, 2008) (Figura 4).

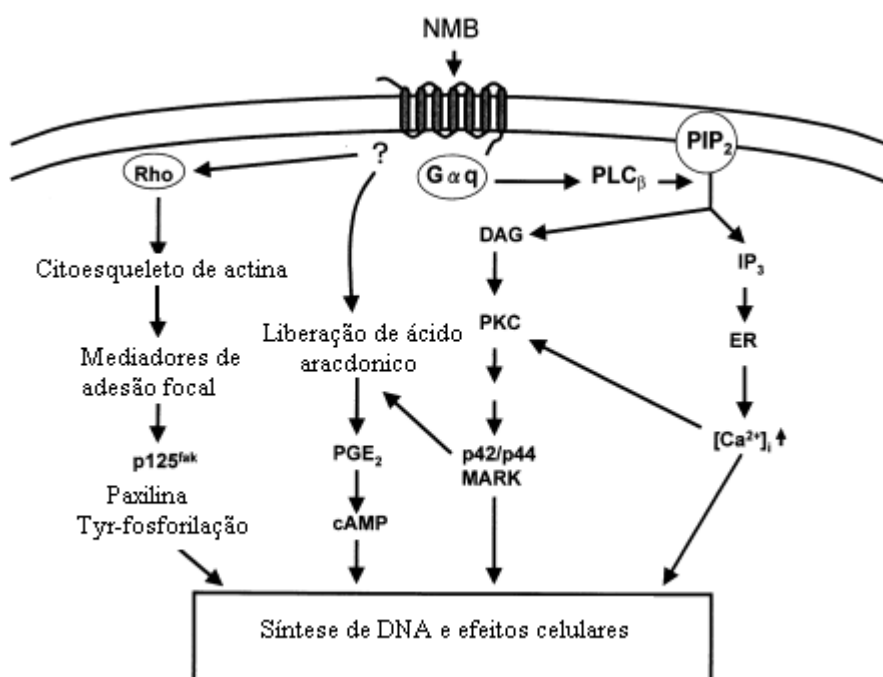


Fig. 4: Proposta para a cascata de sinalização ativada por NMBR (adaptado de Ohki-Hamazaki *et al.*, 2000).

Uma vez que NMB está presente em grandes quantidades em neurônios participando do desenvolvimento neuronal (IWABUCHI *et al.*, 2006) e o seu receptor é detectado em diversos tipos de câncer, incluindo gliomas (MOODY *et al.*, 1995), é provável que tenham função importante também em meduloblastomas e possam servir de alvo terapêutico para o tratamento desses tumores. Apesar dessa relação, poucos estudos investigaram o possível papel de neuropeptídeos similares à bombesina e seus receptores

em meduloblastoma (SCHIMIDT *et al.*, 2010) e nenhum estudo prévio investigou a expressão de NMB ou NMBR em meduloblastoma e seus possíveis efeitos sobre o crescimento desses tumores.

1.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também conhecido como ErbB1, é uma glicoproteína transmembrana com peso molecular de 170 kDa pertencente à subfamília do tipo I de Receptores Tirosina Cinase. Essa classe de receptores inclui outros três receptores conhecidos: HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 e HER4/ErbB-4. Estes receptores são compostos por três domínios: um domínio de ligação extracelular, um segmento transmembrana lipofílico e um domínio citoplasmático de tirosina cinase (La TANGUE & KERR, 2011; YARDEN & PINES, 2012).

Receptores da família ErbB são expressos em uma variedade de tecidos humanos com origem epitelial, mesenquimal e neuronal. EGFR, especificamente, está presente em todas as células epiteliais e estromais e também em células gliais e músculo liso (DAMJANOV *et al.*, 1986; WELLS, 1999). Nessas células, EGFR age como um sinalizador pleiotrópico. Sua ativação pode desencadear diversas respostas biológicas como indução da divisão celular, apoptose, migração, diferenciação e desdiferenciação, mesmo na mesma célula. A definição de qual processo ocorrerá depende do contexto celular, o qual inclui a densidade celular, o tipo de matriz, outras citocinas e até mesmo a posição dentro da colônia (WELLS, 1999).

Além de presente em tecidos normais, EGFR é o receptor mais frequentemente superexpresso em uma variedade de tumores humanos (AARONSON, 1991). Entre essas neoplasias estão tumores de mama, pulmão, cabeça e pescoço, pâncreas, carcinomas renais entre outros. A ativação de receptores da família ErbB, incluindo EGFR, tem sido implicada na progressão de muitos desses tumores (AARONSON, 1991; SOLOMON *et al.*, 1995; MENDELSON & BASELGA, 2006; YARDEN & PINES, 2012).

Receptores da família ErbB são importantes também em tumores do SNC. Em gliomas, especificamente glioblastoma multiforme, ocorre a superexpressão de ErbB-1 e esta expressão está correlacionada a tumores mais agressivos e mais resistentes à radioterapia (MISCHEL & CLOUGHESY, 2003; CHAKRAVARTI *et al.*, 2004; HENSON & GIBSON, 2006). Em ependimomas, a expressão de ErbB-3 e de ErbB-4 está associada à alta atividade proliferativa. (GILBERTSON *et al.*, 2002). Em meduloblastoma, ErbB-2 é detectado em aproximadamente 80% dos casos e está superexpresso em aproximadamente 40%, sendo que esse receptor não é detectado durante o desenvolvimento do cerebelo, local onde ocorre esse câncer. Além de ErbB-2, a coexpressão de ErbB-3 e de ErbB-4 já foi detectada em meduloblastomas (GILBERTSON *et al.*, 1997; SUMER-TURANHGIL *et al.*, 2013).

Várias alterações nos receptores ErbB como a amplificação de genes, rearranjos estruturais e mutações somáticas podem ocorrer em diferentes tumores. Essas alterações, principalmente mutações no domínio intracelular, normalmente permitem que o receptor seja ativado independentemente da presença de um ligante, ou seja, os receptores estão constitutivamente ativos. Com essa mesma finalidade, alguns tumores aumentam a produção de fatores de crescimento relacionados ao fator de crescimento epidérmico (EGF) (MUKOHARA *et al.*, 2003; YARDEN & PINES, 2012). Assim, células tumorais

utilizam a via de sinalização ativada por EGFR para sobreviver em diferentes condições ou nichos celulares e para evitar a apoptose induzida por terapias antitumorais (HENSON & GIBSON, 2006).

Diferentes ligantes pertencentes à família EGF de fatores tróficos são capazes de se ligar ao EGFR e ativá-lo (HYNES & LANE, 2005; TOSHI & CAPPUZZO, 2007). A ligação dessas moléculas ao domínio extracelular do receptor ocasiona a dimerização de receptores da família ErbB. A formação de homodímeros ou heterodímeros induz a atividade catalítica do domínio tirosina cinase citoplasmático. As fosfotirosinas resultantes agem como sítios de ligação para várias moléculas transdutoras de sinal, que são recrutadas e passam a ativar diferentes vias intracelulares. Assim, uma cascata de cinases permite a amplificação de uma rede de vias de sinalização que alteram as funções de proteínas e ativam a transcrição gênica (Figura 5) (HENSON & GIBSON, 2006; HYNES & MACDONALD, 2009).

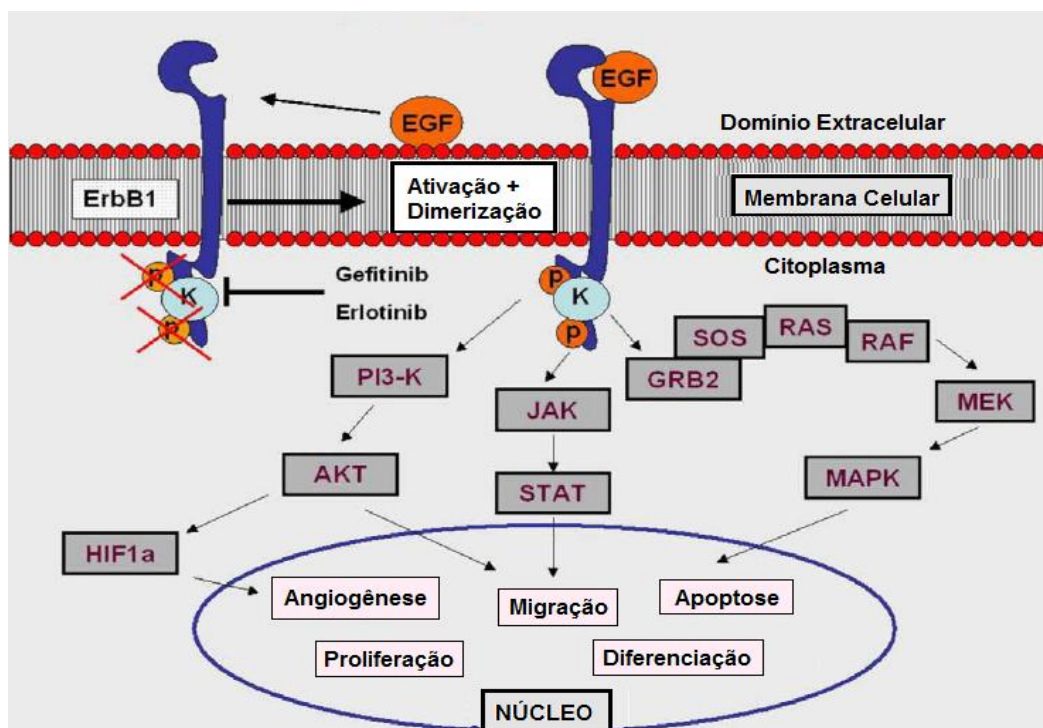


Fig. 5: EGFR (ErbB1) e suas vias de sinalização (adaptado de FARIAS, 2012).

