

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do efeito anti-proliferativo do antagonista do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095, e em associação com a temozolamida em modelos experimentais de gliomas.

Marianne Schrader de Oliveira

Orientador: Rafael Roesler

Co-orientador: Guido Lenz

Porto Alegre, agosto de 2008.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Avaliação do efeito anti-proliferativo do antagonista do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095, e em associação com a temozolamida em modelos experimentais de gliomas.

Marianne Schrader de Oliveira

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

Orientador: Rafael Roesler

Co-orientador: Guido Lenz

Porto Alegre, agosto de 2008.

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no laboratório de Pesquisa em Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em colaboração com o laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e com o laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa teve suporte financeiro pelo projeto do CNPq 400839/2005-9, pela South American Office for Anticancer Drug Development - SOAD - e pelo Instituto do Câncer Infantil – ICI. O RC-3095 foi gentilmente cedido pela Zentaris Ltda, Alemanha.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por colocar pessoas tão maravilhosas em meu caminho. Agradeço a oportunidade de realizar este estudo em um laboratório com pessoas muito dedicadas e inteligentes, sendo totalmente especiais. Principalmente agradeço ao meu orientador, Dr. Rafael Roesler que confiou e acreditou no meu trabalho, muito obrigada por tudo! Gostaria de agradecer às pessoas do Laboratório de Pesquisa em Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por todo o apoio e amizade, em especial, Caroline Farias, Ana Abujamra, Gustavo Reolon, Daniela Cornélio, Natasha Maurmann, Débora Flores e Luciana Lima.

Uma pessoa muito importante nesta minha formação foi o Dr. Guido Lenz que sempre me auxiliou em muitas realizações, muito obrigada por toda confiança, principalmente por me possibilitar trabalhar com uma pessoa tão especial como a Giovana Cechim, pois sem ela, certamente este trabalho não teria obtido todo o sucesso. Gostaria de agradecer também a Dra. Ana Maria Battastini que gentilmente abriu as portas do seu laboratório possibilitando experimentos. E especialmente gostaria de agradecer à Elizandra Braganhol por todo apoio.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Imunogenética, em especial, Nance Nardi, Kátia Kvido, Camila Ilgenfritz, Eduardo Ávila, Melissa Camassola e Daniel Santos por me mostrarem o caminho da pesquisa, fazendo com que eu viesse a apreciar tanto.

Aos colegas do laboratório Endocrimeta, em especial, Luciane Cerioli, Shisue Katagiri, Célia Martins e Lusía Leal pela ajuda e compreensão.

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos que me deram o importante apoio psicológico e emocional, em especial, Aldrey Bonassina, Vivian Zilberstein, Mauricio Maumahd, Karina Grigol, Anelise Vollkweiss e Danila Fossano. Principalmente gostaria de agradecer todo o apoio e amor de Thiago Dutra Rodrigues, muito obrigada.

Em especial, gostaria de agradecer aos meus pais, Cláudio Prestes de Oliveira e Gisela Schrader de Oliveira, por todo o apoio e carinho sempre. Sem vocês nada seria possível, muito obrigada por todo esforço para que eu seja uma pessoa melhor e possa fazer diferença na sociedade.

Índice

1 – Lista de Abreviaturas.....	7
2 – Resumo.....	8
3 – Abstract.....	9
4 – Introdução.....	10
5 – Objetivos.....	19
6 – Manuscrito.....	20
7 – Discussão.....	50
8 – Conclusão.....	57
9 – Apêndice I.....	58
10 – Referências Bibliográficas.....	61
11 – Curriculum.....	68

Lista de Abreviaturas

BB: *bombesin* / bombesina

EGF: *endothelial growth factor* / fator de crescimento endotelial

ERK: *extracellular signal-regulated protein kinase* / proteína quinase regulada por sinal extracelular.

GRP: *gastrin-releasing peptide* / peptídeo liberador de gastrina

GRPR: *gastrin-releasing peptide receptor* / receptor do peptídeo liberador de gastrina

Gq: proteína pertencente à família das proteínas G

MAPK: *mitogen-activated protein kinase* / proteína quinase ativada por mitógeno

NMB: *neuromedin B* / neuromedina B

NMBR: *neuromedin B receptor* / receptor de neuromedina B

NMDA: N-metil-D-aspartato

mRNA: *messenger ribonucleic acid* / ácido ribonucléico mensageiro

PKA: *protein kinase A* / proteína quinase A

PKC: *protein kinase C* / proteína quinase C

PLC: *phospholipase C* / fosfolipase C

RC-3095: [*D*-Tpi6, Leu13 psi(CH2NH)-Leu14] *bombesin* (6-14)

Resumo

Gliomas apresentam um prognóstico precário apesar das múltiplas modalidades terapêuticas como ressecção neurocirúrgica, radioterapia e quimioterapia, possivelmente pelo seu alto nível de invasividade e resistência aos tratamentos. Estudos recentes demonstraram que o peptídeo liberador de gastrina (GRP), assim como seu receptor, possui efeitos importantes no desenvolvimento de muitos tumores, inclusive de gliomas. O receptor de GRP está super expresso em linhagens celulares de glioblastomas tendo sua função relacionada com a proliferação celular, estimulando o crescimento tumoral. No presente estudo, foi investigado o efeito do RC-3095, um antagonista seletivo do receptor de GRP, como mono terapia e em associação à temozolamida (TMZ), um agente citotóxico alquilante de DNA, em modelos experimentais de células de glioma da linhagem C6 de rato *in vitro* e *in vivo*. A proliferação celular foi reduzida tanto por RC-3095 quanto por TMZ, porém quando ambos os agentes foram administrados em associação, a redução da proliferação foi significativamente mais efetiva. Nos experimentos *in vivo*, o grupo controle apresentou os tumores maiores ($52 \pm 15.5 \text{ mm}^3$), enquanto RC-3095 reduziu o tamanho tumoral, tendo um efeito mais efetivo na dose 0.3 mg/kg ($21 \pm 9.7 \text{ mm}^3$). Porém, a combinação dos dois agents produziu a maior redução no tamanho tumoral ($10 \pm 7.5 \text{ mm}^3$), assim como, apresentou índices histológicos menos agressivos. Nossos resultados demonstram que a combinação de RC-3095 e temozolamida produz uma maior redução tumoral em modelos experimentais de glioma de rato indicando que RC-3095 pode ser um forte candidato para associação à temozolamida potencializando os efeitos de agentes alquilantes de DNA no tratamento de gliomas multiformes.

Abstract

Malignant gliomas have a dismal prognosis despite multi-modality treatments like neurosurgical resection, radiation therapy and chemotherapy, mainly due to their high level of invasion. Recent studies demonstrated that gastrin-releasing peptide (GRP) and its receptors play a role in the development of a variety of cancers including gliomas. The GRP receptor was shown to be over-expressed on glioblastoma cell lines and its function is related with cellular growth. In the present study, we investigated the effects of RC-3095, a selective antagonist of the GRP receptor, alone and in combination with temozolomide (TMZ), a DNA alkylating agent, *in vitro* and *in vivo* using experimental rat C6 glioma models. Cellular proliferation was reduced in all treatments (TMZ, RC-3095 and TMZ + RC-3095) with the administration of TMZ together with RC-3095 being the most effective. In *in vivo* experiments, the control group displayed the largest tumors ($52 \pm 15.5 \text{ mm}^3$), whereas RC-3095 reduced the tumor size, with the most significant effect observed at the dose of 0.3mg/kg ($21 \pm 9.7 \text{ mm}^3$). The combined therapy produced the largest reduction in tumor size ($10 \pm 7.5 \text{ mm}^3$), greater than with either treatment alone. Ours results show that the combination of RC-3095 and TMZ have additive effects on the *in vitro* and *in vivo* glioma growth therefore making RC-3095 a candidate drug to potentiate the effects of the DNA alkylating agent temozolomide in the treatment of malignant gliomas.

Introdução

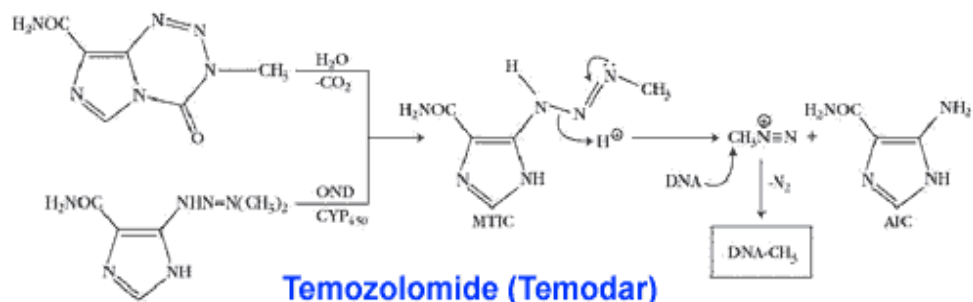
Gliomas consistem no tipo de tumor primário mais frequente no sistema nervoso central (SNC), sendo originados de células da glia ou de células precursoras de células gliais. Correspondem a 78% dos tumores neuronais em adultos apresentando aproximadamente 20.000 novos casos por ano nos Estados Unidos. São comumente encontrados na substância branca do cérebro, mas também podem ocorrer em qualquer região do SNC, tais como nos nervos ópticos. World Health Organization (WHO) classifica-os em diferentes subtipos de acordo com sua histologia, sendo o mais agressivo denominado de glioblastoma multiforme. Este possui o pior prognóstico tendo um tempo médio de sobrevivência depois de diagnosticado de aproximadamente 12 meses [revisado por Kleihues *et al*, 2000; Prados *et al*, 2000; Stupp *et al*, 2005]. Gliomas de alto grau são tumores altamente vascularizados e com grande potencial de infiltração apresentando áreas extensivas de necrose e hipóxia. Excessiva proliferação, crescimento tumoral disseminado, resistência a estímulos apoptóticos, neovascularização e supressão da auto-imunidade tumoral contribuem para o fenótipo maligno dos gliomas [Rich *et al*, 2004; John *et al*, 2006].

O tratamento depende da localização e do grau tumoral, sendo a remoção cirúrgica a abordagem mais usual. Porém, gliomas de alto grau na maioria dos casos reincidem algum tempo após a cirurgia. Assim, a terapia padrão é a associação de radioterapia seguida por quimioterapia após a remoção tumoral cirúrgica. Ainda assim, gliomas apresentam alta resistência a estes tratamentos [Grobbs *et al*, 2002; Schwartzbaum *et al*, 2006]. Grande ênfase tem sido gerada no desenvolvimento de novas substâncias que tem como alvo as

vias de sinalização celular envolvidas no crescimento tumoral. Em tumores malignos, normalmente ocorre uma super ativação de vias envolvidas na proliferação celular e concomitante diminuição dos mecanismos regulatórios de morte celular [Holland *et al*, 2001]. Pesquisas recentes incluem a restauração da função dos genes supressores tumorais perdidos, as alterações induzidas no ciclo celular, a inibição das metaloproteinases indutoras de metástases, da angiogênese e das vias de transdução de sinais.

Temozolamida (TMZ), um agente imidazólico alquilante, foi recentemente introduzido na clínica médica para o tratamento de gliomas malignos e tem apresentado grande potencial antitumoral [Danson *et al*, 2001]. TMZ possui vantagens importantes sobre outros agentes alquilantes por ser uma pequena molécula lipofílica com peso molecular de 194 Da podendo ser administrada via oral e ter a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica eficientemente. Seus níveis tanto no cérebro como no líquido cefaloespinal encontram-se na faixa de 30-40% da concentração plasmática [Newlands *et al*, 1997; Kanzawa *et al*, 2004]. Além disso, é uma substância com menor toxicidade em relação às células progenitoras hematopoéticas que outros agentes quimioterápicos convencionais por não resultar mutações de *cross-link* nos padrões de DNA. A citotoxicidade da TMZ ocorre devido à formação do agente monometil-triaceno-imidazol-carboxamida (MTIC) que induz a uma alquilação na posição O⁶ do DNA promovendo desapareamento de timina durante o ciclo de replicação do DNA [D'Atri *et al*, 1995; Friedman *et al*, 2000; Kanzawa *et al*, 2004] demonstrado na Fig 1.

Fig. 1.



<http://www.uspharmacist.com/NewLook/pix/drug/apr00rap.gif>

Fig 1. Formação do agente citotóxico MTIC resultante da degradação da TMZ, o qual iduzirá alquilação na posição O⁶ do DNA.

Rotineiramente a TMZ é administrada concomitantemente com medicamentos contra náuseas. Contudo, a associação da TMZ com outros agentes antineoplásicos ainda se encontra em fase experimental. Estudos de fase I e II têm demonstrado que a associação de TMZ à radioterapia ocasiona grande benefício em relação à melhora do prognóstico e aumento do tempo de sobrevida dos pacientes diagnosticados com gliomas [Yung *et al*, 2000]. Ainda assim, a vasta maioria destes pacientes apresenta uma sobrevida de no máximo 12 meses [Prados *et al*, 2000].

