

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EXPRESSÃO DE NEUROMEDINA B E DO SEU RECEPTOR EM CÉLULAS DE
MEDULOBLASTOMA HUMANO**

Mariane da Cunha Jaeger

**Orientação
Rafael Roesler
Carolina Nör**

**Biomedicina
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
LABORATÓRIO DE PESQUISAS EM CANCER - HCPA
BIOMEDICINA**

**EXPRESSÃO DE NEUROMEDINA B E DO SEU RECEPTOR EM CÉULAS DE
MEDULOBLASTOMA HUMANO**

MARIANE DA CUNHA JAEGER

*Trabalho Experimental de Conclusão do Curso
apresentado ao curso de Biomedicina, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como um dos pré-requisitos
para a obtenção do grau de Biomédico.*

Orientador: Prof. Rafael Roesler

Co-orientadora: Msc. Carolina Nör

**PORTO ALEGRE
JUNHO DE 2010**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Câncer no Centro de Pesquisas Experimentais no 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 (ICI), 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 pela confiança*

*A minha co-orientadora Carol Nör,
Pela disposição e pelas inúmeras ajudas*

*A Ana e Carol
Pelos ensinamentos*

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

*A Lígia
Pela ajuda e pelo incentivo*

*Aos meus colegas de turma
Pelos momentos compartilhados*

*A Andressa e a Káren
Pela amizade*

*A minhas irmãs Caroline, Carine e Marcele
Pela paciência e pelo exemplo*

*Aos meu pais
Pelo apoio, pelo incentivo e pelo carinho incondicional*

MUITO OBRIGADA A TODOS VOCÊS!

INDICE GERAL

ABREVIATURAS	5
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO GERAL	
1.1 Meduloblastoma	7
1.2 Neuromedina B e Receptor de Neuromedina B	10
2. OBJETIVOS	16
3. ARTIGO CIENTÍFICO	17
3.1 Resumo	19
3.2 Introdução	20
3.3 Materiais e Métodos	21
3.4 Resultados e Discussão	24
3.5 Apoio Financeiro	27
3.6 Referências	28
3.7 Legenda Figuras	33
3.8 Figuras	34
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	37
5. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL	38
6. ANEXOS	43

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
GRP	Peptídeo liberador de gastrina (do inglês, <i>gastrin releasing peptide</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 NMB
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKC	Proteína quinase C (do inglês, <i>protein kinase C</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês, <i>phospholipase C</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central

RESUMO

Meduloblastoma, um tumor neuroectodérmico primitivo do sistema nervoso central, é o tumor maligno intracranial mais comum em crianças. Apesar de avanços significativos na terapia, ela ainda é ineficiente em 30% dos casos e é responsável por graves efeitos colaterais. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas terapias mais específicas para esse tumor. Receptores de peptídeos similares a bombesina, como o receptor de neuromedina B (NMBR), tem sido propostos como alvos terapêuticos para diversos tumores e poderiam também ser utilizados para o tratamento de meduloblastoma. O NMBR é expresso em diferentes tipos de tumores e linhagens celulares de câncer e seu principal agonista, neuromedina B (NMB), tem sido proposto como um fator de crescimento autócrino em tumores. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão do NMBR e NMB em diferentes linhagens celulares de meduloblastoma humano e sua possível relação com a proliferação celular desse tumor. A expressão do mRNA de NMBR e de NMB foi confirmada por reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (RT-PCR) nas células Daoy, D283 e ONS-76. Entretanto, a proliferação celular não foi afetada pelo tratamento por 48 horas com NMB. O tratamento com o antagonista desse receptor, BIM-23127, também não influenciou na proliferação celular. Os resultados deste trabalho demonstram que apesar das diferentes linhagens de meduloblastoma expressarem tanto o receptor de NMB como o ligante do receptor a ativação ou inibição de NMBR não afetou a proliferação celular nestas linhagens.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Meduloblastoma

Tumores do sistema nervoso central (SNC) apresentam uma complexa classificação devido à ampla variedade de subtipos histológicos existentes. Na quarta edição da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (CID-O), publicada em 2007 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), novos itens e variantes tumorais são listados. De forma geral, os tumores do SNC podem ser classificados em: tumores dos tecidos neuroepiteliais; tumores de crânio e nervos para-espinais; 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 (Louis et al., 2007; Fuller & Scheithauer, 2007).