Além da ativação direta por seus ligantes, EGFR pode ser transativado por receptores acoplados à proteína G (GPCRs). GPCRs utilizam EGFR como uma proteína intermediária sinalizadora, possibilitando a ativação de vias *downstream* desse receptor, como ERK1/2, PLC γ , PI3K/Akt (Figura 6). Essa sinalização é capaz de regular o crescimento, a diferenciação e a migração celular em uma variedade de tipos celulares, incluindo células tumorais (HSIEH & CONTI, 2005; HYNES & LANE, 2005; LIEBMANN, 2011). Receptores da família da bombesina são GPCRs capazes de transativar EGFR em células tumorais (SZEPESHAZI *et al.*, 1997; MOODY *et al.*, 2010).

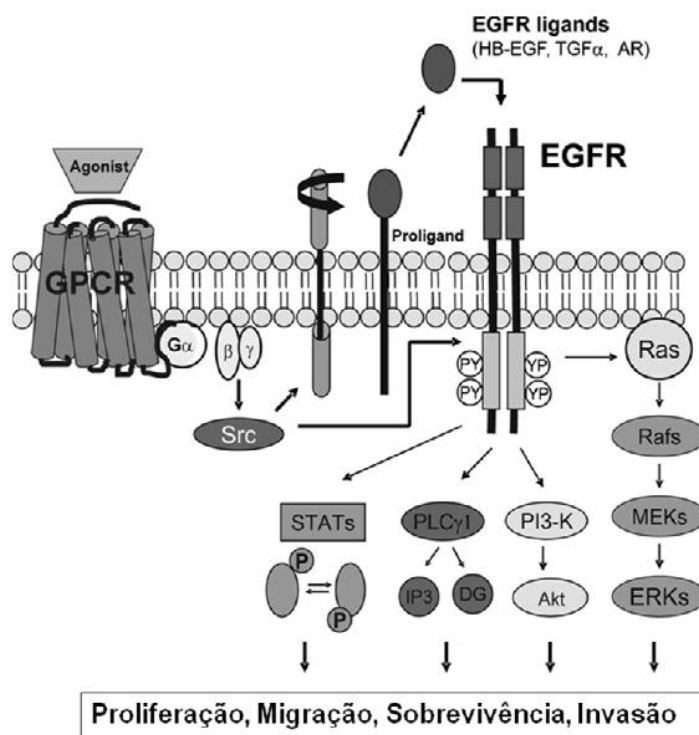


Fig. 6: Mecanismo de transativação entre GPCRs e EGFR. Estimulação por agonistas de GPCRs resulta na produção de determinados ligantes da família de EGF que, por sua vez, ativam EGFR e sua sinalização intracelular (FARIAS, 2012).

Devido à sua função em diferentes tumores, várias estratégias tem sido desenvolvidas para modular tanto EGFR como as vias de sinalização a ele associadas. O importante papel da sinalização aberrante desse receptor na progressão de gliomas indica que as terapias alvo contra EGFR poderiam ser úteis também em outros tumores do SNC, como meduloblastoma (GILBERTSON *et al.*,1998; BODEY *et al.*, 2005).

2. Objetivos

Avaliar a expressão e possíveis funções de NMB e de NMBR em células de meduloblastoma humano, assim como a possível relação desse receptor com GRPR e EGFR.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de mRNA de NMBR, NMB e EGFR em células de meduloblastoma humano;
- Avaliar o efeito da ativação e da inibição de NMBR na viabilidade de células de meduloblastoma humano;
- Avaliar o efeito da inibição combinada de NMBR e GRPR na viabilidade de células de meduloblastoma humano;
- Avaliar o efeito da inibição de EGFR na viabilidade de células de meduloblastoma humano;
- Avaliar o efeito da inibição combinada de NMBR e EGFR na viabilidade de células de meduloblastoma humano.

3. Materiais e Métodos

Cultura Celular

As linhagens celulares de meduloblastoma humano Daoy e D283 foram cedidas pelo Dr. Michael D. Taylor (*The Hospital for Sick Children*, Toronto, Canadá), sendo Daoy e D283 originalmente obtidas do *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA). As células foram mantidas em meio *Eagle's* modificado contendo 2% (m/v) de H-glutamina (DMEM; LGC Biotecnologia) e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Soral, Campo Grande, Brasil), 0.1% de fungizona, 100 U/L de gentamicina e 2,5% de ampicilina. As células foram mantidas à temperatura de 37 °C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de CO₂ de 5%.

Contagem Celular e Tratamentos

Para avaliação de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços em densidade de 3×10^3 células por poço. Após 24 h, as culturas foram tratadas com NMB (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), com o antagonista NMBR, BIM 23127 (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), com a combinação de antagonista de NMBR e antagonista de GRPR, RC 3095 (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM; Zentaris GmbH, Frankfurt, Germany), com o anticorpo monoclonal específico para EGFR, cetuximabe (1, 5 ou 10 µg/mL, Erbitux, C225; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ou com a combinação de BIM 23127 (100 ou 1000 nM) com cetuximabe (1 ou 10 µg/mL). As doses das drogas foram escolhidas com base em estudos prévios que utilizavam metodologia e tratamento similar (MOODY *et al.*, 1995; HEROLD *et al.*, 2003; FARIAS *et al.*, 2010). A contagem celular foi realizada 48 h após o

tratamento. O meio foi removido e uma solução de 0.25% tripsina/EDTA foi adicionada para soltar as células. Após soltas, a ação da tripsina foi bloqueada com 5 µL de SFB. Para assegurar a contagem de células viáveis, corante azul de tripan foi adicionado na alíquota a ser analisada (10 µL de azul de tripan e 10 µL de solução celular). Após a preparação, as células foram contadas imediatamente em um hemocitômetro. Experimentos foram repetidos 3 vezes (n=3) com 4-6 replicatas para cada concentração das fármacos.

RT-PCR

A análise da expressão de mRNA de NMBR, NMB e EGFR foi realizada por RT-PCR. O RNA total das linhagens Daoy e D283 foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix®* (Invitrogen, USA). Os primers de NMBR, NMB e EGFR foram definidos de acordo com a sequência correspondente do GenBank:

Para NMBR: Forward *primer*: 5' CGTCCCCAACATCTTCATCT 3'

Reverse *primer*: 5' ACCTTGCCAAACATCCACTC 3'

Para NMB: Forward *primer*: 5' ACGTCTTCCACACACTTGG 3'

Reverse *primer*: 5' TGAAGGTTCCATTGAGCACA 3'

Para EGFR: Forward *primer*: 5'-TAACAAGCTCACGCAGTTGG-3'

Reverse *primer*: 5'-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3'

Como controle foi utilizada a expressão do RNA mensageiro da proteína β-actina:

Forward *primer*: 5' AACTGGAACGGTGAAGGTG 3'

Reverse *primer*: 5' AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT 3'

A reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) foi realizada utilizando o kit *Go Taq Start Polymerase Sample* (Promega, Madison, USA) em volume final de 50 μL , no qual foram utilizados 3 μL MgCl_2 (25 mM), 1 μL mix desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs, 10 mM), 1 μL de cada *primer*, 0,25 μL de Go Taq Hot Start Polymerase (5 U/ μL), 10 μL do tampão Green flexi, 2 μL de cDNA e 31,75 μL de água miliQ estéril.

A amplificação consistiu de 1 min à 95 °C seguido por 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 30 s, extensão de *primers* a 72 °C por 45 s, e uma extensão final à 72 °C por 10 min.

Os produtos de NMBR (114 bp), NMB (367 bp), EGFR (190 bp) e β -actina (190 bp) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (FARIAS *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2008).

Análise estatística

Os resultados dos experimentos de contagem celular foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Comparações de parâmetros entre diferentes grupos experimentais foram realizadas através de análise de variância de uma via (ANOVA) *post hoc* de Tukey. Valor de *P* menor do que 0,05 foi utilizado como indicador de diferenças significativas.

4. Resultados

4.1 Meduloblastoma expressa mRNA de NMBR e de NMB

Análise por RT-PCR demonstrou que as linhagens celulares de meduloblastoma Daoy e D283 expressam mRNA de NMBR e NMB. A amplificação com *primers* específicos para NMBR e NMB gerou produtos com os tamanhos esperados em todas as amostras (Figura 7). Transcritos de 114 bp, representando o fragmento de NMBR (Figura 7a), e de 367 bp, representando o fragmento de NMB (Figura 7b), foram identificados nas células.