Outros estudos promissores encontram-se em um nível pré-clínico, como a associação TMZ com agentes que inibem a atividade de COX-2 que podem alterar o ciclo celular como o rofecoxib ou celecoxib [Kang *et al*, 2006; Hau *et al*, 2008]. Acredita-se que este agente recrute células tumorais ao período S do ciclo celular com atraso do seu crescimento. Também outros

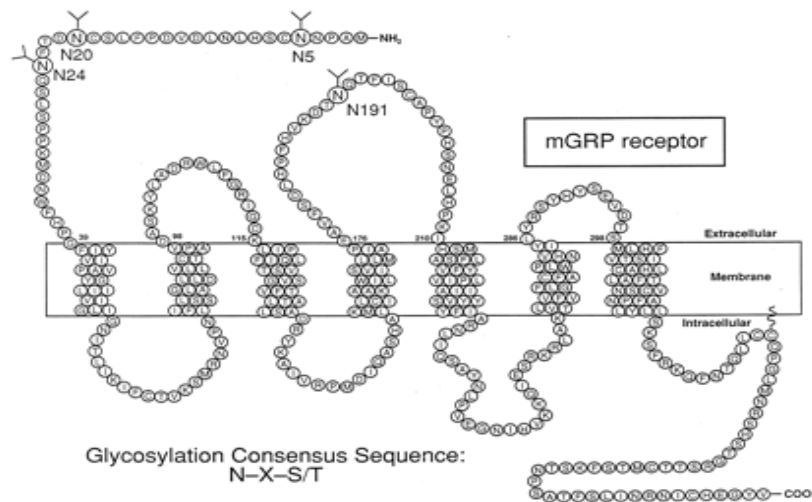
estudos de combinações com agentes antiangiogênicos, como o sunitinib – um inibidor de tirosina quinase, à TMZ demonstram terapias promissoras no tratamento de muitos tipos de tumores [Zhou *et al*, 2008]. Inibidores dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGF), que estão envolvidos no desenvolvimento de diversos cânceres, apresentaram bons resultados quando combinados à TMZ [Terrance *et al*, 2003]. Porém, estes estudos ainda não demonstraram eficácia satisfatória no aumento da sobrevida dos pacientes submetidos aos ensaios clínicos.

Muitas vias de transdução de sinais são anormalmente ativadas em tumores, proporcionando às células tumorais uma vantagem de sobrevivência em relação às células não-neoplásicas [Mulholland *et al*, 2005; Sanson, 2004]. A ativação de receptores de fatores de crescimento está envolvida em todas as fases de desenvolvimento tumoral, como na indução de angiogênese, no aumento da invasão local tumoral e na formação de metástases. O peptídeo liberador de gastrina (GRP), peptídeo mamário análogo à Bombesina encontrada na pele do anfíbio *Bombina bombina*, tem surgido como um fator importante de crescimento autócrino envolvido no desenvolvimento de muitos tumores [Patel *et al*, 1766; Moody *et al*, 1989]. Uma expressão aberrante tanto do peptídeo GRP como de seu receptor (GRPR, também conhecido como receptor BB2) foi relatada em estudos recentes [Zhou *et al*, 2004; Cornelio *et al*, 2007]. A expressão do receptor de GRP foi caracterizada em gliomas malignos e a ativação desses receptores por agonistas do peptídeo GRP ou bombesina estimula a mitogênese em muitas linhagens celulares de gliomas [Staley *et al*, 1993]. Ambos, GRP (27 aminoácidos) e Bombesina (14 aminoácidos), possuem a seqüência 7-aminoácido COOH-terminal altamente conservada, a qual é

requerida para a imunogenicidade e para a alta afinidade de ligação aos receptores de GRP, o que confere a estes peptídeos uma atividade fisiológica bem semelhante [Sunday *et al*, 1988].

Três receptores dos peptídeos bombesin-like (BLP) foram clonados em mamíferos: GRPR, receptor da neuromedina B (NMBR) e o receptor de bombesina 3 (BRS3). São receptores com sete domínios transmembrana acoplado à proteína Gq (Fig. 2) [Benya *et al*, 2000]. Esses receptores acoplados à proteína Gq via domínios intracelulares, quando ativados induzem múltiplas vias de transdução de sinalização intracelular.

Fig. 2.



Benya et al, 2000.

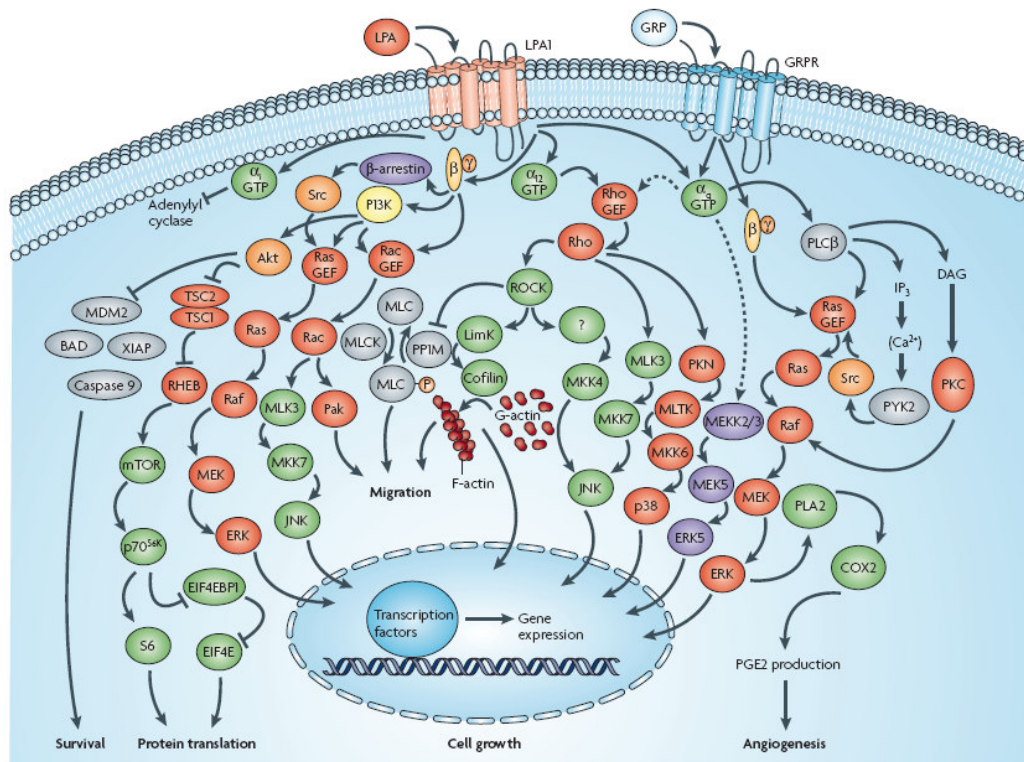
Fig 2. Receptor sete-transmembrana acoplado à proteína Gq do peptídeo liberador de gastrina (GRP).

Fisiologicamente, o GRP age como um peptídeo importante na regulação da contração do músculo liso, liberação de hormônios no trato gastrointestinal (GI), secreção de enzimas pancreáticas e neurotransmissão de sinais no sistema nervoso central (SNS) [Bunnet *et al*, 1994]. Alguns estudos verificaram os efeitos patogênicos destes peptídeos em modelos pré-clínicos de doenças como desordens neurológicas, tumores e distúrbios autoimunes, entre outros. Roesler e colaboradores investigaram os efeitos dos BLPs, assim como da ativação de GRPR, na regulação de funções neurais, demonstrando possíveis implicações do GRPR em doenças psiquiátricas [Roesler *et al*, 2004 e Roesler *et al*, 2006]. GRPR parece ter uma interação funcional com outros neurotransmissores e sistemas de receptores como com os receptores de GABA, dopamina e glicocorticóides, os quais estão envolvidos nas patologias de Parkinson e Esquizofrenia, assim como, na mediação de respostas de stress e ansiedade. Estudos recentes indicam que agentes que atuam ativando ou reprimindo GRPR são candidatos em potencial no tratamento da doença de Alzheimer [Roesler *et al*, 2006]. GRP foi também relacionado a processos inflamatórios. Dal Pizzol *et al*. recentemente reportaram antagonistas seletivos do GRPR diminuem a liberação de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* e a sobrevivência em modelos pré-clínicos de sepse [Dal Pizzol *et al*, 2006]

Os mecanismos de sinalização ativados pelo GRPR que causam os efeitos mitogênicos do GRP em tumores ocorrem através da ativação da via de sinalização da proteína quinase C (PKC), proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K). A ativação de GRPR estimula AMP cíclico (cAMP) e fosfatidil inositol 3 fosfato (PIP3), aumentando a hidrólise de fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) aumentando os

níveis intracelulares de cálcio e promovendo uma transativação de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) [Gutkind *et al*, 2007] (Fig. 3). Os receptores de GRP são acoplados à proteína Gq que ativa diretamente a via da PKC em células da linhagem C6 [Flores *et al*, 2008]. Evidências indicam que estimuladores da via de cAMP/PKA inibem a proliferação celular e induzem apoptose em células das linhagens U-87 e U-138 de gliomas, sendo o envolvimento da ativação dos GRPRs com a via de sinalização da proteína quinase A (PKA) demonstrada por estudos do nosso grupo [Farias *et al*, 2008].

Fig. 3.



Gutkind et al, 2007.

Fig 3. Mecanismos de sinalização ativados pelo GRPR que causam os efeitos mitogênicos do GRP em tumores.

A evidência de que o GRP e seu receptor têm um efeito importante no crescimento tumoral proporcionou o desenvolvimento de antagonistas seletivos ao GRPR como potenciais agentes antineoplásicos. Um exemplo desses antagonistas seletivos é o *[D-Tpi6, Leu13 psi(CH2NH)Leu14] bombesin* (RC-3095) desenvolvido por Schally e colegas, sendo experimentalmente avaliado em diversos tipos tumorais [Radulovik *et al*, 1991; Pinski *et al*, 1994]. RC-3095 surge como um agente interessante para o tratamento de gliomas por ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, atingindo assim regiões cerebrais importantes. Também demonstrou não apresentar alta toxicidade em modelos animais experimentais [Szepeshazi *et al*, 1997].

A expressão do GRPR em um grande espectro de tumores humanos foi revisada por Cornélio e colaboradores (Tabela 1) demonstrando a relevância deste receptor como fator de crescimento tumoral quando ativado, o que provém suporte a estudos de antagonistas do GRPR como agentes anti-tumorais experimentais [Cornélio *et al*, 2007]. Estudos clínicos com antagonistas do GRPR, como o RC-3095, em pacientes com câncer estão em fase inicial, sendo necessário mais estudos relacionados a toxicidade e dosagem destes agentes.

Tabela 1. Expressão do GRPR em tumores humanos.

Type of cancer	No. cases	No. positive	%	Method
Prostate	12	12	100	PCR
	30	30	100	Binding
	80	50	63	Binding
	22	20	91	PCR
	12	12	100	Binding
Gastrinoma	5	5	100	Binding
Breast	100	33	33	Binding
	71	44	62	Binding
	57	41	72	Binding
Ovarian	22	17	77	PCR
Pancreatic	12	2	17	Binding
	26	2	8	PCR
	29	0	0	Binding
Colon	21	5	24	Binding
	29	27	93	PCR
	50	38	76	IH
	23	23	100	PCR
Renal	4	4	100	PCR
	16	6	35	Binding
	18	13	72	PCR
Lung (SCLC)	7	2	29	PCR
	9	3	33	Binding
Head and Neck	25	25	100	PCR
Neuroblastoma	33	24	73	IH
	19	19	100	PCR
Esophageal	12	10	83	PCR
GI carcinoid	26	22	85	IH
Gastric	23	12	50	Binding
	20	8	40	PCR
Uterine	29	11	38	Binding

Cornélio *et al*, 2007

Objetivo

No presente estudo, nós investigamos o efeito antitumoral do RC-3095 em modelos experimentais de glioma C6 de rato e seu possível potencial em associação à TMZ, um agente alquilante de DNA, visando procedimentos multimodais no tratamento de glioblastoma multiforme.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito anti-proliferativo do RC-3095, da TMZ e de ambos os agentes em combinação em linhagens tumorais de glioma de rato C6;
- Avaliar o tratamento com RC-3095 e TMZ ao longo do tempo visando avaliar a sobrevivência *in vitro*;
- Avaliar a indução de morte celular induzida pelos tratamentos com RC-3095 e TMZ;
- Avaliar a eficácia do tratamento com RC-3095 e em associação à TMZ em modelos *in vivo* de gliomas.

Journal of Neuro-Oncology

Original paper

LABORATORY INVESTIGATION

Running head: combination of RC-3095 and temozolomide in gliomas.