Meduloblastoma é o tumor maligno primário de SNC mais comum em crianças e acredita-se que sua origem ocorra a partir de células progenitoras localizadas na camada granular externa do cerebelo (Marino, 2005). Estudos recentes, porém, tem demonstrado que meduloblastomas podem ser iniciados tanto por progenitores comprometidos com a linhagem neuronal como por células tronco (Yang et al., 2008; Gilbertson & Ellison, 2008).

Em crianças, meduloblastomas são responsáveis 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 United States*, meduloblastoma apresenta uma incidência de aproximadamente 0,6 casos para cada 100.000 pacientes (Guessous et al., 2008).

No Brasil, poucos são os dados fornecidos sobre a incidência de meduloblastoma. De acordo com uma recente revisão de literatura, os tumores do SNC

são predominantes no sexo masculino, ocorrem principalmente em crianças menores de 15 anos, com um pico de 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 de meduloblastomas nessa população. 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 mais recente 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. Duas dessas variantes, meduloblastoma anaplásico e meduloblastoma de grandes células, formam um contínuo e apresentam um prognóstico pobre, sendo, por isso, agrupadas e denominadas de meduloblastoma de grandes células/anaplásico em muitos estudos (Gilbertson & Ellison, 2008).

O meduloblastoma clássico é a variante mais freqüente, representando aproximadamente 80% dos casos. Caracteriza-se por células com núcleos redondos pequenos e hipercromáticos, geralmente dispostas em camadas, com uma relação núcleo/citoplasma alta; pode ocorrer a presença de foco de necrose e angiogênese. O

meduloblastoma desmoplásico/nodular, por sua vez, contribui com aproximadamente 7% de todos os meduloblastomas e tem sido considerado um tipo menos agressivo que o meduloblastoma clássico. Essa variante apresenta uma arquitetura definida por células tumorais envolvidas por tecido rico em colágeno. As células dentro dos nódulos tem uma densidade menor do que aquelas da zona internodular e frequentemente demonstram diferenciação neurocítica. O meduloblastoma com extensa nodularidade representa 3% dos meduloblastomas, apresentando arquitetura nodular proeminente e sinais de diferenciação neuronal dentro dos nódulos. O tumor de grandes células e o anaplásico representam 2-4% e 10-22% de meduloblastomas, respectivamente. Esses dois subtipos caracterizam-se por núcleo grande e pleomórfico com nucléolo proeminente e citoplasma mais abundante que as outras variantes. É importante ressaltar que meduloblastomas não são histologicamente homogêneos e podem apresentar diferentes graus de anaplasia dentro da mesma lesão. Além disso, essa característica não se restringe a variante de grandes células/anaplásico, podendo ser identificada em mais de 24% de todos os meduloblastomas (Ellison et al., 2003; Giangaspero et al., 2006; Gilbertson & Ellison, 2008).

Apesar de serem correlacionados a determinado comportamento biológico, os subtipos de meduloblastoma não são a única ferramenta de prognóstico utilizada durante as triagens clínicas. Para essa avaliação, os três marcadores utilizados em crianças são: idade do paciente ao diagnóstico, resíduo tumoral pós-operação e metástase tumoral. Essas características possibilitam a divisão dos pacientes em duas categorias: 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 pós-operatório menor que 1,5 cm². Pacientes que não se encaixam nesse perfil são considerados de alto risco (Gilbertson, 2004).