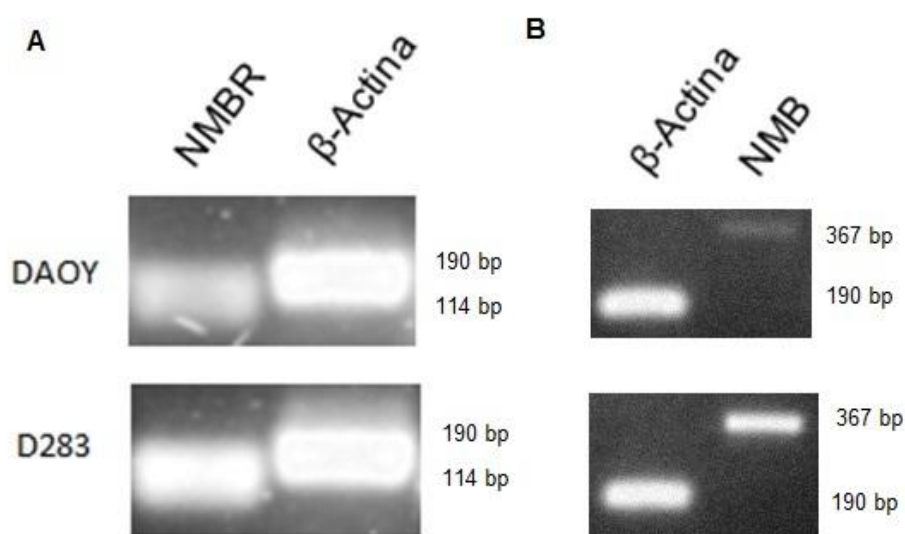


Fig.7: Análise de RT-PCR de mRNA de NMBR e de NMB em linhagem de meduloblastoma humano. RNA total foi extraído das células Daoy e D283 e análise de RT-PCR foi realizada. Os fragmentos esperados foram 114 bp para NMBR (A) e de 367 bp para NMB (B) . A expressão do gene codificador da β -actina, fragmento de 190 bp, foi utilizado como controle.

4.2 Tratamento com NMB exógena e BIM-23127 não altera a viabilidade celular de meduloblastoma

Para avaliar a possível influência do NMBR e de NMB sobre a proliferação celular, tratamentos com o agonista NMB e com o antagonista do receptor, BIM-23127, foram realizados. Ambos os tratamentos não afetaram a proliferação das células de meduloblastoma Daoy e D283 (Figura 8a, b).

4.3 Inibição de receptores similares à bombesina (BB1 e BB2) não altera viabilidade celular de meduloblastoma

Como NMB pode ativar o GRPR e esse receptor apresenta vias de sinalização em comum com NMBR (JENSEN *et al.*, 2008; UEHARA *et al.*, 2011), a influência do bloqueio concomitante desses dois receptores sobre a viabilidade celular foi investigada. O tratamento combinado de antagonista de NMBR, BIM-23127, com o antagonista de GRPR, RC-3095, não afetou a viabilidade das células de meduloblastoma Daoy e D283 (Figura 9a, b).

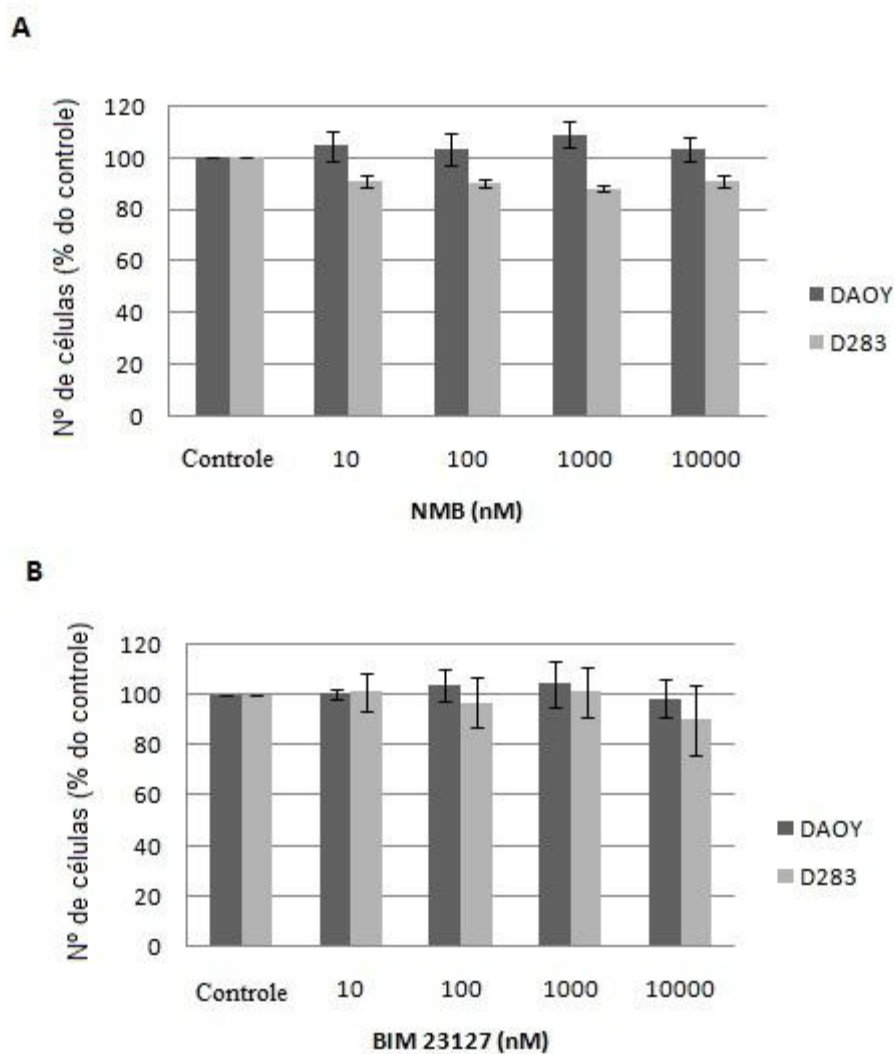


Fig. 8: Tratamentos por 48 h com agonista (NMB) e antagonista (BIM-23127) do NMBR não influenciam a viabilidade celular de linhagens de meduloblastoma. Dados são expressos como média \pm desvio padrão da média da porcentagem do número de células encontradas após 48 h de tratamento com (A) NMB ou com (B) BIM-23127 comparado com o número de células encontradas no meio sem tratamento e com 10% de SFB (controle), o qual foi aceito como 100%; n= 3 repetições.

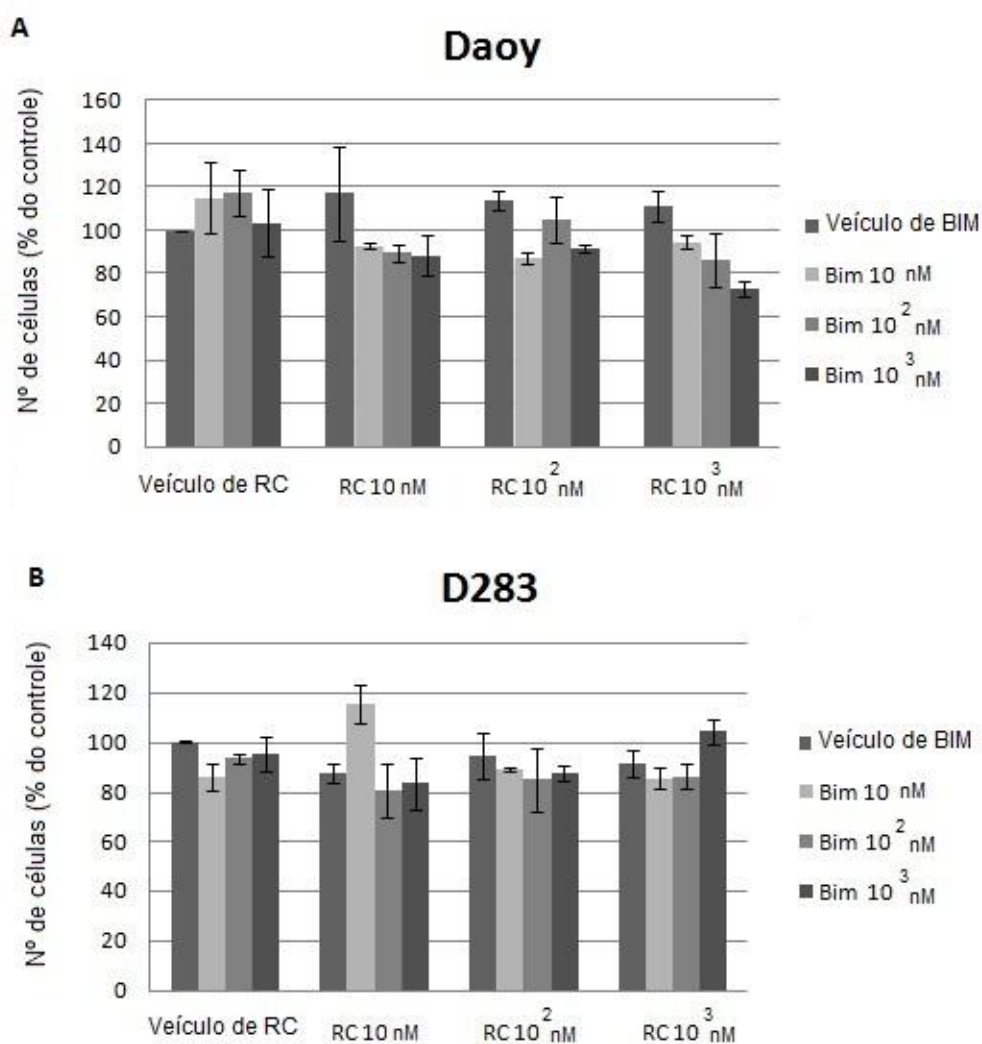


Fig. 9: Tratamentos combinados de antagonista de NMBR (BIM-23127) e antagonista de GRPR (RC-3095) por 48 h não influenciam a viabilidade celular de linhagens de meduloblastoma. Dados são expressos como média±desvio padrão da média da porcentagem do número de células (a) Daoy e (b) D283 encontradas após 48 h de tratamento combinado dos antagonistas comparado com o número de células encontradas no meio sem tratamento e com 10% de SFB (controle), o qual foi aceito como 100%; n= 3 repetições.