Anti-proliferative effect of gastrin-release peptide receptor antagonist, RC-3095, combined with temozolomide in experimental glioblastoma models

Marianne de Oliveira - Giovana Cechim - Elisandra Braganhol – Daniel Garcia Santos - Luise Meurer - Cláudio Galvão de Castro - Algemir Lunardi Brunetto - Gilberto Schwarstmann - Ana Maria Oliveira Battastini - Guido Lenz - Rafael Roesler.

M.S. Oliveira – G. Cechim – C.G. Castro - A.L. Brunetto – G. Schwartzmann – R. Roesler

Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

G. Cechim – G. Lenz

Laboratory of Cellular Signaling and Plasticity, Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 901501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

E. Braganhol – A.M.O. Battastini

Laboratory of Enzimology, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

D.G. Santos

Imunogenetics Research group, Department of Genetics, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 901501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

C.G. Castro - A.L. Brunetto

Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Academic Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

L. Meurer - G. Schwartzmann

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

M.S. Oliveira – R. Roesler

Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract Malignant gliomas have a dismal prognosis despite multi-modal treatments like neurosurgical resection, radiation therapy and chemotherapy. Evidence has indicated that gastrin-releasing peptide and its receptors (GRPR) play a major role in the development of a variety of cancers including gliomas. In the present study, we investigated the effects of RC-3095, a selective GRPR antagonist, alone or in combination with temozolomide (TMZ), a DNA alkylating agent, in *in vitro* and *in vivo* experimental rat C6 glioma models. Cellular proliferation was significantly reduced by all treatments with the combined administration of TMZ and RC-3095 being the most effective treatment. In *in vivo* experiments, the control group displayed the largest tumors ($52 \pm 15.5 \text{ mm}^3$), whereas RC-3095 reduced the tumor size, with the most significant effect at the dose of 0.3mg/kg ($21 \pm 9.7 \text{ mm}^3$). The combined therapy produced further reduction in tumor size ($10 \pm 7.5 \text{ mm}^3$). Our results show that the combination of RC-3095 with TMZ produced an important reduction in *in vitro* and *in vivo* glioma growth therefore making RC-3095 a candidate drug to potentiate the effects of the DNA alkylating agent TMZ in the treatment of glioma.

Keywords RC-3095 - gastrin-releasing peptide receptor – temozolomide - glioblastoma multiforme.

Background

Glioblastoma multiform (GBM), the most frequent and aggressive type of primary brain tumor in adults, has a very poor prognosis because of its treatment resistance and the ability to infiltrate into brain tissue. Excessive proliferation, disseminated tumor growth, resistance toward apoptotic stimuli, neovascularization and suppression of antitumoral immune surveillance are key biological features that contribute to the phenotype of malignant human gliomas. The current standard treatment approach in patients diagnosed with GBM is neurosurgical resection and radiotherapy followed by adjuvant chemotherapy [1, 2]. Currently emphasis is being placed on promising new compounds that target individual signal transduction pathways. However, until such therapies result in significant clinical advances, the rationale for studying more broadly targeted drugs, such as DNA alkylating chemotherapeutics, remains strong [3, 4].

Temozolomide (TMZ), an oral imidazotetrazinone methylating agent, has demonstrated schedule-dependent activity in several cancers, including gliomas [5]. TMZ is rapidly absorbed and is spontaneously cleaved in vivo to monoethyl triazenoimidazole carboxamide (MTIC), a reactive DNA methylating species. The cytotoxicity of MTIC is thought to be caused by methylation of the O6 position of guanine [6]. Apart from its methylating properties, inhibition of protein kinase C has been implicated as a possible mechanism of action [7]. TMZ is highly bioavailable after oral administration, has excellent central nervous system penetration, and reaches the brain in therapeutic concentrations [8].

In Phase II studies TMZ improved the progression-free period of patients with relapsed high-grade glioma and showed a lower toxicity profile than

equivalent chemotherapeutic agents. Recently, the concomitant administration of TMZ and radiotherapy has led to significantly improved overall survival rates. However, the vast majority of patients who are diagnosed with GBM have a mean survival of only 12 months [2, 9].

Considerable progress has been made over the last several decades in understanding specific cellular, molecular and genetic mechanisms contributing to cancer growth and progression. Several signal transduction pathways are abnormally activated in cancers, giving tumor cells a survival advantage over surrounding non-neoplastic tissues [10, 11]. The gastrin-releasing peptide (GRP), a mammalian bombesin (BB)-like peptide, has emerged as a major autocrine growth factor involved in the development of a variety of human cancers. Aberrant expression of both GRP and GRP receptor (GRPR, also known as BB2 receptor) has been reported in many tumor types [12 - 13]. GRPR expression has been characterized in human glioma cells, and GRPR activation by its antagonist BB and GRP stimulates mitogenesis in several glioma cell lines [11 - 14].

The evidence indicating that GRP and GRPR play a role in cancer growth has led to the development of selective GRPR antagonists as potential targeted anticancer agents [10 – 15]. An example of these synthetic GRPR antagonists is [D-Tpi6, Leu13 psi(CH₂NH)Leu14] bombesin (6-15) (RC-3095), developed by Schally and colleagues [16, 17] and evaluated as a potential anticancer drug in a variety of experimental cancer models [18, 19].

In the present study, we investigated the potential of RC-3095 in experimental rat C6 glioma models and also in combination with TMZ multimodal targeting therapeutic. This is the first study assessing the possible

anti-proliferative effect of GRPR antagonism in C6 glioma tumor graft models in rats.

Materials and methods

Chemicals

Both TMZ (Schering-Plough, Kenilworth, USA) and RC-3095 (AEterna Zentaris GmbH, Frankfurt am Main, Germany) were dissolved in 4% dimethylsulfoxide (DMSO) in saline. All experimental protocols were approved by the Institutional Research Ethics and Animal Care Committee. All in vivo experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23 revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Cell culture

The rat C6 malignant glioma cell line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). The cells were grown and maintained in low glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, USA) containing 0.1% Fungizone, 100U/l gentamicin and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sorali, Campo Grande, Brazil). Cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cell proliferation assay

Cells were seeded at 10000 cells per well in 500 μ M DMEM/10% FBS into 24-well plates and incubated either with 0.05 to 1.0 μ M of RC-3095, 90 and 180 μ M TMZ and different combinations of each. Cell counting was carried out 48 h after treatment. The culture medium was removed, cells were washed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 100 μ L of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted immediately in a hemocytometer. Results are represented as 3 independent experiments performed in triplicates.

Cell viability assay

Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-SH-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich) assay, which measures the mitochondria activity, as previously described [20]. C6 glioma cells were plated in 96-well culture plates 24 hrs before treatment. After 48 h exposure to RC-3095 (0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 μ M), TMZ (22.5, 45, 90 and 180 μ M) and different combinations of these drugs, the cells were treated with 10 μ L MTT and the microplates were further incubated at 37°C for 4 hours. To lise the cells, 100 μ L of 10% dimethylsulfoxide was used. The absorbance values of each well were determined with a microplate enzyme-linked immunoassay reader (ELISA) equipped with a 492 nm filter. The negative control well was used for the baseline zero absorbance. Three independent experiments were carried out in

triplicate. The viability was determined as the percentage absorbance of treated cultures compared with those of untreated cultures – MTT index.

Flow cytometry assay

Tumor cells were grown in 24-well culture plates at 10000 cells/well and were treated with RC-3095 (0.1 and 1.0 μ M doses), TMZ (90 and 180 μ M doses) and different combinations of those drugs for 48 h. The cells were then collected and washed with HBSS, fixed in 70% ethanol, resuspended in phosphate-buffered saline containing 1mg/ml RNase, and stained with propidium iodide (final concentration of 50 μ g/ml) and YO-PRO-1 (final concentration of 0.1mM; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) based upon the method described by Peluso et al [21]. Briefly, a loss in plasma membrane integrity enables YO-PRO-1 to enter apoptotic cells, while healthy cells remain impermeable to this nucleic acid stain. After 10 min in the presence of YO-PRO-1 and propidium iodide, the rate of apoptotic cells was analyzed using flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Clonogenic survival assay

Clonogenic assay was performed as described previously [22]. C6 glioma cells were seeded into 6-well plates (400 cells/well) after treatment with RC-3095 or temozolomide and RC-3095 in combination with temozolomide. After incubation for 10-14 days, the cells were fixed with 70% ethanol and counterstained with 0.5% crystal violet. Only colonies containing 50 or more

cells were scored under a microscope. The radiation survival fraction (SF) was then calculated as:

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

Glioma implantation and pharmacological treatments

Rat C6 glioma cells grown to around 70% confluence were trypsinized, washed once in DMEM/10% FBS, centrifuged and resuspended in the same medium. A total of one million cells were injected at 6.0mm in the right striatum (coordinates with regard to bregma: 0.5 mm posterior and 3.0mm lateral) of anesthetized male Wistar rats, 250–270 g [23]. After 20 days, the rats were euthanized by guillotine and the entire brain was removed, sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde.

Ten days post-implantation, the rats were treated with 5 mg/Kg (i.p.) once a day of temozolomide, 0.1, 0.3 and 1.0 mg/Kg twice a day of RC-3095 (i.p.) or DMSO (control group) during 7 consecutive days. The drug was dissolved in DMSO at a final concentration of 5% [24].

Tumor volume quantification

Hematoxylin and eosin (H&E) sections (4 μm thick, paraffin embedded) of each tumor were analyzed by a pathologist. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera and analyzed using Image Tool Software™. The

total tumor volume (mm^3) was computed by adding the segmented areas and multiplying by the slice resolution.

Behavior assay

After ten days of tumor implantation, animals were exposed to an Open Field assay. Open field exploration was carried on a 40×45 -cm arena, surrounded by 45cm high walls, made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into nine equal squares by black lines. Rats were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 minutes. Crossings of the black lines, rearings performed and latency to start locomotion were counted. The number of crossings and rearings was used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the latency to start locomotion was used as measures of anxiety. After the treatment of 5 days with RC-3095 and/or TMZ, animals were exposed again to the open field arena for 5 min. and the same measures were taken. Comparisons were made between the cancer control group that had no treatment and different treatments with RC-3095 and TMZ before and after the treatment.

Statistics

The statistical significance was analyzed using one-way ANOVA analysis, followed by Student's t-test and Tukey multiple comparison test when appropriate. All statistical work was carried out using the SPSS software for

Windows (Release 11.0.1, Chicago, IL). Differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

Results

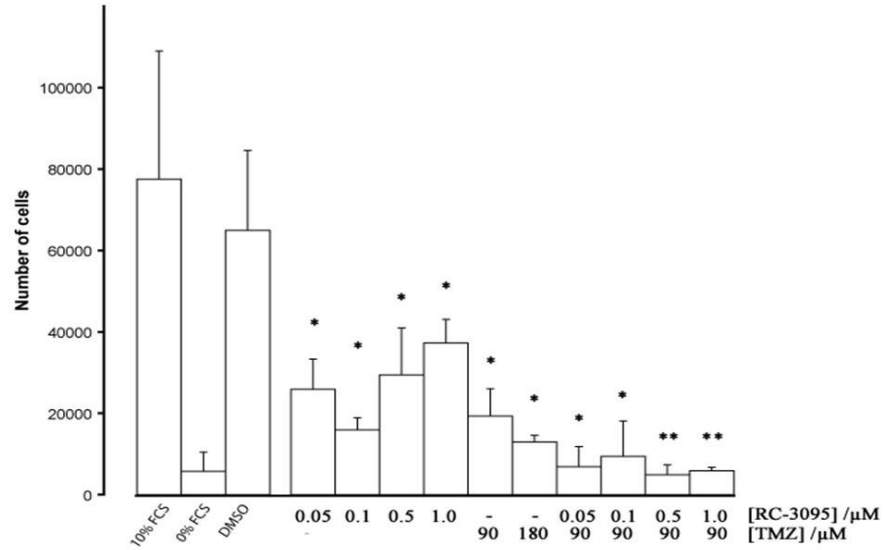
The GRPR antagonist RC-3095 plus TMZ inhibits proliferation of C6 glioma cells in vitro

The treatments with TMZ, RC-3095 or a combination of both drugs were effective in inhibiting the proliferation of C6 glioma cells. RC-3095 reduced cell proliferation by more than 50% 48hrs after treatment, while TMZ reduced cell proliferation by 80%. Both drugs combined really abrogated cell growth, similarly to the effect of cell proliferation in serum depletion. Fig. 1a shows the anti-proliferative effect of the treatment with RC-3095 and TMZ, better seen at 0.5 μM or 1.0 μM associated to 90 μM , respectively.

MTT assays were used to determine drug efficacy and interaction. The dose-effect plot for C6 glioma cells in Fig. 1b shows that the treatment of RC-3095 and TMZ alone exhibits lower cell viability relative to cancer control (* $P < 0.0001$) and an enhanced drug combination of RC-3095 and TMZ effect (decreased cell viability labeled effect) relative to RC-3095 and TMZ alone. RC-3095 (1.0 μM and 0.5 μM) in combination with TMZ (90 and 180 μM) has a significant effect compared with either drug alone.