Independente da categoria do paciente, o tratamento padrão 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 indesejados mais comuns envolvem déficits neurocognitivos que ocorrem devido às doses de radioterapia

utilizada, causando um dano grave em crianças jovens (Ris et al., 2001; Palmer et al., 2007). Além da diminuição nos quocientes de inteligência, outros efeitos tóxicos do tratamento de pacientes com meduloblastoma são desenvolvimento de sequelas endocrinológicas, tumores secundários, ototoxicidade, complicações neonatais, toxicidade ginecológica, cardíaca e pulmonar, podendo estas complicações levar à morte (Ris et al., 2001; Gessi et al., 2008; Perez-Martinez et al., 2005).

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 dessa doença 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). Muitos outros peptídeos estruturalmente similares à BB foram isolados da pele de anfíbios e foram, por isso, divididos em três grupos: família bombesina, família ranatensina e família filolitorina (Figura 1) (Erspamer et al., 1984; Ohki-Hamazaki et al., 2005). O isolamento de peptídeos análogos a bombesina em mamíferos foi realizado em estudos posteriores, sendo encontrados dois peptídeos: o peptídeo liberador de gastrina ou GRP (*gastrin releasing peptide*), isolado de tecido gástrico de suínos (McDonald et al., 1979), e a neuromedina B ou NMB (*neuromedin B*) (Minamino et al., 1983).

Família da bombesina	
Bombesina	ZQRLGNQWAVEHLM-NH ₂
Alitensina	ZGRLGTQWAVGHLM-NH ₂
GRF-humano	VPLP . . AGGGTVLTKMYPRGNHWAVGHLM-NH ₂
GRF-suíno	APVS . . VGGGTVLAKMYPRGNHWAVGHLM-NH ₂
Família da ranatensina	
Ranatensina	ZVPQWAVGHFM-NH ₂
Litorina	ZQWAVGHFM-NH ₂
NMB-humana	APLSWDLPEPRSRASKIRVHSRGNLWATGHFM-NH ₂
NMB-suína	APLSWDLPEPRSRAGKIRVHPRGNLWATGHFM-NH ₂
Família da filolitorina	
Leu-8 filolitorina	ZLWAVGSLM-NH ₂
Phe-8 filolitorina	ZLWAVGSFM-NH ₂

Figura 1. Estrutura da bombesina e famílias análogas (adaptado de Ohki-Hamazaki et al., 2005).

A NMB, originalmente purificada da medula espinal de suínos, foi identificada em 1983 e apresenta similaridade com a ranatensina nos sete últimos aminoácidos da porção carboxi-terminal (Minamino et al., 1983; 1985). Seu gene, em humanos, localiza-se no cromossomo 15q11 e codifica um precursor de 76 aminoácidos, a prepro-NMB. Esse precursor é processado e metabolizado por enzimas similares à tripsina, resultando na NMB madura, que contém 10 aminoácidos (Moody et al., 1995; Gonzalez et al., 2008).

A expressão desse peptídeo foi detectada no tecido gastrointestinal, na medula espinal, na glândula pituitária e em diversas áreas do SNC. Nesses órgãos, 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 pituitária; e efeitos no SNC como termoregulação, manutenção do ritmo circadiano, inibição da liberação de tirotrofina, efeitos comportamentais, ações sobre saciedade e na transmissão sensorial espinal (Orbuch et al., 1993; Jensen et al., 2008).

Além dessas funções, estudos tem demonstrado a influência de NMB e GRP no crescimento e/ou 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 através da ativação de receptores de superfície celular. Os três diferentes receptores ativados por bombesina em mamíferos, BB₁, BB₂ e BB₃, podem ser ativados por NMB. Porém, 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, assim como BB₂ e BB₃, é um receptor acoplado à proteína G. Em humanos, seu gene está localizado no cromossomo 6p21 e contém três éxons e dois íntrons. O receptor NMBR é composto por 390 aminoácidos e apresenta sete domínios transmembrana (Corjay et al., 1991; Jensen et al., 2008) (Figura 2).