4.4 Meduloblastoma expressa mRNA de EGFR

A análise de RT-PCR demonstrou que as células Daoy e D283 expressam mRNA de EGFR. A amplificação com *primers* específicos para EGFR gerou produtos com os tamanhos esperado de 190 bp em todas as amostras (Figura 10).

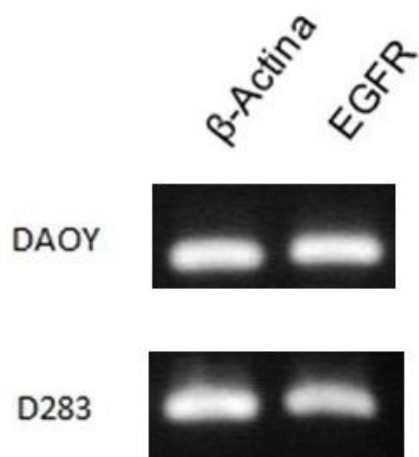


Fig. 10: Análise de RT-PCR de mRNA de EGFR em linhagem de meduloblastoma humano. RNA total foi extraído das células Daoy e D283 e análise de RT-PCR foi realizada. O fragmento esperado foi de 190 bp para EGFR. A expressão de β -actina, fragmento de 190 bp, foi utilizada como controle.

4.5 Viabilidade de Daoy, mas não de D283, é afetada pela inibição de EGFR

Para avaliar a possível influência do EGFR sobre a proliferação celular, tratamento com o anticorpo anti-EGFR foi realizado. O tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ de cetuximabe por 48 h reduziu a viabilidade da linhagem celular Daoy ($p < 0,05$ comparado às células controle), enquanto que a mesma dose não foi capaz de alterar a proliferação da linhagem D283 (Figura 11).

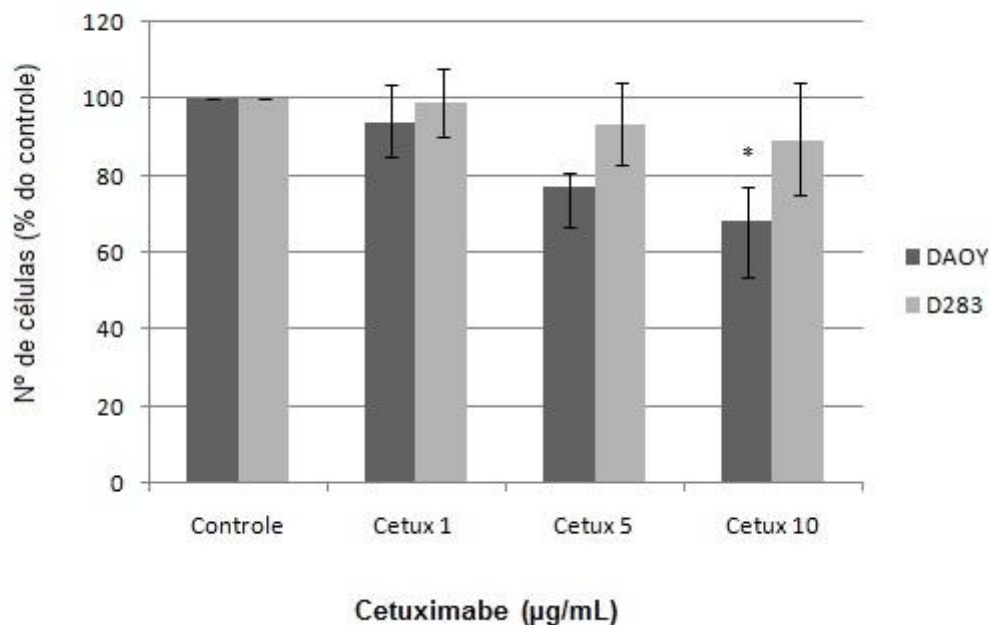


Fig. 11: Tratamento com anticorpo anti-EGFR (cetuximabe) reduz a viabilidade da linhagem celular de meduloblastoma humano Daoy. Tratamento de 48 h com cetuximabe (10 µg/mL) é capaz de reduzir a viabilidade celular de Daoy, mas não de D238. Dados são expressos como média±desvio padrão da média da porcentagem do número de células encontradas após o tratamento com cetuximabe comparado com o número de células encontradas no meio sem tratamento e com 10% de SFB (controle), o qual foi aceito como 100%; *p<0,05 comparado ao controle. Cetux=cetuximabe.

4.6 NMB pode influenciar a atividade de EGFR

Para verificar se NMBR poderia estar influenciando na viabilidade celular de Daoy pela modulação de EGFR, tratamento combinado de antagonistas desses receptores, BIM-23127 para NMBR e cetuximabe para EGFR, foi realizado. O tratamento combinado de cetuximabe a 1µg/mL com o inibidor de NMBR (10^2 - 10^3 nM) diminuiu significativamente (p<0,05) a viabilidade celular quando comparado as células controle. Esse efeito combinado é comparável ao encontrado com dose de cetuximabe de 10µg/mL, sendo que,

nessa dose mais alta, a inibição de NMBR não influenciou a atividade de cetuximabe (Figura 12).

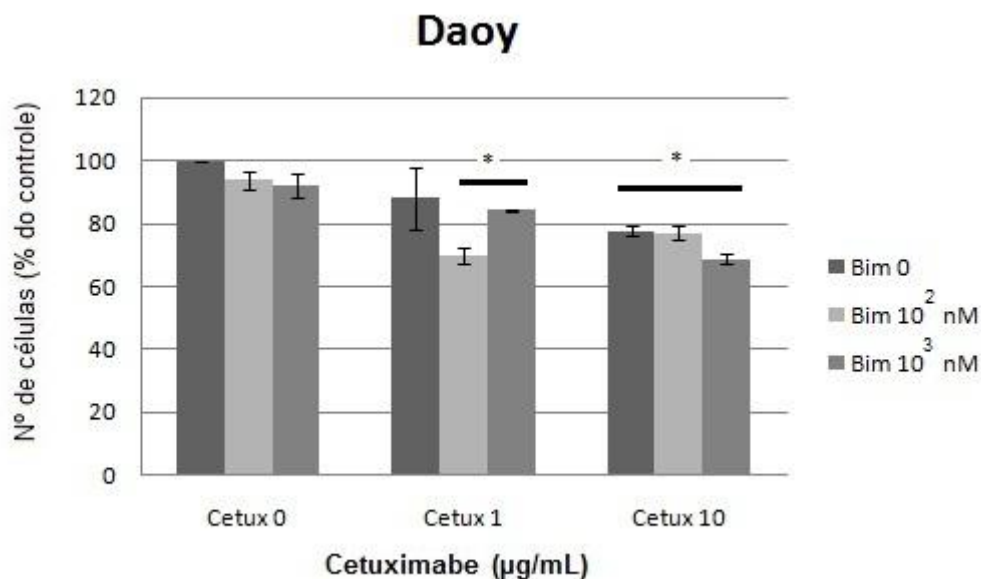


Fig. 12: Influência da inibição de NMBR sobre a diminuição da viabilidade de células Daoy causada por cetuximabe. Quando combinado com inibidor de NMBR, BIM-23127 (10^2 - 10^3 nM), cetuximabe a $1\mu\text{g/mL}$ é capaz de diminuir a viabilidade de células Daoy. Dados são expressos como média±desvio padrão da média da porcentagem do número de células encontradas após 48 h de tratamento com cetuximabe comparado com o número de células encontradas no meio sem tratamento e com 10% SFB (controle), o qual foi aceito como 100%; * $p < 0,05$ comparado ao controle. Cetux=cetuximabe.