Fig. 1

A



B

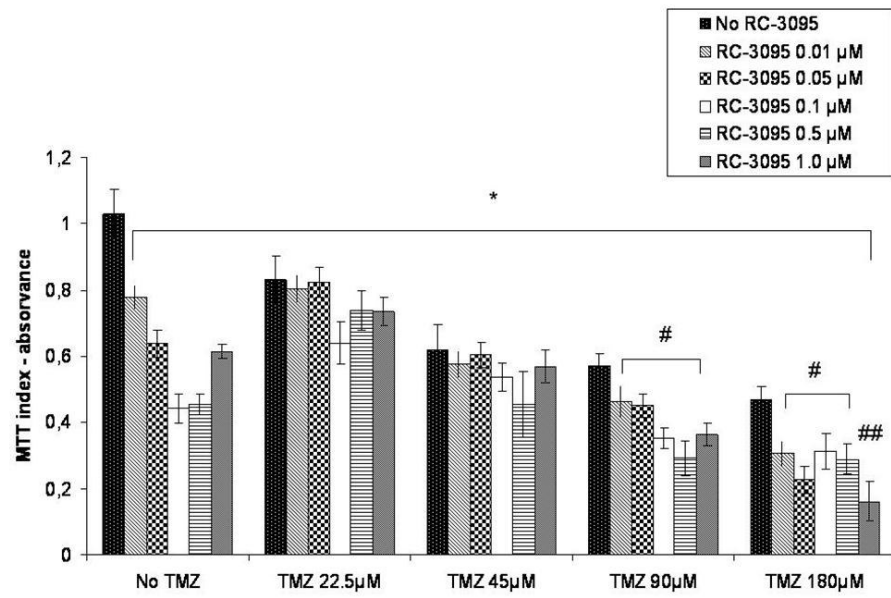


Fig. 1 (a) Influence of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 combined with the alkylant agent temozolomide on proliferation of C6 rat glioma cells. Data are expressed in number of cells found 48 h after treatment with RC-3095 (0.1 and 1.0 μ M), TMZ (90 and 180 μ M) and combinations of both drugs (RC-3095 0.1 plus TMZ 90, RC-3095 1.0 plus TMZ 90, RC-3095 0.1 plus TMZ 180, RC-3095 1.0 plus TMZ 180) compared to the number of cells found with fetal bovine serum alone (cancer control). * $P < 0.0001$ compared to untreated control cells; ** $P < 0.001$ compared to treatments with just one drug. **(b)** Effects of cell viability by RC-3095 (0.05 to 1.0) and TMZ (22.5 to 180) in C6 rat glioma cell lines. Cells were treated for 48 h with increasing concentrations of RC-3095 or TMZ alone and the respective combinations. * $P < 0.0001$, significant difference between untreated cells and cells treated with RC-3095 or TMZ alone; # $P < 0.001$ and ## $P < 0.0001$, significant difference between cells treated with the drugs alone or in combination. Experimental set were repeated for at least three times with triplicate wells for each condition (mean \pm SD).

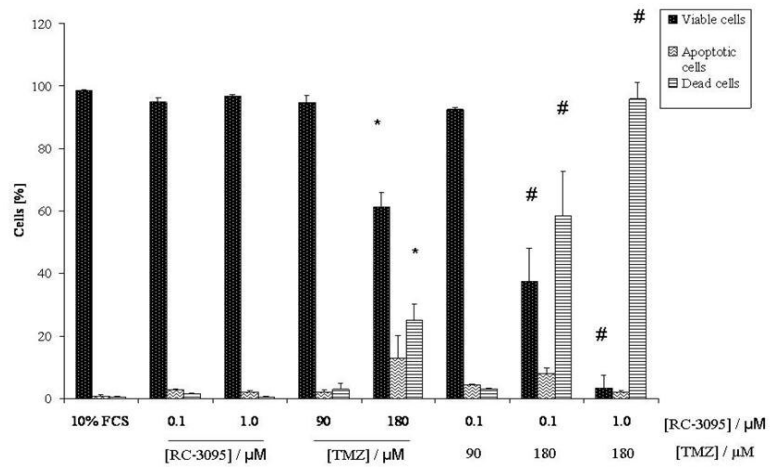
Apoptotic cells induced by the combination of RC-3095 and TMZ

Upon morphological examination, RC-3095 and TMZ treated cells exhibited apoptotic features, such as cell shrinkage, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies. When we quantified the apoptotic cells after the treatment with TMZ or RC-3095 alone compared to those drugs combined, we identified a significant difference in the apoptotic nuclei in the subdiploid region (sub G1 peak) of the histograms. Fig. 2 shows that apoptotic cells induced in C6 glioma cells treated with 180 μ M TMZ alone are prominent whereas RC-3095 does not

induced apoptotic cells when administrated alone, but increased cell death significantly when combined with TMZ. This cell death is probably necrotic, since apoptotic staining was decreased.

Fig. 2

A



B

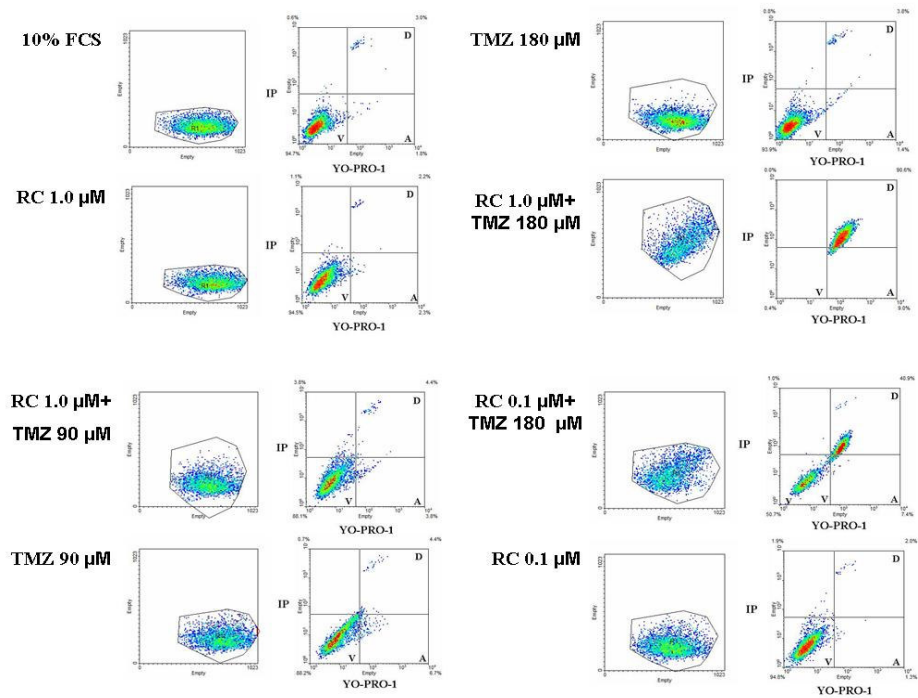


Fig. 2 (a). C6 rat glioma cells treated with RC-3095 (0.1 and 1.0 μM) and/or TMZ (90 and 180 μM). After 48h, those cells were analyzed by flow cytometry. Data were expressed by percentage of viable, apoptotic and dead cells **(b)**. C6 cells stained with propidium iodide (IP) and YO-PRO-1; A = Apoptotic cells, D = Dead cells and V = Viable cells. * $P < 0.005$, * $P < 0.001$. Experimental set were repeated for at least three times for each condition (mean \pm SD).

Decrease of C6 glioma cell surviving time by RC-3095 and temozolomide

The survival time *in vitro* was assessed by clonogenic assay. Colony formation was clearly affected after the treatment with temozolomide or RC-3095 alone, but no effect was particularly seen when cells were treated with a combination of RC-3095 and temozolomide. The combination of temozolomide 180 μM and RC-3095 1.0 μM induced a decrease in the survival time in 87% compared to untreated glioma cells, as shown in Fig. 3.

Fig.3.

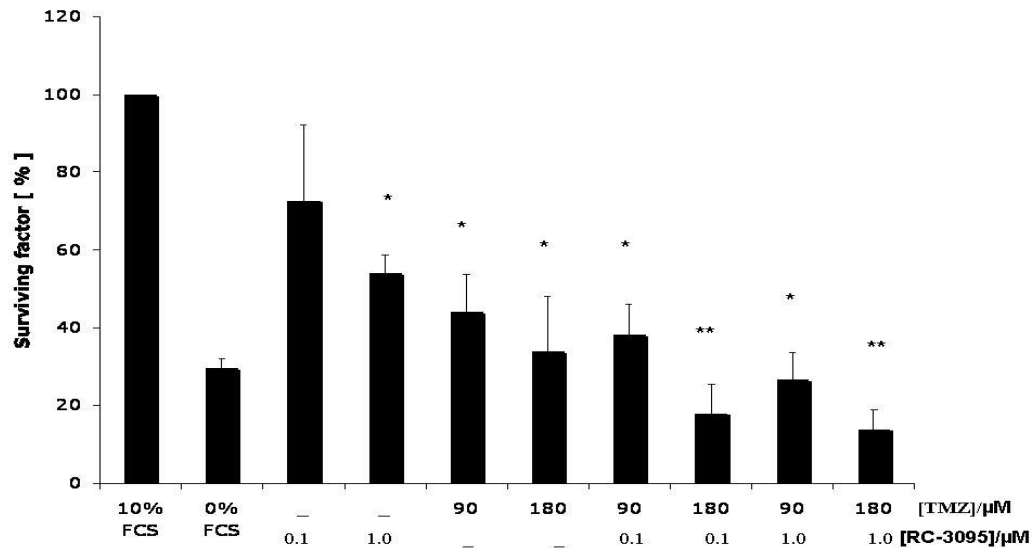


Fig. 3. Effect of RC-3095 or temozolomide and RC-3095 in combination with temozolomide in C6 glioma cell survival fraction. Following the treatments, cells were incubated for 10-14 days. Colonies containing a cluster of more than 50 cells were scored. Data were expressed as the percentage of the survival fractions of treated cells versus untreated cells. Data were plotted as the mean \pm SD of three different experiments in triplicate wells for each condition. * $P < 0.05$ was considered significantly different from untreated cells, ** $P < 0.01$ was considered significantly from the treatment with drugs alone.

Tumor size reduction induced by treatment with RC-3095 and TMZ in vivo

To determine whether RC-3095 in combination with TMZ can suppress tumor growth *in vivo*, adult Wistar rats were inoculated in the striatum with C6 glioma cells and, after the tumor development, were treated with 0.1, 0.3, and 1.0 mg/kg of RC-3095 or 5.0 mg/kg of TMZ alone or a combination of both drugs during five days. There was a significant suppression of tumor growth when rats were treated with RC-3095 or TMZ when compared to normal tumor growth (52 ± 15.5). This tumor size reduction was more evident when these drugs were administrated together rather than alone (10 ± 7.5) Fig. 4.

Haematoxylin and eosin examination shows that the untreated tumor presented a high mitotic index, nuclear pleomorfism, foci of tumor necrosis and parenchymal invasion – Fig. 5 e Fig. 6. These characteristics were less pronounced when rats were treated with RC-3095 and TMZ, and especially with the combination of the two drugs as showed in Table 1.

Fig. 4

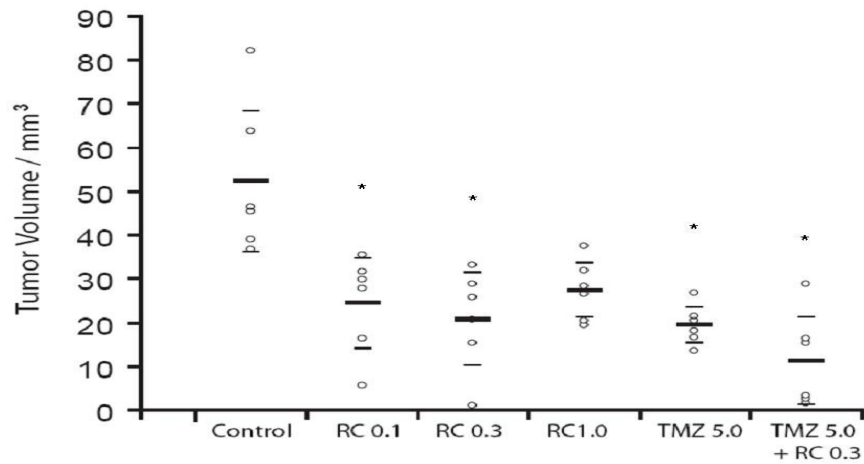


Fig. 4. Tumor size was measured 20 days in the different treatment groups after tumor implantation. Rats treated with RC-3095 alone (0.1, 0.3 and 1.0 mg/kg) and TMZ alone (5 mg/kg) induced a significant tumor size reduction compared by tumor size in untreated rats (N = 6 animals). RC-3095 combined with TMZ reduced in 21% the tumor size compared to untreated rats. * $P < 0.002$ was considered significantly different from untreated animals.

Fig. 5.

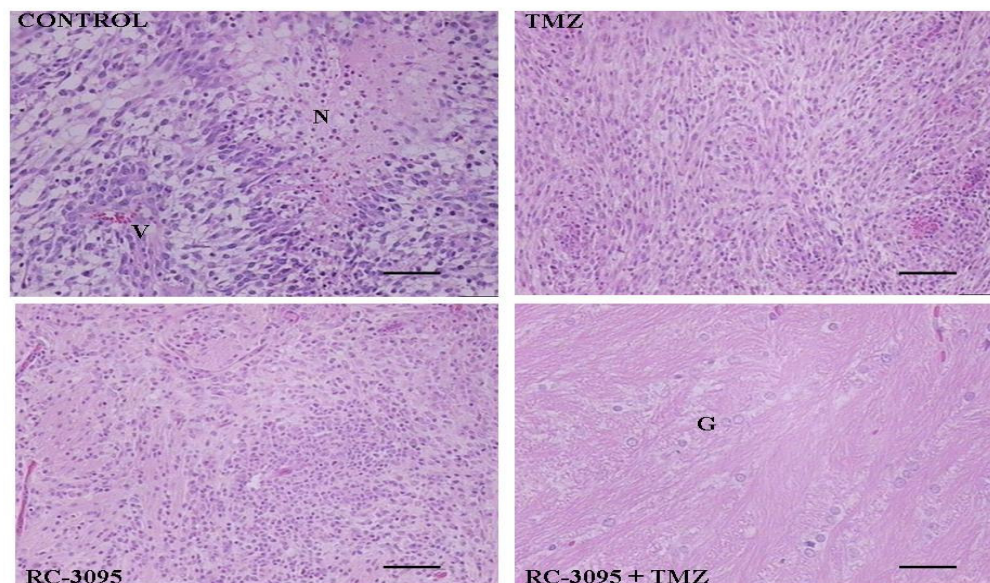


Fig. 5. The sections of implanted rat glioma were stained with haematoxylin and eosin. Histological characteristics that define glioblastoma multiform as seen in rats implanted glioma – cancer control – and in rats treated with RC-3095 0.3 mg/kg, TMZ 5.0 mg/kg and combination of both drugs. Necrosis (**N**) and microvascular proliferation (**V**) seen in untreated rats and rats treated with temozolomide, gliosis (**G**) seen in rats treated with RC-3095 combined with TMZ. Scale = 50 um.

Fig. 6.

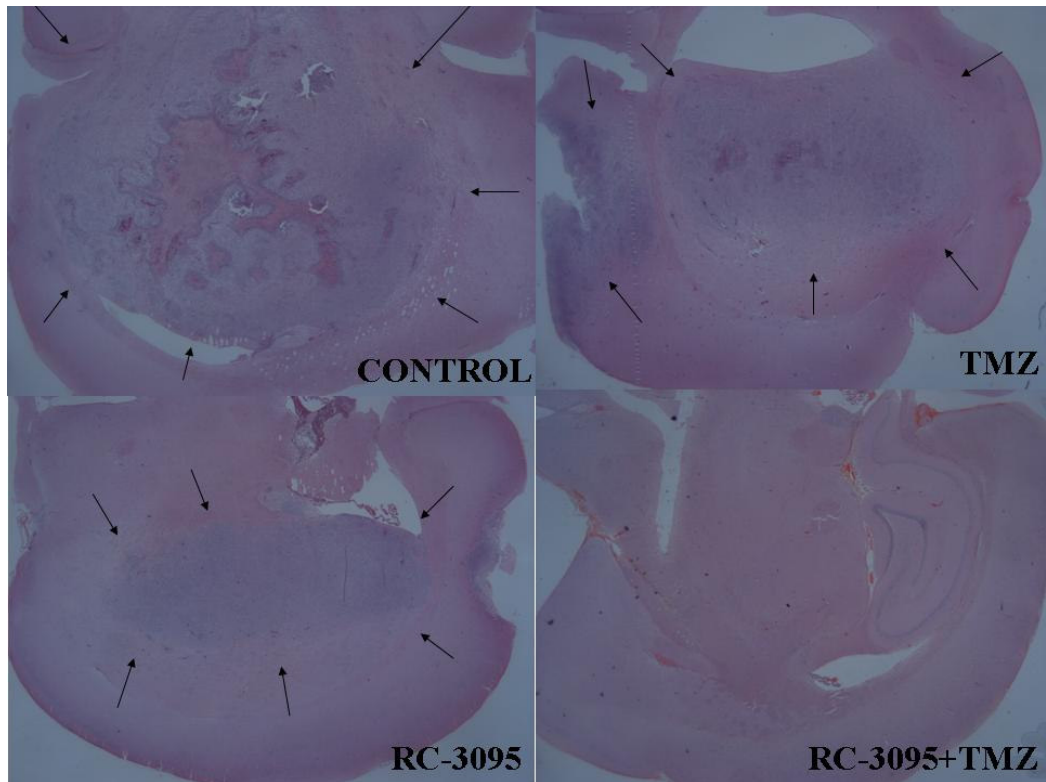


Fig. 6. Haematoxylin and eosin (HE) examination of tumor size – brain x tumor – compared treated animals with the untreated animals.

Table 1.

	Control	RC-3095 0.1 mg/kg	RC-3095 0.3 mg/kg	RC-3095 1.0 mg/kg	TMZ 5.0 mg/kg	RC-3095 0.3 mg/kg plus TMZ 5.0 mg/kg
Coagulative necrosis	6/6	4/6	3/6	4/6	3/6	2/6
Intratumoral Hemorrhage	5/6	3/6	3/6	3/6	4/6	1/6
Lymphocytic infiltration	3/6	4/6	4/6	5/6	3/6	3/6
Mitotic index: mitosis/HPF	10.6 ± 0.3	6.4 ± 0.7*	6.05 ± 0.6*	6.8 ± 0.8	6.1 ± 1.0*	4.4 ± 0.6 **
Reactional gliosis	—	—	1	—	—	2 *

Table 1. The histological variables (coagulative necrosis, intratumoral hemorrhage, lymphocytic infiltration) were regarded as present or absent. Mitosis was counted in ten high power fields (HPF) of the periphery of the lesion, and the average of this counting was used as mitotic index. * $P < 0.05$ compared to histological variables of untreated animals, ** $P < 0.01$ compared to histological variables of animals treated with drugs alone.

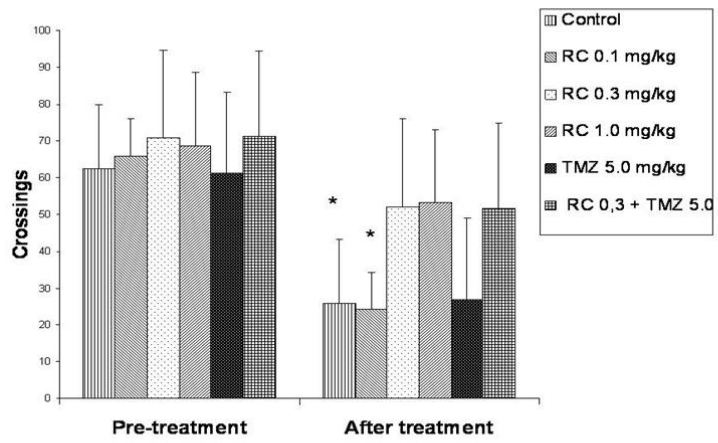
Behavioral improvement by RC-3095 in animals with glioma

The open field exposure paradigm is a well accepted animal model for measuring general behavioral aspects of brain function such as locomotion, exploration, and anxiety-related behaviors [25]. Rats that received the tumor graft – 14 days of tumor development - were exposed to open field before and after treatment with RC-3095 and/or TMZ. Fig. 7 a and b shows that the number of crossings and rearings decrease significantly as tumor progresses in both untreated rats and rats

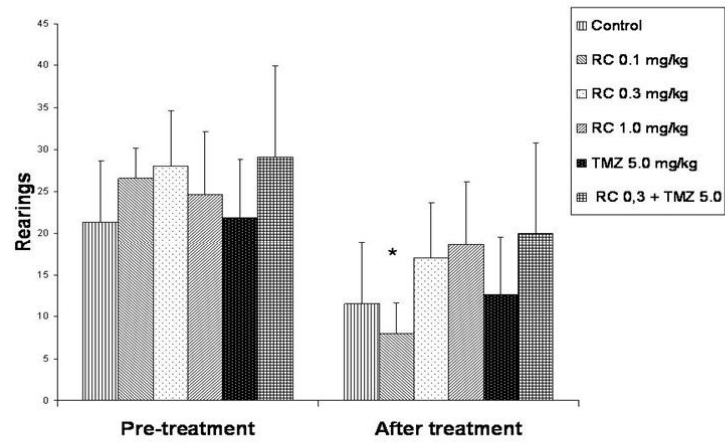
given TMZ alone, indicating reduced locomotion and exploration. In contrast, animals given RC-3095 alone or combined with TMZ showed the same number of crossings and rearings before and after treatment. Another parameter considered was the latency (time that rats needs to explore the environment). Fig. 7 c shows that the latency of untreated rats and rats treated with TMZ alone were significantly longer after five days of treatment. Otherwise, rats that received only RC-3095 alone or combined with TMZ had lower latency after the treatment period.

Fig.7.

A



B



C

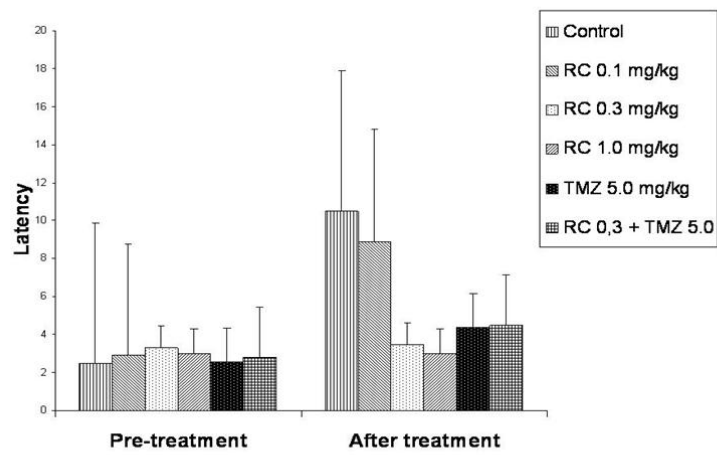


Fig. 7. Behavior analysis. (A) number of crossings, (B) number of rearings and (C) time of latency before the treatment, with 10 days of tumor development, and after the treatment, with 18 days of tumor development. Treatments with RC-3095 and /or TMZ compared by rats untreated (N = 10 animals). * $P < 0.05$ was considered significantly different from animals after treatment compared to those animals before treatment.

Discussion

Treatment of primary central nervous system tumors includes surgery, radiation and chemotherapy with single-agents such as temozolomide, BCNU or 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-L-nitrosourea combined with vincristine [4]. Unfortunately, combined modality therapy yields only 2% to 5% five-year survival rates, and poor treatment response is considered to be a consequence of intrinsic and/or acquired drug resistance. GRPR antagonist has already been shown to be effective *in vivo* in inhibiting the growth of human U-87MG and U-373MG glioma xenografted into athymic nude mice [16, 26]. In addition, we have recently shown that RC-3095 inhibits the growth of C6 glioma cells *in vitro* [27]. Nevertheless, previous studies have not examined the effects of GRPR antagonism in C6 rat glioma models *in vivo*, and relatively few studies have evaluated the anti-proliferative effects of different concentrations of GRPR antagonist in glioma C6 cells *in vitro*. Consequently, we decided to examine the possible anti-proliferative effects of RC-3095 in C6 glioma models *in vitro* and *in vivo*, and in combination with temozolomide in the same C6 models looking for multimodal therapies.

We choose temozolomide to evaluate the potential of RC-3095 in adjuvant therapy because it is commonly used to treat gliomas. We showed that the combination effect of RC-3095 and temozolomide *in vitro* and *in vivo* models has an important effect in tumor growth inhibition. In *in vitro* experiments, RC-3095 seems to be an interesting adjuvant for the glioma treatment with temozolomide, since the combination of both drugs decreased cell proliferation and viability more than the effect of these drugs when administered alone. A previous study [28] demonstrated that different classes of epidermal growth factor receptor – EGFR - inhibitors can have synergistic antitumor activity when combined with temozolomide or cisplatin by a subsequent reactivation of *MYC* inducing apoptosis in the surviving tumor cells. TNF- α converting enzyme – TACE - undergoes a Src dependent phosphorylation by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) that regulates release of the EGFR ligand amphiregulin upon GRP treatment [29].