5. Discussão

Meduloblastoma é um tumor do SNC que normalmente surge no cerebelo e que tem sido associado a alterações no desenvolvimento dessa estrutura (GILBERTSON & ELLISON, 2008; ROUSSEL & HATTEN, 2011). A expressão da família de receptores da bombesina tem sido estudada no desenvolvimento do cerebelo. Iwabuchi *et al.* (2006) caracterizaram a expressão de NMBR na embriogênese de cerebelo de camundongos e demonstraram que a presença desse receptor diminui gradativamente com o passar do desenvolvimento (IWABUCHI *et al.*, 2006). Assim, a expressão de mRNA de NMBR em meduloblastoma, demonstrado nesse estudo, pode indicar a manutenção do estado indiferenciado das células deste tumor.

Além de meduloblastoma, outros tumores do SNC como gliomas também possuem NMBR. Moody *et al.* (2000) mostraram que, em linhagem de glioma C6, a inibição desse receptor diminui a proliferação celular, indicando que peptídeos similares a bombesina, capazes de ativar NMBR, podem agir como fatores de crescimento tumoral (MOODY *et al.*, 1995; 2000).

No presente estudo, a detecção de mRNA de NMB foi confirmada em células de meduloblastoma. A presença desse peptídeo foi detectada em tecido gastrointestinal, medula espinal, glândula pituitária, em várias áreas do SNC, durante o desenvolvimento pulmonar, além de presente em diversos tumores como câncer de pulmão e de cólon (CARDONA *et al.*, 1991; GIACCONE *et al.*, 1992; SPINDEL, 1996; CHAVE *et al.*, 2000; OHKI-HAMAZAKI, 2000). No cerebelo, local de origem do meduloblastoma, NMB é

detectada em baixos níveis (OHKI-HAMAZAKI, 2000). Essas evidências indicam que esse peptídeo tem um papel fisiológico em vários tecidos não neoplásicos e que sua relação com o desenvolvimento tumoral pode envolver a desregulação na expressão ou na liberação de NMB.

Assim como em meduloblastoma, a coexpressão de NMB e NMBR ocorre em outros tumores. Matusiak e colaboradores (2005) detectaram a coexpressão de NMB e NMBR em câncer de cólon e sugeriram o envolvimento dessa interação em uma via de sinalização autócrina no crescimento desses tumores (MATUSIAK *et al.*, 2005). Embora as células de meduloblastoma analisadas neste estudo coexpresssem NMBR e NMB, o envolvimento desta interação no crescimento e manutenção celular não foi confirmada. Assim como NMBR, outro receptor da família da bombesina está presente em células de meduloblastoma. No estudo referido, Schmidt e colaboradores (2010) demonstraram que linhagens de meduloblastoma expressam GRPR, mas a ativação ou inibição desse receptor não afetou a proliferação celular (SCHIMIDT *et al.*, 2010).

NMBR e GRPR possuem mecanismos de transdução de sinal semelhantes e um mecanismo compensatório poderia estar ocorrendo no nosso estudo (JENSEN *et al.*, 2008; UEHARA *et al.*, 2011). Esse mecanismo não parece ocorrer, uma vez que o tratamento concomitante com antagonistas desses receptores não afetou o crescimento de meduloblastoma.

Uma possível explicação para a falta de efeito dos ligantes de receptores da família da bombesina em meduloblastoma poderia ser que, nesse tumor, peptídeos similares bombesina agem regulando a diferenciação, não sendo essenciais para a proliferação celular. Esta hipótese tem sido proposta por outros autores (GLOVER *et al.*, 2005;

SCHIMIDT *et al.*, 2010). Além da diferenciação, a influência de NMB e seu receptor em outros processos importantes para a manutenção e progressão de meduloblastoma precisam ser investigados.

De acordo com este trabalho, células de meduloblastoma provavelmente apresentam uma ativação de NMBR, uma vez que expressam o seu ligante. Apesar de não influenciar diretamente na viabilidade celular desse câncer, ativação de NMBR tem a capacidade de modular a atividade de EGFR (MOODY *et al.*, 2010), o que poderia afetar a proliferação tumoral.

EGFR, assim como os outros receptores da família ErbB, tem sido associado com a proliferação de neoplasias e a sua superexpressão é frequentemente associada com um imunofenótipo mais agressivo em tumores do SNC (BODEY *et al.*, 2005). Nesse estudo, demonstramos que mRNA de EGFR está presente nas linhagens Daoy e D283 de meduloblastoma humano, mas apenas a viabilidade da linhagem Daoy é afetada pela inibição de EGFR.

A expressão de receptores da família ErbB tem sido estudada no desenvolvimento do cerebelo e em biópsias de meduloblastoma (GILBERTSON *et al.*, 1998). Gilbertson e colaboradores (1998) demonstraram que o mRNA de EGFR está presente em tumores primários e que, no tecido cerebelar normal, EGFR, assim como outros receptores ErbB, apresentam expressão temporal e topograficamente específica. De acordo com os autores, estudos de expressão de EGFR em cerebelo, tanto de humano como de roedores, sustentam a hipótese de que EGFR tem um importante papel nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebelar (GILBERTSON *et al.*, 1998). Cada vez mais o meduloblastoma tem sido considerado uma doença causada por anormalidades no desenvolvimento do cerebelo

(BARYAWNO *et al.*, 2010; ROUSSEL & HATTEN, 2011) e, de acordo com os resultados apresentados neste trabalho, a desregulação da ativação de EGFR pode estar envolvida em uma dessas alterações.

Assim como em meduloblastoma, a expressão de EGFR ocorre em linhagens celulares e em tumores primários de neuroblastoma, um tumor sólido infantil derivado da crista neural. Nesses tumores, a via de sinalização ativada por EGFR tem um papel importante no crescimento/proliferação celular, uma vez que a inibição desse receptor foi capaz de diminuir o crescimento tumoral. PI3K/AKT tem sido a via proposta como responsável por esse efeito (HO *et al.*, 2005). A via de sinalização responsável pelo efeito da inibição de EGFR sobre a viabilidade celular de meduloblastoma não foi investigada neste trabalho, mas, assim como em neuroblastoma, pode ser relacionada a ativação de PI3K/AKT, uma vez que essa via está superativada em diversos tumores (VIVANCO & SAWYERS, 2002; GUESSOUS *et al.*, 2008).

A diferença nos efeitos da inibição de EGFR entre as linhagens Daoy e D283 observada no presente estudo pode estar relacionada às diferenças fenotípicas entre as linhagens. Apesar de o RNA mensageiro para EGFR ter sido detectado nas duas linhagens nesse trabalho, estudo anterior utilizando anticorpo monoclonal contra EGFR detectou o receptor apenas na linhagem Daoy, o que explicaria a resposta dessa linhagem a cetuximabe (PEYRL *et al.*, 2003; NÖR *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, a ativação de NMBR pode influenciar a atividade de EGFR por um mecanismo denominado de transativação. Nesse trabalho, uma pequena, mas existente influência de NMBR sobre EGFR foi verificada, uma vez que a

dose não efetiva do inibidor de EGFR (cetuximabe) foi capaz de diminuir a viabilidade celular quando combinada com o inibidor de NMBR BIM23-127.

Receptores ligados à proteína G (GPCR) podem utilizar receptores do tipo tirosina-quinase (EGFR, por exemplo) como uma proteína intermediária sinalizadora, resultando no mimetismo da sinalização e das vias intracelulares desse receptor (HYNES & LANE, 2005). Esse mecanismo denominado como transativação já foi descrito ocorrer após a ativação de receptores para adenosina, angiotensina II, bradicinina, endotelina, gastrina, peptídeo liberador de gastrina, neuromedina, neurotensina, prostaglandinas, entre outros GPCRs (SCHAFER *et al.*, 2004; CHENG-HSIEN *et al.*, 2006). O mecanismo que permite que esses receptores interfiram na ativação de EGFR, por exemplo, incluem a ativação de numerosas cascatas de sinalização como PKC, MAPK e PI3K/Akt (JENSEN & MOODY, 2006).

A transativação de EGFR por ativação de GRPR, um receptor de peptídeos similares a bombesina, ocorre em um número de células de tumores de cabeça e pescoço, pulmão e próstata (ZHANG *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007). Nessas células, a transativação de EGFR parece ser essencial para a estimulação da proliferação (JENSEN *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004). Em meduloblastoma, a transativação de EGFR por receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) parece influenciar na capacidade de migração e de invasão (ABOANTOUN & MACDONALD, 2009).

A transativação de EGFR por NMBR proposta por este trabalho já foi demonstrada ocorrer em células de câncer de pulmão. NMBR foi capaz de regular a fosforilação de EGFR em células de câncer de pulmão de não pequenas células por meio de cascatas de

sinalização envolvendo proteínas Src, metaloproteases de matriz e geração de espécies reativas de oxigênio (MOODY *et al.*, 2010).

No nosso estudo, os mecanismos responsáveis pela transativação de EGFR não foram avaliados. Porém, possivelmente incluem uma ou mais vias já descritas nesse processo: ativação de metaloproteases com liberação de moléculas similares a EGF; ativação de mensageiros secundários como PKC, Ca^{2+} intracelular ou espécies reativas de oxigênio; ativação de receptores intracelulares não pertencentes a classe de tirosina-quinases, como a família de cinases Src; e inativação de tirosina fosfatases (CHENG-HSIEN *et al.*, 2006).