We also found that addition of RC-3095 to temozolomide enhanced cell cycle arrest and growth inhibition. Because RC-3095 is known to be an anti-angiogenic agent blocking the tumor growth [30] and temozolomide causes DNA damage, leading to apoptosis, RC-3095 may enhance the effect of temozolomide increasing cell death by apoptosis. RC-3095 alone did not induced apoptosis, but when administered in combination with temozolomide, apoptotic cell death was higher than with temozolomide alone. Kanashiro and colleagues [31] found that another antagonist of GRPR, RC-3940, diminished the relative ratio of Bcl-2:Bax by around 70% indicating apoptotic gain.

To determine the potency of the GRPR antagonist, RC-3095, relative to temozolomide, glioma cells were plated at clonal density, exposed to drug for 48

h, and cultured for up to two weeks. Colonies of more than 50 cells were counted, and the surviving fraction was calculated relative to untreated cells. C6 glioma cells showed an important level of sensitivity to both drugs and were more sensitive when RC-3095 was combined to TMZ. GRPR antagonists induces cell cycle arrest in glioma genic assays, which measure both cell death and growth arrest, and therefore provide the most comprehensive indication of a drug's impact on the cell [30]. On the basis of these data, addition of RC-3095 to TMZ can be said to be 20 times more effective than dose drugs administered alone at inhibiting colony formation of gliomas.

RC-3095 reduced C6 cell proliferation *in vitro* and also *in vivo* when administered alone, but this reduction was increased when combined with TMZ. Our results corroborate the data presented by Schally and colleagues [17 - 19] which show a significant decrease in proliferation when RC-3095 was used to treat U-87 and U-373 glioma cell cultures. This effect was reproduced in xenograft C6 glioma model in which RC-3095 reduced tumor size compared to untreated animals. Analysis of tumor histology showed an important reactional gliosis in some treated animals with 1.0 mg/kg of RC-3095 and with RC-3095 in combination with TMZ. This data indicates that GRPR antagonists may be candidates for antitumoral agents in the treatment of glioblastomas.

A phase I trial of RC-3095 in patients with advanced solid tumors has been recently carried out by Schwartzmann and colleagues [32], and larger trials are now warranted. The findings that RC-3095 improves the TMZ treatment in C6 rat glioma models can be used to design new approaches to treat glioma patients. It is important to consider that RC-3095 is more effective in lower doses therefore these findings from preclinical studies reporting different effects of low and high

doses of GRPR antagonist should be taken into account when establishing the doses to be used in clinical trials.

In summary, using cultured C6 cells and the *in vivo* C6 glioma model, we were able to show that the GRPR antagonist RC-3095 produces significant inhibition of glioma growth, an effect potentiated by combination with TMZ. These data supports the view that regimens based on GRPR antagonists plus TMZ should be further investigated for the treatment of gliomas.

Acknowledgements

This research was supported by CNPq (grant 400839/2005-9); the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD, Porto Alegre, Brazil), and the Childrens Cancer Institute (ICI-RS, Porto Alegre, Brazil). Authors thank Caroline B. Farias, Débora G. Flores and Gustavo K. Reolon for the excellent technical assistance.

References

1. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Oghaki H, Cavanee WK. (2000) Glioblastoma Tumours of the Nervous System: Pathology and Genetics. Inter Agency for Res on Cancer Press 1: 29–98.
2. Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, Weller M, Fischer B, Taphoom MJ, Belanger AA, Marosi C, Bogdalun U, Curshmann J, Janzer RC, Ludwig SK, Gorlia T, Lacombe D, Eisenhauser E, Mirimanoff RO. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Méd* 352: 987-996.
3. John PF, Henry B, Steven B, Andrew L, Geoffrey B, Weidong H, Ricardo P. (2006) In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Brain Res* 4523-4532.
4. Rich Jn, Bigner DD. (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant gliomas. *Nat Ver Drug Discov* 3: 430-446.
5. Danson SJ, Middleton MR. (2001) Temozolomide: a novel oral alkylating agent. *Expert Rev Anticancer Ther* 1: 13-9.
6. Payne MJ, Pratap SE, Middleton MR. (2005) Temozolamide in the treatment of solid tumours: current results and rationale for dosing/scheduling. *Critical Rev in Oncol Hematol* 53: 241-252.
7. Tentori L, Leonetti C and Aquino A. (1995) Temozolomide reduces the metastatic potential of Lewis lung carcinoma (3LL) in mice: role of alpha-6 integrin phosphorylation. *Eur J Cancer* 31A: 746-754.
8. Plowman J, Waud WR, Koutsoukos AD, Rubinstein LV, Moore TD, Grever MR. (1994) Preclinical antitumor activity of temozolomide in mice: efficacy against

- human brain tumor xenografts and synergism with 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res* 54: 3793-9.
9. Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD. (2000) A phase II study of temozolomide vs. Procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83: 588-593.
 10. Mulholland PJ, Thirlwell C, Brock CS, Newlands ES. (2005) Emerging targeted treatments for malignant glioma. *Expert Opin Emerg Drugs* 10: 845-854.
 11. Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K. (2004) Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol* 16: 607-613.
 12. Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. (2006) Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1766: 23-41.
 13. Cornelio D, Roesler R, Schwartzmann G. (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18: 1457-66.
 14. Moody TW, Mahmoud S, Staley J, Naldini L, Cirillo D, South V, Felder S, Kris R (1989) Human glioblastoma cell lines have neuropeptide receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide. *J Mol Neurosci* 1: 235-242.
 15. Staley J, Coy DH, Jensen RT, Moody TW. (1993) Solubilization and purification of bombesin/gastrin releasing peptide receptors from human cell lines. *J Mol Neurosci* 4: 29-40.
 16. Pinski J, Schally AV, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K. (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: 5895-5901.
 17. Zhou J, Chen J, Mokotoff M, Ball ED. (2004) Targeting gastrin-releasing peptide receptors for cancer treatment. *Anticancer Drugs* 15: 921-927.

18. Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV. (1991) Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 38: 593-600.
19. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE. (1997) A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10913-10918.
20. Ural AU, Yilmaz MI, Avcu F, Pekel A, Zerman M, Nevruz O, Sengul A, Yalcin A. (2003) The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of dexamethasone and thalidomide. *Int J Hematol*, 78: 443-449.
21. Peluso JJ, Pappalardo A, Fernandez G. (2001) Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulose cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC d-dependent pathway. *Endocrinology* 142: 4203-4211.
22. Petersen C, Petersen S, Milas L, Lang FF and Tofilon PJ. (2000) Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res* 6: 2513-2520.
23. Takano T, Lin JHC, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M. (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med* 7: 1010-1015.
24. Patel VJ, Elion GB, Houghton PJ, Keir S, Pegg AE, Johnson SP, Dolan ME, Bigner DD, Friedman HS. (2000) Schedule-dependent activity of temozolomide plus CPT-11 against a human central nervous system tumor-derived xenograft. *Clin Cancer Res* 6: 4154-4157.

25. Bouwknecht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry C. (2007) Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behavior; relationship to c-FOS expression on serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* 72: 32-43.
26. Kiaris H, Schally AV, Sun B, Armatis P, Groot K. (1999) Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. *Oncog* 18: 7168-7173.
27. Flores DG, Leites J, Farias CB, Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku ASK, DiLeone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. (2008) Gastrin-Releasing Peptide Receptors Regulate Proliferation of C6 Glioma Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *Curr Neurovasc Res in press*.
28. Angela AV, Rushika MP, Achim AJ, Elisabeth S, Lloyd JO, Terrance GJ, Rodney BL, Carmel M, Francesca W, Janet W, Edouard CN, Antony WB, Andrew MS. (2003) Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. *PNAS* 100: 15871-15876.
29. Qing Z, Sufi MT, Vivian WaiYanLui, Sichuan X, Jill MS, Huizhou F, Thomas ES, Gordon BM, Jennifer RG. (2006) Phosphorylation of TNF- α converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *PNAS* 103: 6901-6906.
30. Lefranc F, Mijatovic T, Mathieu V, Rorive S, Decaesthercke C, Debeir O, Brothji J, Van Ham P, Salmon I, Kiss R. (2004) Characterization of Gastrin-Induced proangiogenic effects in vivo in orthotopic U373 experimental human glioblastomas and in vitro in human umbilical vein endothelial cells. *Clin Cancer Res* 10: 8250-8265.

31. Kanashiro CA, Schally AV, Cai RZ, Halmos G. (2005) Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide decrease the expression of angiogenic and anti-apoptotic factors in human glioblastoma. *Anticancer drugs* 16: 159-165.
32. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Souza FH, Pohlmann P, De Nucci G. (2006) A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24: 403-412.

Discussão

Apesar dos tratamentos agressivos como neuro ressecção cirúrgica tumoral, radioterapia e quimioterapia com diferentes agentes antitumorais, o prognóstico de glioma ainda é muito precário sendo o tempo médio de sobrevida dos pacientes com esta enfermidade de aproximadamente 12 meses. Isso se deve à alta invasividade e resistência apresentada por esses tumores [Prados *et al*, 2000; Kleihues *et al*, 2000; Stupp *et al*, 2005]. TMZ, um agente alquilante de DNA, é comumente aplicado clinicamente a pacientes com gliomas por suas características lipofílicas, tendo uma alta disponibilidade na região encefálica, e por sua baixa toxicidade [Newlands *et al*, 1997; Friedman *et al*, 2000]. Porém, após certo tempo de tratamento, gliomas acabam adquirindo resistência a TMZ por expressarem uma enzima denominada *O6-methylguanin methyltransferase* (MGMT) que tem como função o reparo do dano no DNA causado pela TMZ. Estudos mostraram [Craincross *et al*, 2007] que a regulação da expressão de MGMT ocorre via p53 mostrando a importância de se verificar as vias regulatórias envolvidas no crescimento tumoral e na ativação dos possíveis tratamentos.

Antagonistas do GRPR já demonstraram ser efetivos na inibição de muitos tipos tumorais [Zhou *et al*, 2004; Mulholland *et al*, 2005]. Shally e colaboradores [Radulovik *et al*, 1991; Pinski *et al*, 1994] desenvolveram o RC-3095, antagonista seletivo dos receptores de GRP, e verificaram sua atividade na inibição do crescimento tumoral nas linhagens celulares U-87 e U-373 *in vitro* e em camundongos atímicos. Recentemente nosso grupo demonstrou que há uma super expressão do GRPR na linhagem de glioma C6 e a redução da proliferação celular

desta linhagem quando adicionado RC-3095 à cultura celular [Flores *et al*, 2008]. Porém, não há nenhum estudo que demonstre a atividade de antagonistas do receptor de GRP em modelos *in vivo* de glioma C6. Também não foi encontrado nenhum trabalho que avalie a combinação do RC-3095 com outros agentes antitumorais. Conseqüentemente decidimos avaliar o efeito anti-proliferativo do RC-3095 em modelos experimentais C6 de glioma de rato e em combinação com TMZ visando terapias multimodais.

Em geral, os agentes quimioterápicos são divididos em agentes citostáticos e citotóxicos. Agentes citotóxicos resultam em morte celular via mecanismos que incluem a alquilação de DNA, *cross-linking* de DNA e quebra dos padrões de DNA. Já os agentes citostáticos alteram a biologia celular tumoral por inibir o crescimento, a invasão e a angiogênese tumoral ou ambas as ações, mas eles não causam morte tumoral diretamente [Parney *et al*, 2003]. Assim, a combinação de agentes citostáticos, como o RC-3095, a agentes citotóxicos, como a TMZ, aparece como uma opção antitumoral eficaz, como no tratamento de gliomas.

Demonstramos que RC-3095 reduziu efetivamente a proliferação celular da linhagem C6 *in vitro*, porém, quando associado à temozolamida, a redução da proliferação foi significativamente maior em relação à proliferação de células tumorais com somente 10% de FCS sem tratamento, assim como, em relação aos agentes como monoterapias. O efeito anti-proliferativo desta combinação foi verificado por contagem celular com exclusão por tripan blue e confirmada em uma relação maior de doses destes agentes antitumorais em ensaios de MTT.

Após, verificamos o efeito do tratamento com RC-3095 e/ou TMZ prolongado *in vitro* na linhagem celular de glioma C6. Foram realizados experimentos de clonogenic que demonstraram a sobrevida celular após o

tratamento com agentes antitumorais. Tanto o RC-3095 como a temozolamida foram altamente efetivos diminuindo a formação de colônias após tempo prolongado de tratamento em relação às células sem tratamento algum, apenas com 10% FCS. Já o tratamento com RC-3095 em associação a temozolamida foi significativamente mais efetivos na redução de formação de colônias celulares em relação ao tratamento com os agentes como monoterapias.