A transativação de EGFR é um processo complexo que pode envolver uma diversidade de sinalizações intracelulares. Neste trabalho, avaliamos a influência da ativação de EGFR e sua transativação por NMBR apenas em 48 h, sendo que tempos mais longos de exposição aos tratamentos, como utilizados em outros estudos, poderiam causar um efeito na viabilidade. Assim, mais trabalhos avaliando as vias envolvidas e a influência da ativação direta ou indireta (transativação) de EGFR sobre meduloblastoma são necessários.

6. Conclusões

O presente estudo permitiu demonstrar a presença de mRNA de NMBR e NMB em linhagens celulares de meduloblastoma. Embora os resultados indiquem que os receptores similares à bombesina, NMBR e GRPR, não influenciam diretamente na proliferação de células de meduloblastoma, NMBR pode estar envolvido na transativação de outros receptores, como EGFR. Nosso estudo demonstrou que EGFR influencia a viabilidade de células de meduloblastoma humano Daoy. Além disso, resultados preliminares desse trabalho mostram que NMBR pode afetar a ação de EGFR e, assim, influenciar na proliferação de células de meduloblastoma humano. Devido a isso, será importante que estudos futuros sejam desenvolvidos para determinar a relação da transativação de EGFR por NMBR e a influência desse mecanismo na progressão e manutenção de meduloblastoma.

7.Referências Bibliográficas

- AARONSON, S. A. Growth factors and cancer. *Science*, 254: 1146-1153, 1991.
- ABOUNTOUN, T. J. & MACDONALD T. J. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther.*, 8(5):1137-47, 2009.
- ANASTASI, A.; ERSPAMER, V. & BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*, 27: 166-167, 1971.
- BARYAWNO, N.; SVEINBJORNSSON, B.; KOGNER, P. & JOHNSEN, J. I. Medulloblastoma: A disease with disorganized developmental signaling cascades. *Cell Cycle*, 9(13):2548-2554.
- BODEY, B.; KAISER, H. E. & SIEGEL, S. E. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression in Childhood Brain Tumors. *In vivo.*,19:931-942, 2005.
- CARLOTTI, C. G.; SMITH, C. & RUTKA, J.T. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev.*, 31:359–369, 2008.
- CARDONA, C.; RABBITTS, P. H.; SPINDEL, E. R.; GHATEI, M. A.; BLEEHEN, N. M.; BLOOM, S. R. & REEVE, J. G. Production of neutromedin B and Neutromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res.*, 51:5205–5211, 1991.
- CHAVE, H. S.; GOUGH, A. C.; PALMER, K.; PRESTON, S. R. & PRIMROSE, J. N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer.*, 82:124–130, 2000.
- CHAKRAVARTI, A.; DICKER, A. & MEHTA M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 58: 927-931, 2004.

CHENG-HSIEN, C.; YUNG-HO, H.; YUH-MOU, S.; CHUN-CHENG, H.; HORNG-MO, L.; HUEI-MEI, H. & TSO-HSIAO, C. Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase regulates endothelin-1-induced epidermal growth factor receptor transactivation in rat renal tubular cell NRK-52E. *Pflugers Arch.* 452, 16–24. 2006.

CORJAY, M. H.; DOBRZANSKI, D. J.; WAY, J. M.; VIALLET, J.; SHAPIRA, H.; WORLAND, P.; SAUSVILLE, E. A. & BATTEY, J. F. Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem.*, 266:18771–18779, 1991.

CUTTITTA, F.; CARNEY, D. N.; MULSHINE, J.; MOODY, T.W.; FEDORKO, J.; FISCHLER, A. & MINNA, J. D. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer cells. *Nature*, 316: 823-826, 1985.

DAMJANOV, I.; MILDNER, B. & KNOWLESS, B. B. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab Invest.*, 55: 588-592, 1986.

DEMICHELE, M. A.; DAVIS, A. L.; HUNT, J. D.; LANDRENEAU, R. J. & SIEGFRIED, J. M. Expression of mRNA for Three Bombesin Receptor Subtypes in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 11: 66-74, 1994.

ELLISON, D.W.; CLIFFORD, S.C.; GAJJAR, A. & GILBERTSON, R. J. What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *Eur J Paediatr Neurol.*, 7: 53-66, 2003.

ERSPAMER, V.; ESRPAMER, G. F.; MAZZANTI, G. & ENDEAN, R. Active peptides in the skins of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. *Comp Biochem Physiol C*, 77: 99-108, 1984.

FARIAS, C. B.; LIMA, L. C.; LIMA, L. O., FLORES, D. G.; MEURER, L.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology*, 75:27–31, 2008.

FARIAS, C. B.; ROSEMBERG, D. B.; HEINEN, T. E.; KOEHLER-SANTOS, P.; ABUJAMRA, A. L.; KAPCZINSKI, F.; BRUNETTO, A. L.; ASHTON-PROLLA, P.; MEURER, L.; REIS BOGO, M.; DAMIN, D. C.; SCHWARTSMANN, G. & ROESLER, R. BDNF/TrkB Content and Interaction with Gastrin-Releasing Peptide Receptor Blockade in Colorectal Cancer. *Oncology*, 79:430-439, 2010.

FARIAS, C. B. Bdnf/trkb em câncer colorretal: interações funcionais com GRPR E EGF. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FLORES, D. G.; FARIAS, C. B.; LEITES, J.; DE OLIVEIRA, M. S.; LIMA, R. C.; TAMAJUSUKU, A. S.; DI LEONE, L. P.; MEURER, L.; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; LENZ, G. & ROESLER, R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Cur. Neurovasc. Res.*, 5(2):99–105, 2008.

FULLER, G. N. & SCHEITHAUER, B. W. Symposium: The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: Newly Codified Entities. *Brain Pathol.*, 17 (3): 304-307, 2007.

GAJJAR, A.; PACKER, R. J.; FOREMAN, N. K.; COHEN, K.; HAAS-KOGAN, D. & MERCHANT, T. E. Children's Oncology Group's Blueprint for Research: Central Nervous System Tumors. *Pediatr. Blood. Cancer*. [Epub ahead of print] doi:10.1002/pbc.24427, 2012.

GESSI, M.; MADERNA, E.; GUZZETTI, Z.; CEFALO, G.; MASSIMINO, M.; SOLERO, C. L.; FINOCCHIARO, G.; POLLO, B. Radiation-induced glioblastoma in a medulloblastoma patient: a case report with molecular features. *Neuropathol.*, 28: 633-639, 2008.

GIACCONE, G.; BATTEY, G.; GAZDAR, A. F.; OIE, H.; DRAOUI, M. & MOODY, T. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52 (9 Suppl): 2732-2736, 1992.

GIANGASPERO, F.; WELLEK, S.; MASUOKA, J.; GESSI, M.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta Neurophatol.*, 112: 5-12, 2006.

GILBERTSON, R. J.; PERRY, R. H.; KELLY, P. J.; PEARSON, A. D. & LUNEC, J. Prognostic significance of HER2 and HER4 Coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.*, 57:3272-80, 1997.

GILBERTSON, R. J.; CLIFFORD, S. C.; MACMEEKIN, W.; WRIGHT, C.; PERRY, R. H.; KELLY, P.; PEARSON, A. D. J. & LUNEC, J. Expression of the ErbB-Neuregulin Signaling Network during Human Cerebellar Development: Implications for the Biology of Medulloblastoma. *Cancer Res.*, 58:3932-3941, 1998.

GILBERTSON, R. J.; BENTLEY, L.; HERNAN, R.; JUNTILA, T. T.; FRANK, A. J.; HAAPASALO, H.; CONNELLY, M.; WETMORE, C.; CURRAN, T.; ELENIUS, K. & ELLISON, D. W. ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease. *Clin Cancer Res.*; 8(10):3054-64, 2002.

GILBERTSON, R. J. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol.*, 5:209-218, 2004.

GILBERTSON, R. J. & ELLISON, D.W. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3: 341-365, 2008.

GUESSOUS, F.; LI, Y.; ABOUNADER, R. Signaling Pathways in Medulloblastoma. *J. Cell. Physiol.*, 217: 577-583, 2008.

GLOVER, S.; NATHANIEL, R.; SHAKIR, L.; PERRAULT, C.; ANDERSON, R. K.; TRAN-SON-TAY, R. & BENYA, R.V. Transient upregulation of GRP and its receptor critically regulate colon cancer cell motility during remodeling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 288(6):1274-1282, 2005.

GONZALEZ, N.; MODDDY, T. W.; IGARASHI, H.; ITO, T.; JENSEN, R.T. Bombesin-Related Peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, 15:58-64, 2008

HATTEN, M. E. & ROUSSEL, M. F. Development and Cancer of the Cerebellum. *Trends Neurosci.*, 34(3):134-142, 2011

HENSON, E. S.; GIBSON, S. B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cell Signal.*, 18:2089–2097, 2006.

HEROLD, C. L.; BEHM, D. J.; BUCKLEY, P. T.; FOLEY, J. J.; WIXTED, W. E.; SARAU, H. M.; DOUGLAS, S. A. The neuromedin B receptor antagonist, BIM-23127, is a potent antagonist at human and rat urotensin-II receptors. *Br J Pharmacol.*, 139:203-207, 2003.

HSIEH, M. & CONTI, M. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine system. *Trends Endocrinol Metab.*, 16(7): 320-326, 2005.

HO, R.; MINTURN, J. E.; HISHIKI, T.; ZHAO, H.; WANG, Q.; CNAAN, A.; MARIS, J.; EVANS, A. E. & BRODEUR, G. M. Proliferation of Human Neuroblastomas Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res.*, 65:9868-9875, 2005.

HUSE, J. T. & HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.*, 10: 319-331, 2010.

HYNES, N. E. & LANE, H. A. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.*, 5:341-356, 2005.

HYNES, N. E. & MACDONALD, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 21:177-184, 2009.

IWABUCHI, M.; MAEKAWA, F.; TANAKA, K. & OHKI-HAMAZAKI, H. Overexpression of Gastrin-releasing Peptide Receptor Induced Layer Disorganization in Brain. *Neuroscience.* 138: 109-122, 2006.

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

JENSEN, R. T. & MOODY, T. W. Bombesin-related peptides and neurotensin: effects on cancer growth/proliferation and cellular signaling in cancer. In: Kastin, A. (Ed.) *Handbook of Biologically Active Peptides.*, Elsevier, Amsterdam, pp. 429-434, 2006.

JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; SPINDEL, E. R.; BENYA, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol Rev.*, 60:1-42, 2008.

JIAN, X.; SAINZ, E.; CLARK, W. A.; JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; NORTHUP, J. K. The bombesin receptor subtypes have distinct G protein Specificities. *J Biol Chem.*, 274(17):11573-11581, 1999.

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

LIBMANN, C. EGF receptor activation by GPCRs: a universal pathway reveal different versions. *Mol Cell Endocrinol.*, 331:222-231, 2011.

LIU, X.; CARLISLE, D. L.; SWICK, M. C.; GAITHER-DAVIS, A.; GRANDIS, J. R. & SIEGFRIED, J. M. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp. Cell Res.*, 313:1361–1372, 2007.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neurophatol.*, 114: 97-109, 2007.

MARINO, S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med*, 11(1): 17-22, 2005.

MATUSIAK, D.; GLOVER, S.; NATHANIEL R.; MATKOWSKYJ, K.; YANG, J. & BENYA, R. V. Neuromedin B and its receptor are mitogens in both normal and malignant epithelial cells lining the colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 288:G718–G728, 2005.

MCDONALD, T. J.; JORNVALL, H.; NILSSON, G.; VAGNE, M.; GHATEI, M.; BLOOM, S.R.; MUTT, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun.*,12: 227-233, 1979.

MENDELSON, J.& BASELGA, J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.*,33:369–385, 2006.

MINAMINO, N.; KANGAWA, K. & MATSUO, H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.*, 114: 541-548, 1983.

MINAMINO, N.; SUDOH, T.; KANGAWA, K. & MATSUO, H. Neuromedin B-32 and B-30: Two “Big” Neuromedin B Identified in Porcine Brain and Spinal Cord. *Biochem Biophys Res Commun.*, 130: 685-691,1985.

MISCHEL, P. S. & CLOUGHESY, T. F. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol.*, 13:52–61, 2003.

MOODY, T. W.; FAGARASAN, M. & ZIA, F. Neuromedin B Stimulates Arachidonic Acid Release, c-Fos Gene Expression, and the Growth of C6 Glioma Cells. *Peptides*, 16: 1133-1140, 1995.

MOODY, T. W.; JENSEN, R. T.; GARCIA, L. & LEYTON, J. Nonpeptide neuromedin B receptor antagonists inhibit the proliferation of C6 cells. *Europ J Pharmacol.*, 409: 133-142, 2000.

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

MUKOHARA, T.; KUDOH, S.; YAMAUCHI, S.; KIMURA, T.; YOSHIMURA, N.; KANAZAWA, H.; HIRATA, K.; WANIBUCHI, H.; FUKUSHIMA, S.; INOUE, K. & YOSHIKAWA, J. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 41(2):123-130, 2003.

MUTTI, C. F.; PAULA, C. C. & SOUTO, M. D. Assistência à Saúde da Criança com Câncer na Produção Científica Brasileira. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 56(1): 71-83, 2010.

NÖR, C.; FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L. & ROESLER, R. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of Daoy human medulloblastoma cells. *Childs Nerv Syst.*, 27: 897-901, 2011.

NORTHCOTT, P. A.; JONES, D. T. W.; KOOL, M.; ROBINSON, G.W.; GILBERTSON, R. J.; CO, Y; POMEROY, S. L.; KORSHUNOV, A.; LICHTER, P.; TAYLOR, M. D.; PFISTER, S. M. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer.*, 12:818-834, 2012.

OHKI-HAMAZAKI H. Neuromedin B. *Prog Neurobiol*, 62: 297-312, 2000.

OHKI-HAMAZAKI, H.; IWABUCHI, M. & MAEKAWA, F. Development and Function of Bombesin-Like Peptides and Their Receptors. *Int J Dev Biol.*, 49: 293-300, 2005.

ORBUCH, M.; TAYLOR, J. E.; COY, D. H.; MROZINSKI, J. E.; MANTEY, S. A.; BATTEY, J. F.; MOREAU, J. & JENSEN, R. T. Discovery of a Novel Class of Neuromedin B Receptor Antagonists, Substituted Somatostatin Analogues. *Mol. Pharmacol.*, 4: 841-850, 1993.

PACKER, R. J.; GOLDWEIN, J.; NICHOLSON, H. S.; VEZINA, L.G.; ALLEN, J. C.; RIS, M. D.; MURASZCO, K.; RORKE, L. B.; WARA, W. N.; COHEN, B. H. & BOYETT, J. M. Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: a children's cancer group study. *J Clin. Oncol.*, 17: 2127-2136, 1999.

PALMER, S. L.; REDDICK, W. E. & GAJJAR, A. Understanding the cognitive impact on children who are treated for medulloblastoma. *J Pediatr Psychol.*, 32: 1040-1049, 2007.

PATEL, O.; SHULKS, A. & BALDWIN, G. S. Gastrin-Releasing Peptide and Cancer. *Biochem Biophys Acta.*, 1766: 23-41, 2006.

PEREZ-MARTINEZ, A.; LASSALETTA, A.; GONZALEZ-VICENT, M.; SEVILLA, J.; DIAZ, M. A. & MADERO, L. High-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue for children with high risk and recurrent medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors. *J Neurooncol.*, 71: 33-38, 2005.

PEYRL, A.; KRAPFENBAUER, K.; SLAVC, I.; YANG, J.; STROBEL, T. & LUBEC, G. Protein profiles of medulloblastoma cell lines DAOY and D283: Identification of tumor-related proteins and principles. *Proteomics*, 3:1781–1800, 2003.

RIS, M. D.; PACKER, R.; GOLDWEIN, J.; JONES-WALLACE, D. & BOYETT, J. M. Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.*, 19: 3470-3476, 2001.

ROSEMBERG, S. & FUJIWARA, D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 200 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst.*, 21(11):940-944, 2005.

ROSSI, A.; CARACCILO, V.; RUSSO, G.; REISS, K. & GIORDANO, A. Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. *Clin Cancer Res.*, 14(4): 971-976, 2008.

ROUSSEL, M. F. & HATTEN, M. E. Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol.*, 94:235-82, 2011.

SANO, H.; FEIGHNER, S. D.; HRENIUK, D. L.; IWAASA, H.; SAILER, A. W.; PAN, J.; REITMAN, M. L.; KANATANI, A.; HOWARD, A. D. & TAN, C. P. Characterization of the Bombesin-Like Peptide receptor Family in Primates. *Genomics*, 84: 139-146, 2004.

SCHAFFER, B.; GSCHWIND, A. & ULLRICH, A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*, 23:991–999, 2004.

SCHALLY, A. V.; COMARU-SCHALLY, A. M.; PLONOWSKI, A.; NAGY, A.; HALMOS, G. & REKASI, Z. Peptide analogs in the therapy of prostate cancer. *Prostate*, 45: 158-166, 2000.

SCHIMIDT, A.L.; FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; KAPCZINSKI, F.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L. & ROESLER, R. BDNF and PDE4, but not the GRPR, Regulate Viability of Human Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci.*, 40:303-310, 2010.

SERAFIM, A.; VILANOVA, L. C. D. & SILVA, S. N. Neurological evaluation of children and adolescents with brain tumor, based on ambulatory-oriented follow-up. *Arq Neuropsiquit.*, 59(4):849-53, 2001.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, 62:10-29, 2012.

SPINDEL, E. R. Roles of bombesin-like peptides in lung development and lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 14:407-40, 1996.

SOLOMON, D. S.; BRANDT, R.; CIARDIELLO, F. & NORMANNO, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19: 183-232, 1995.

SUMER-TARANHGIL, N. C.; CETIN, E. O. & UYAMKGIL, Y. A contemporary review of molecular candidates for the development and treatment of childhood medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.*, 29(3):381-388, 2013.