Além da redução da proliferação *in vitro* da linhagem celular C6, demonstramos que o RC-3095 reduziu efetivamente o volume tumoral em modelos de glioma C6 de ratos Wistar tendo uma redução em média de 50% do volume tumoral comparado com animais que não receberam tratamento algum. Quando foi administrado RC-3095 em associação à TMZ, a redução do volume tumoral foi em média de 70% maior em relação aos animais não tratados, demonstrando ser um tratamento mais efetivo que os agentes como monoterapia. Isso é também demonstrado pelos parâmetros histológicos apresentados pela coloração de HE nos tecidos tumorais dos animais. Todos os animais que não receberam tratamento apresentaram necrose coagulativa e os maiores índices de hemorragia intratumoral, e alto índice mitótico também foi apresentado por este grupo de animais. Importante observar que alguns dos animais tratados com RC-3095 em combinação com TMZ apresentaram somente gliose reacional, não havendo indícios de proliferação tumoral após o tratamento. Estes resultados indicam que antagonistas do receptor GRP, como o RC-3095, são fortes candidatos como adjuvantes à TMZ no tratamento de glioblastomas multiformes.

Realizamos experimentos de campo aberto (*open field*) que é um paradigma bem aceito para verificar aspectos gerais de comportamento locomotor e exploratório como também a ansiedade de modelos animais. Este paradigma

baseia-se em um conflito entre um comportamento do animal para explorar um novo ambiente (com base no potencial de ganho de resultados) versus um comportamento do animal para evitar um novo ambiente (com base no potencial de resultados aversivos) [Bouwknicht *et al*, 2007]. Para demonstrar como tal comportamento pode ser afetado pelo tumor e com o tratamento com RC-3095 e TMZ, ratos que receberam o enxerto tumoral foram expostos ao campo aberto antes e após o tratamento, apresentando um tumor de dez dias de desenvolvimento no primeiro experimento antes do início dos tratamentos. Foi avaliado o número de *crossings* – que corresponde à quantidade de vezes que os animais cruzavam os quadrantes - e o número de *rearings* – comportamento exploratório executado pelos animais caracterizado pelo posicionamento nas duas patas traseiras – assim como o tempo que os animais demoravam a sair da posição inicial e se direcionar a outro quadrante entre o grupo de animais que receberam tratamento com RC-3095 e em combinação com TMZ, e o grupo de animais que não receberam tratamento. Com o desenvolvimento tumoral, o grupo de animais que não recebeu tratamento apresentou um déficit no número de *crossings* e *rearings*, assim como um tempo maior de latência demonstrando uma maior apatia e déficit locomotor. Já os animais que receberam RC-3095 em doses maiores e em combinação à TMZ apresentaram o mesmo padrão de comportamento antes e após o tratamento. Porém, quando TMZ foi administrada como monoterapia, os animais demonstraram um padrão de comportamento apático semelhante aos animais que não receberam tratamento algum. Assim, o RC-3095 parece reverter o padrão de comportamento motor associado ao desenvolvimento do glioma e ao tratamento com TMZ sendo opção como adjuvante em terapias antitumorais por amenizar aspectos comportamentais.

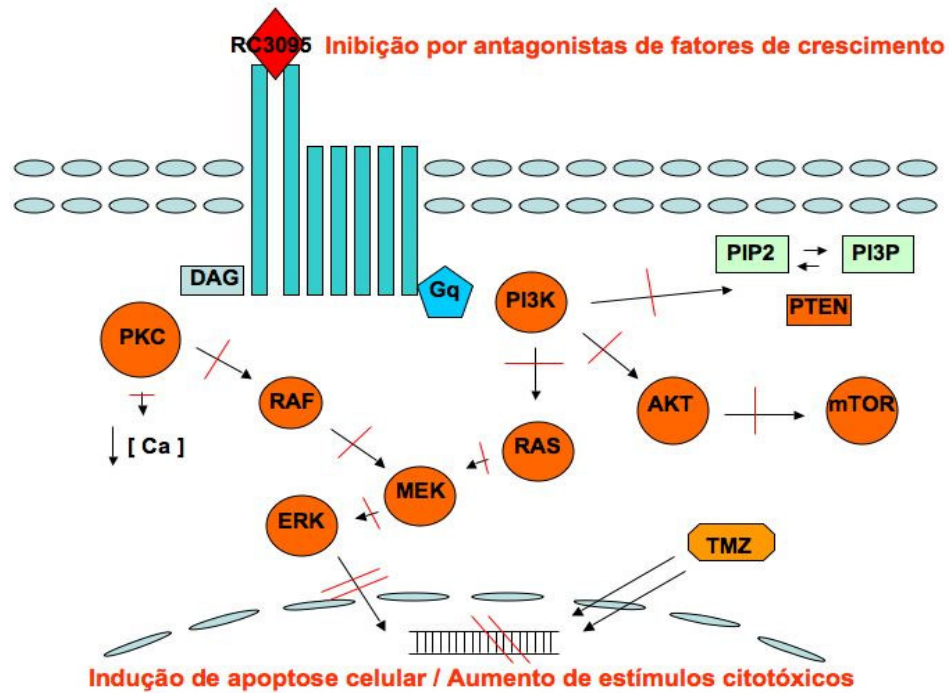
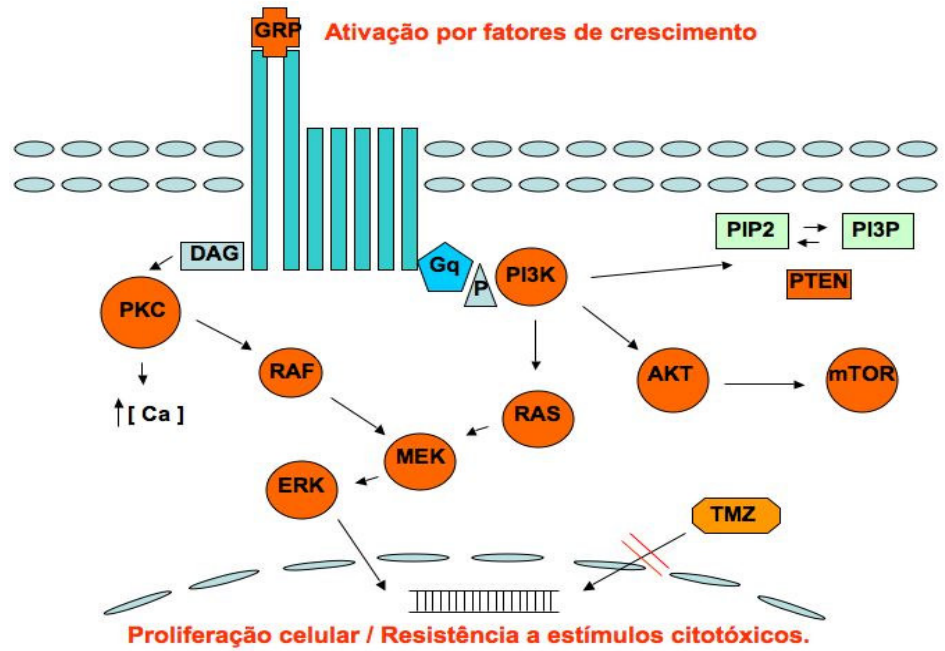
Um estudo clínico de fase I do RC-3095 em pacientes com tumores avançados foi recentemente desenvolvido pelo Dr. Gilberto Schwartzmann e colegas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre [Schwartzmann *et al*, 2006] obtendo bons resultados no tratamento tumoral destes pacientes sendo necessário um estudo em maior escala. Os resultados obtidos neste trabalho indicando que RC-3095 melhora o tratamento com TMZ em modelos da linhagem C6 de glioma de ratos podem ser utilizados para conceber novas abordagens para o tratamento de pacientes com gliomas. Sendo importante considerar que o RC-3095 apresenta efeitos eficazes em doses mais baixas, portanto, esses achados de estudos pré-clínicos que reportam diferentes efeitos de baixas e altas doses de antagonistas de GRPR são de grande importância para se estabelecer as doses que serão utilizadas em pacientes em estudos clínicos.

Visando analisar uma possível ação sinérgica do RC-3095 em relação à TMZ dada a importante supressão tumoral *in vitro* e *in vivo*, realizamos experimentos de citometria de fluxo com células C6 marcadas tanto com iodeto propídico como com YO-PRO-1, que analisam a morte celular e células apoptóticas, respectivamente. Nossos dados mostram que o RC-3095 praticamente não induziu morte celular nesta linhagem em 48 horas de tratamento. Já a temozolamida induziu alguma morte via apoptose em células da linhagem C6 em doses mais altas. O tratamento combinado de RC-3095 e TMZ foi altamente significativo na indução de morte celular, estando quase 90% das células da linhagem C6 mortas provavelmente por apoptose em 48 horas de tratamento. Este efeito deve-se possivelmente pela inibição dos antagonistas do GRP na via de sinalização celular da PKC/PI3K/ERK, inibindo assim a expressão dos genes *c-MyC* e *c-FOS*.

Estudos prévios [Angela *et al*, 2003] demonstraram que diferentes classes de inibidores dos receptores do fator de crescimento epidérmico – EGFR – possuem uma atividade sinérgica antitumoral quando combinados à TMZ ou cisplatina por subsequente reativação de *c-Myc* induzindo apoptose nas células tumorais sobreviventes. Já foi demonstrado que o GRP e EGF atuam na fosforilação dos mesmos substratos, sendo o RC-3095 um antagonista seletivo do GRP, pois atua regulando negativamente os receptores de EGF [Liebow *et al*, 1994]. A enzima conversora de TNF- α - TACE – é fosforilada pela fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K), que regula a liberação do ligante anfiregulador de EGFR mediante ativação pelo GRP [Qing *et al*, 2006].

Defeitos no mecanismo de apoptose resultam não somente em tumorigênese, mas também no aumento da resistência aos tratamentos antitumorais. A resistência inerente de células tumorais à radioterapia e quimioterapia ocorre por alterações genômicas em nível transcricional e pós-transcricional de proteínas e seus fatores de transcrição. A cascata de sinalização PI3K/AKT/ERK tem um papel importante na transmissão de sinais de receptores de fatores de crescimento que regulam a expressão gênica e previnem apoptose. Esses receptores aparecem super ativados em tumores, estando esta via consequentemente também super ativada. Uma ativação aberrante desta cascata de sinalização promove aos tumores resistência a estímulos citotóxicos como os induzidos por agentes pro-apoptóticos. Assim, um possível mecanismo sinérgico de antagonistas do receptor de GRP e agentes citotóxicos se explica pela diminuição da ativação da cascata de sinalização PI3K/AKT/ERK devido à inibição da ativação do GRPR diminuindo assim a transcrição de *c-Myc* e *c-Fos*,

reduzindo a resistência tumoral à ação da TMZ, a qual terá uma maior potencialização de alquilação do DNA, induzindo à apoptose.



Mecanismo proposto de sinergismo entre RC-3095 e TMZ.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a combinação de TMZ com antagonistas do receptor GRP deve ser avaliada como possível alternativa terapêutica para o tratamento de gliomas. A combinação destes agentes antitumorais apresentou um efeito antiproliferativo importante *in vitro* e *in vivo* em modelos de glioma C6 em relação aos agentes administrados como monoterapias. Sendo também este o primeiro trabalho que mostrou o efeito significativo na redução tumoral em modelos *in vivo* de gliomas C6, auxiliando na definição de doses para futuros ensaios clínicos em pacientes com gliomas. Porém, ainda são necessários estudos que avaliem a interação molecular destes dois agentes, se há realmente um sinergismo na indução de vias apoptóticas e/ou autofágicas, como também uma supressão de vias relacionadas à proliferação celular.

Anexo I

Experimento de sobrevida *in vivo* no modelo de glioma C6 em ratos tratados com RC-3095 e TMZ

Células confluentes da linhagem celular C6 de glioma foram inoculadas por cirurgia esterotáxica em ratos *Wistar* machos adultos. Aproximadamente um milhão de células foram injetadas a uma profundidade de 6.0 mm no estriado direito dos animais anestesiados (coordenadas em relação ao bregma de 0.5 mm posterior e 3.0 mm lateral) [Takano *et al*, 2001]. Após 90 dias de monitoramento para a sobrevida, os animais foram eutanasiados por guilhotina e seus cérebros eram removidos, seccionados e fixados com 10% de paraformaldeído para coloração com HE. A sobrevida dos animais foi comparada entre os diferentes tratamentos utilizando teste de *log-rank*. A sobrevida estimada é demonstrada em uma curva de Kaplan-Meier [Saito *et al*, 2004].

Dez dias após a implantação tumoral, os animais eram tratados com 5.0 mg/kg de TMZ via intraperitoneal uma vez ao dia, 0.1, 0.3 ou 1.0 mg/kg de RC-3095 via intraperitoneal duas vezes ao dia ou DMSO como grupo controle durante sete dias consecutivos. Os agentes antitumorais foram dissolvidos em DMSO na concentração final de 10%.