SZEPESHAZI, K; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G.; LAMHARZI, N.; GROOT, K.; HORVATH, J. E. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptor in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 94:10913- 10918, 1997.

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. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.*, 123:465-472, 2012.

TORRES, L.F.; JACOB, G. V.; REIS-FILHO, J. S. & DE NORONHA, L. Primary pediatric tumours of central nervous system: anatomopathology study of 623 cases. *Arq Neuropsiquiatr.*, 55(4):795-800, 1997.

TOSCHI, L. & CAPPUZZO F. Understanding the new genetics of responsiveness to Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitors. *The Oncologist.*, 12: 211-220, 2007.

UEHARA, H.; GONZÁLEZ, N.; SANCHO,V.; MANTEY, S. A.; NUCHEBERENGUER, B.; PRADHAN, T.; COY, D. H. & JENSEN, R. T. Pharmacology and selectivity of various natural and synthetic bombesin related peptide agonists for human and rat bombesin receptors differs. *Peptides*, 32:1685-1699, 2011.

VIVANCO, I. & SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol-3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.*, 2:489-501, 2002.

WELLS, A. EGF receptor. *The Int J Biochem Cell Biol.*, 31(6):637-643, 1999.

XIAO, D.; QU, X. & WEBER, H.C. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. *Cell Signal.*, 15:945–953, 2003.

YARDEN, Y. & PINES, G. The ERBB network: at last, cancer therapy meet system biology. *Nat Rev Cancer*, 12:553-563, 2012.

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

CURRICULUM VITÆ**JAEGER, M.****1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Mariane da Cunha Jaeger

Nascida em Porto Alegre, RS, Brasil, em 11 de agosto de 1988.

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

Telefone profissional: (51) 33597616 **E-mail:** mariane_jaeger@hotmail.com

2. FORMAÇÃO: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3. ESTÁGIOS:

Julho/2007 – Dezembro/2007: Estágio Voluntário

Estágio voluntário realizado no Laboratório de Histofisiologia Comparada, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Prof. Dr. Matilde Achaval Elena.

ATIVIDADES: Participação em dois projetos de mestrado: Efeitos do exercício físico sobre a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e comportamento motor de ratos submetidos ao modelo de doença Parkinson induzida por 6-OHDA, sob responsabilidade de Márcio Dutra; e Dor neuropática induzida: efeito da natação sobre a alodinia mecânica, serotonina e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) no corno dorsal da medula espinal de ratos, sob responsabilidade de Gisele Lovatel.

Os projetos envolveram procedimentos como: cuidado e manuseio de animais de experimentação (ratos), cirurgia esteriotóxica, treinamento em esteira ou aquático de ratos, técnicas histoquímicas.

Dezembro/2007 – Julho/2009: Bolsista de Iniciação Científica

Bolsista PIBIC/CNPq UFRGS de Iniciação Científica no Laboratório de Histofisiologia Comparada do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Prof. Dr. Matilde Achaval Elena.

ATIVIDADES: Participação nas linhas de pesquisas: Transplante de células gliais embainhantes olfatórias e estimulação locomotora após transecção medular em ratos: efeitos sobre a regeneração neuronal e recuperação funcional; e Efeitos da estimulação locomotora sobre a recuperação funcional e regeneração neural em ratos com transecção da medula espinal submetidos ao transplante espinal de células gliais embainhantes olfatórias, sob responsabilidade dos então doutorandos Lígia Aline Centenaro e Jocemar Ilha.

Os projetos envolveram procedimentos como: cirurgia e cuidados de animais após transecção medular, cultivo primário de células gliais, avaliação de funções reflexas, técnicas histoquímicas.

Dezembro/2009 – Agosto/2010: Estágio Curricular I – TCC

Estágio realizado no Laboratório de Pesquisas em Câncer, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob orientação do Prof. Dr. Rafael Roesler.

ATIVIDADES: Participação no projeto intitulado: Papel de Receptores de Neuropeptídeos e Vias de Sinalização Envolvidas no Crescimento de Meduloblastomas.

Atividades: Realização do Trabalho de Conclusão de Curso, realizando a caracterização da expressão de NMBR e seu papel na proliferação celular em linhagens celulares de meduloblastomas.

Agosto/2010 – Janeiro/2011: Estágio Curricular II – Habilitação em Análises Clínicas

Estágio curricular realizado na Policlínica Militar de Porto Alegre, sob a orientação do TC Farm. Pedro L. Wieczorek.

ATIVIDADES: Acompanhamento e realização de procedimentos na área laboratorial, incluindo setores de coleta, bioquímica e imunologia, parasitologia e microbiologia e hematologia.

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. DUTRA, M. F.; **JAEGER, M. C.**; KALIL-GASPAR, P. I.; MARCUZZO, S.; ILHA, J. & ACHAVAL, M. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinsons disease. *Neurol Sci.* 33(5):1137-44, 2012.
2. CENTENARO, L. A.; **JAEGER M. C.**; ILHA, J.; DE SOUZA, M. A.; KALIL-GASPAR, P. I.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: effects on functional recovery and axonal regeneration. *Brain Res.*, 1426:54-72, 2011.
3. ILHA, J.; CENTENARO, L. A.; BROETTO, C.N.; DE SOUZA, D. F.; **JAEGER, M.**; DO NASCIMENTO, P. S.; KOLLING, J.; BEN, J.; MARCUZZO, S.; WYSE, A. T.; GOTTFRIED, C.; ACHAVAL, M. The beneficial effects of treadmill step training on activity-dependent synaptic and cellular plasticity markers after complete spinal cord injury. *Neurochem Res.*,36(6):1046-55, 2011.
4. ILHA, J.; DA CUNHA, N. B.; **JAEGER, M.**; DE SOUZA, D. F.; NASCIMENTO, P. S.; MARCUZZO, S.; FIGUEIRÓ, M.; GOTTFRIED, C.; ACHAVAL, M. Treadmill step training-induced adaptive muscular plasticity in a chronic paraplegia model. *Neurosci Lett.*, 492(3):170-4, 2011.

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. **JAEGER, M. C.**; ILHA, J.; MARCUZZO, S.; NASCIMENTO, P. S.; ABDALA, C. C.; GOTTFRIED, C.; ACHAVAL, M. Efeitos do treinamento de marcha em esteira sobre a atrofia muscular do sóleo em ratos com transecção da medula

- espinal In: XX Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre. Resumos do XX Salão de Iniciação Científica, 2008.
2. **LOVATEL, G.; MARCUZZO, S.; JAEGER, M. C.;** Ambrosi, P.; **ILHA, J.; KALIL-GASPAR, P. I.; ACHAVAL, M.** Natação diária durante 3 semanas produz analgesia opióide em ratos com dor muscular crônica In: I IBRO/LARC Congress Of Neurosciences Of Latin America, Caribbean And Iberian Peninsula, Búzios, Brasil, 2008.
 3. **JAEGER, M. C.; ILHA, J.; CENTENARO, L. A.; DE SOUZA, M. A.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M.** Transplante de células gliais embainhantes olfatórias em diferentes janelas terapêuticas em um modelo de lesão medular completa: resultados preliminares. In: XXI Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre. Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica, 2009.
 4. **JAEGER, M.; ACHAVAL, M.** Benefícios do treinamento locomotor na plasticidade neural dependente de uso em modelo de lesão medular completa. In: XXII Salão de Iniciação Científica, Porto Alegre. Resumos do XXII Salão de Iniciação Científica, 2010.
 5. **JAEGER, M.; NOR, C.; DE FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L.; ROESLER, R.** Expressão de neuromedina B e seu receptor em células de meduloblastoma humano. In: XII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, Curitiba, Brasil, 2010.
 6. **CENTENARO, L. A.; JAEGER, M.; ILHA, J.; DE SOUZA, M. A.; GASPAR, P. I.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M.** Olfactory and respiratory lamina propria transplantation on functional recovery and axonal regeneration of rats after spinal cord transection. In: XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, Brasil, 2011.
 7. **CENTENARO, L. A.; JAEGER, M.; ILHA, J.; DE SOUZA, M. A.; GASPAR, P. I.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M.** Olfactory and respiratory

- lamina propria transplantation after spinal Cord transection in rats: Effects on functional recovery and axonal regeneration. In: 8th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization, Florence, Italy, 2011.
8. CENTENARO, L. A.; SCHERER, J.; **JAEGER, M.**; ILHA, J.; DE SOUZA, M. A.; BALBINOT, L.; NASCIMENTO, P. S.; CUNHA, N. B.; MARCUZZO, S.; ACHAVAL, M. Hyperreflexia after complete spinal cord injury in rats: implications of the olfactory and respiratory lamina propria transplantation as a treatment strategy. In: VI Congreso Del CLA-IFCN, Punta Del Este, Uruguay, 2011.
 9. **JAEGER, M.**; NOR, C.; DE FARIAS, C. B.; ABUJAMRA, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; BRUNETTO, A. L.; ROESLER, R. Expression of neuromedin B and its agonist in human medulloblastoma. In: 10th International Congress on Cell Biology and XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, Rio de Janeiro, Brazil, 2012.