Resultado

Os animais que não receberam tratamento, somente DMSO via intraperitoneal, e os animais tratados com TMZ apresentaram o menor tempo de sobrevida apresentando uma sobrevida média de 30 dias. Os animais que receberam o tratamento combinado de RC-3095 e TMZ apresentaram um tempo de sobrevida um pouco maior, tendo em média 40 dias de sobrevida. O grupo que recebeu RC-3095 na dose de 1.0 mg/kg apresentou uma sobrevida prolongada com 100% (5 dos 5 ratos do grupo) dos animais que receberam este tratamento vivos no tempo de corte do experimento – 90 dias. Este dado demonstra que possivelmente o RC-3095 apresenta um efeito importante na sobrevida dos animais. Porém, já como nem todos animais do grupo controle, os quais não receberam tratamento, haviam falecido até o tempo de corte de 90 dias, o ideal é que o experimento seja realizado novamente com um número maior de animais por grupo para evitar que os animais que sofreram a cirurgia, mas não desenvolveram tumor, sejam excluídos sem afetar a significância do experimento.

Fig. Anexo 1.

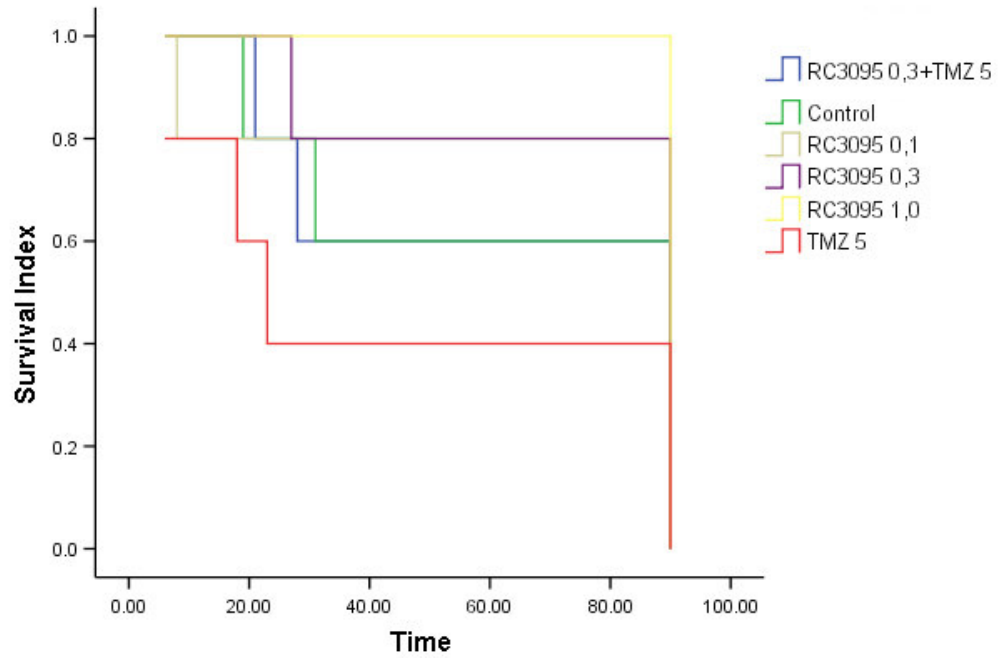


Fig. Anexo 1. Relação do tempo de sobrevida entre os animais tratados com RC-3095 e/ou TMZ e os animais que não receberam tratamento (N= 5).

Referencias Bibliográficas

Angela AV, Rushika MP, Achim AJ, Elisabeth S, Lloyd JO, Terrance GJ, Rodney BL, Carmel M, Francesca W, Janet W, Edouard CN, Antony WB, Andrew MS (2003) Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15871-15876.

Bouwknicht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A, Lowry C (2007) Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behavior; relationship to c-FOS expression on serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull* 72: 32-43.

Bunnet N, Walsh JH, Dockray GJ (1994) Gastrin releasing peptide: *Biochemistry and Physiology*. Raven Press 1: 423-445.

D'Atri S, Piccioni D, Castellano A, Tuorto V, Franchi A, Lu K, Christiansen N, Frankel S, Rustum YM and Papa G (1995) Chemosensitivity to triazene compounds and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase levels: studies with blasts of leukaemic patients. *Ann Oncol* 6: 389-393

Dal Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Roesler R (2006) Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1: 84-90.

Farias CB, Lima RC, Lima LO, Flores DG, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R (2008) Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology, in press.*

Flores DG, Farias CB, Leites J, Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku ASK, Dileone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R (2008) Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr Neurovasc Res* 5: 99-105.

Friedman HS, Kerby T and Calvert H (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 6: 2585–2597

Grobben B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310: 257-70

Gutkind JS and Dorsam RT (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Cancer Nature Reviews* 7: 79-94.

Hau P, Kunz-Schughart L, Bogdahn U, Baumgart U, Hirschmann B, Weimann E, Muhleisen H, Ruemmele P, Steinbrecher A, Reichle A (2008) Low-dose chemotherapy in combination with COX-2 inhibitors and PPAR-gamma

agonists in recurrent high-grade gliomas - a phase II study. *Oncology* 73: 21-25.

Holland EC (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature* 2: 120-129.

John PF, Henry B, Steven B, Andrew L, Geoffrey B, Weidong H, Ricardo P (2006) In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas. *Clin Brain Res* 4523-4532.

Kang SG, Kim JS, Park K, Kim JS, Groves MD, Nam DH (2006) Combination celecoxib and temozolomide in C6 rat glioma orthotopic model. *Oncol Rep* 15: 7-13.

Kleihues P, Sobin LH (2000) World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88: 2887.

Liebow C, Crean DH, Lee MT, Kamer AR, Mang TS, Schally AV (1994) Synergistic effects of bombesin and epidermal growth factor on cancers. *Proc Natd Acad Sci USA* 91: 3804-3808.

Mulholland PJ, Thirlwell C, Brock CS, Newlands ES (2005) Emerging targeted treatments for malignant glioma. *Expert Opin Emerg Drugs* 10: 845-854.

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT and Brock C (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23: 35–61

Parney IF, Chang SM (2003) Current chemotherapy for glioblastoma. *Cancer J* 9: 149- 156.

Pinski J, Schally AV, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K (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: 5895-5901.

Prados, MD, Levin V (2000) Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* 27: 1-10.

Qing Z, Sufi MT, Vivian WaiYanLui, Sichuan X, Jill MS, Huizhou F, Thomas ES, Gordon BM, Jennifer RG (2006) Phosphorylation of TNF- α converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6901-6906.

Radulovic S, Cai RZ, Serfozo P, Groot K, Redding TW, Pinski J, Schally AV (1991) Biological effects and receptor binding affinities of new pseudonapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int J Pept Protein Res* 38: 593-600.

- Rich JN, Bigner DD (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant gliomas. *Nat Rev Drug Discov* 3: 430-446.
- Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G (2004) Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* 25: 241-243.
- Roesler R, Luft T, Oliveira SH (2006) Molecular mechanisms mediating gastrin-release peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 51: 350-357.
- Roesler R, Henriques JA, Schwartzmann G (2006) Gastrin-releasing peptide receptors as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5: 197-204.
- Saito R, Bringas JR, Panner A, Tamas M, Pieper RO, Berger MS, Bankiewicz K (2004) Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of Temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res* 64: 6858–6862.
- Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancellà A, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Souza FH, Pohlmann P, De Nucci G (2006) A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP)

antagonist RC-3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24: 403-412.

Schwartzbaum, JA, Fisher, JL, Aldape, KD, Wrensch, M (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2: 494-503.

Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, Weller M, Fischer B, Taphoorn MJ, Belanger AA, Marosi C, Bogdalun U, Curshmann J, Janzer RC, Ludwig SK, Gorlia T, Lacombe D, Eisenhauser E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-996.

Sunday M, Kaplan L, Motoyama E (1988) Biology of disease: gastrin-release peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 59: 5-24.

Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G, Lamharzi N, Groot K, Horvath JE (1997) A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10913-10918.

Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD (2000) A phase II study of temozolomide vs. Procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* 83: 588-593.

Zhou J, Chen J, Mokotoff M, Ball ED (2004) Targeting gastrin-releasing peptide receptors for cancer treatment. *Anticancer Drugs* 15: 921-927.

Zhou Q, Guo P, Gallo JM (2008) Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin Cancer Res* 1: 1540-1549.

CURRICULUM VITAE

OLIVEIRA, MS.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Marianne Schrader de Oliveira

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil
17/08/1982

Endereço profissional: Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS,
Brasil.

Telefone profissional: 51 – 21017616

E-mail: mari_oli_@hotmail.com

2. FORMAÇÃO

Curso de graduação: Farmácia com ênfase em Bioquímica

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Período: 2000 a 2004

Curso de Mestrado: Biologia Molecular e Celular

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Período: 2006 a 2008

3. ESTÁGIOS

- Estágio com bolsa do CIEE no laboratório de Diagnóstico Molecular e Celular Amplicon orientada pelo Dr. Luciano Krug no período do primeiro semestre de 2002;
- Estágio voluntário no laboratório de Análises Clínicas Netlab na área de Hematologia orientada pelo Dr. Cláudio Prestes de Oliveira durante o período do segundo semestre de 2002;
- Estágio curricular no laboratório de Análises Clínicas da Policlínica Militar nas áreas de Microbiologia, Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Uroanálise durante o primeiro semestre de 2004;

4. INICIAÇÃO EM PESQUISA

- Iniciação científica no laboratório de Bioquímica Vegetal do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – sob orientação da Profa. Dra. Magdolna Maria Vozari Hampe [purificação de proteínas] no período de jan/fev de 2002;
- Bolsa de iniciação científica no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – sob orientação da Profa. Dra. Nance Beyer Nardi [terapia gênica e cultura de células- tronco] durante o ano de 2003;

- Apresentação do trabalho "Nonviral in vivo gene transfer in the mucopolysaccharidosis I murine model" no Salão de Iniciação Científica orientada pela Dra. Melissa Camassola em setembro de 2003;
- Iniciação Científica em Bioquímica Clínica orientada pela Profa. Dra. Cleide Gonçalves da Silva [dosagens bioquímicas] durante o primeiro semestre de 2004;
- Iniciação Científica no laboratório de Mutagênese orientada pela Profa. Dra. Jenifer Saffi [reparo de DNA e citotoxicidade celular] no segundo semestre de 2004;

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL ANTERIOR

- Experiência profissional em Clínica para Deficientes Físicos e Mentais no Instituto St. Joseph Stifft, Würzburg, Alemanha durante o ano de 2005;
- Farmacêutica Bioquímica responsável pelo setor de Microbiologia e Micologia no Laboratório Endocrimeta desde 2006;
- Farmacêutica Bioquímica plantonista nas áreas de Bioquímica, Hematologia e Imunologia no laboratório Endocrimeta desde 2006 até o presente momento.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Flores DG, Farias CB, Leites J, **Oliveira MS**, Lima RC, Tamajusuku AS, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. “**Gastrin-Releasing Peptide Receptors Regulate Proliferation of C6 Glioma Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism.**” *Current Neurovascular Research*, 2008 5: 99-105.

Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, Santos DG, Battastini AMO, Meurer L, Castro CC, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R. “**Anti-proliferative effect of gastrin-release peptide receptor antagonist, RC-3095, combined with temozolomide in experimental glioblastoma models.**” *Journal of Neuro-oncology*, submitted – 2008.

7. CURSOS REALIZADOS

- Curso de Verão no Interdisziplinäres Zentrum für Infektionsbiologie und Immunität, Berlin, Alemanha [“ZIBI - International Summer School on Pathogen- Host Interplay”] em julho – agosto de 2007.

8. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

CECHIM, G.; SCHRADER, M. O. ; BRAGANHOL, E. *Estudo da Eficácia das Drogas Temozolamida e RC-3095 em Modelos de Gliomas in vitro e in vivo.* In: XIX Salão

de Iniciação Científica, 2007, POA. Caderno de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica. POA: Editora da Universidade - Gráfica UFRGS, 2007.

CECHIM, G. ; OLIVEIRA, M. S. ; BRAGANHOL, E. *Combination of Temozolomide and RC-3095 in in vivo models for gliomas' treatment.* In: 39 Congresso Brasileiro de Farmacologia Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto. www.sbfte.org.br, 2007. v. 2007. p. 35-35.

CECHIM, G.; SCHRADER, M. O.; BRAGANHOL, E. *Combination of Temozolomide and the Gastrin-Release Peptide Receptor Antagonist, RC-3095, Reduces Glioma Growth in Rats.* In: VIII São Paulo Research Conferences - Câncer: da Biologia Molecular ao Tratamento, 2007, São Paulo. <http://appliedcr.org/ojsystem/index.php/appliedcr/issue/current>, 2007.

CECHIM, G.; OLIVEIRA, M. S.; BRAGANHOL, E. *Combinação de Temozolamida e RC-3095 em Modelos in vivo para Tratamento de Gliomas.* In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre. Caderno de Resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: Editora da Universidade - Gráfica UFRGS, 2006.