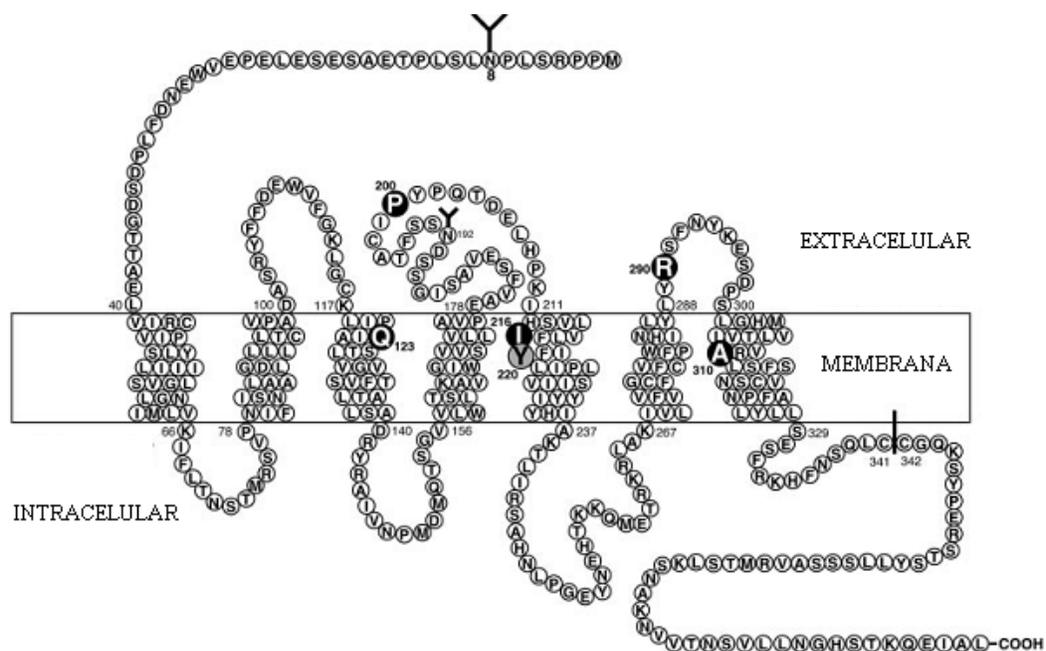


Figura 2: Estrutura do receptor de NMB (adaptado de Jensen et al., 2008).

Além de ser expresso em humanos, mRNA de NMBR foi descrito em roedores e primatas (Ohki-Hamazaki et al., 2000; Sano et al., 2004, respectivamente). Nessas ordens, 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, câncer epiteliais ovarianos, linhagens de glioblastomas e linhagem de células de câncer pancreático (DeMichele et al., 1994; Jensen et al., 2008).

A determinação da atividade de NMBR nos diferentes tecidos é dificultada por dois aspectos: (i) a utilização de agonistas não específicos, como bombesina, a qual foi muito utilizada em estudos mais antigos e (ii) a presença concomitante de NMBR e BB₂ em muitos tecidos. Para contornar essas dificuldades, são usados camundongos deficientes em NMBR, os quais permitem a confirmação de ações exclusivas decorrentes da interação entre NMB e NMBR, inclusive seu efeito sobre o crescimento tumoral (Jensen et al., 2008).

Os efeitos da interação de NMB e seu receptor ocorrem através de uma cascata de sinalização envolvendo a atividade de fosfolipase C (Figura 3). Após a ligação entre NMBR e agonista, ocorre a ativação de fosfolipase C, (*phospholipase C*, PLC), que, por sua vez, resulta na quebra de fosfoinosítídeos, mobilização de cálcio intracelular e ativação da proteína quinase C (*protein kinase C*, PKC). A ativação da via da PLC/PKC leva também à ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). O NMBR também está possivelmente associado à ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), a qual regula o crescimento tumoral pela fosforilação de Akt (Ohki-Hamazaki et al., 2000; Jensen et al., 2008).

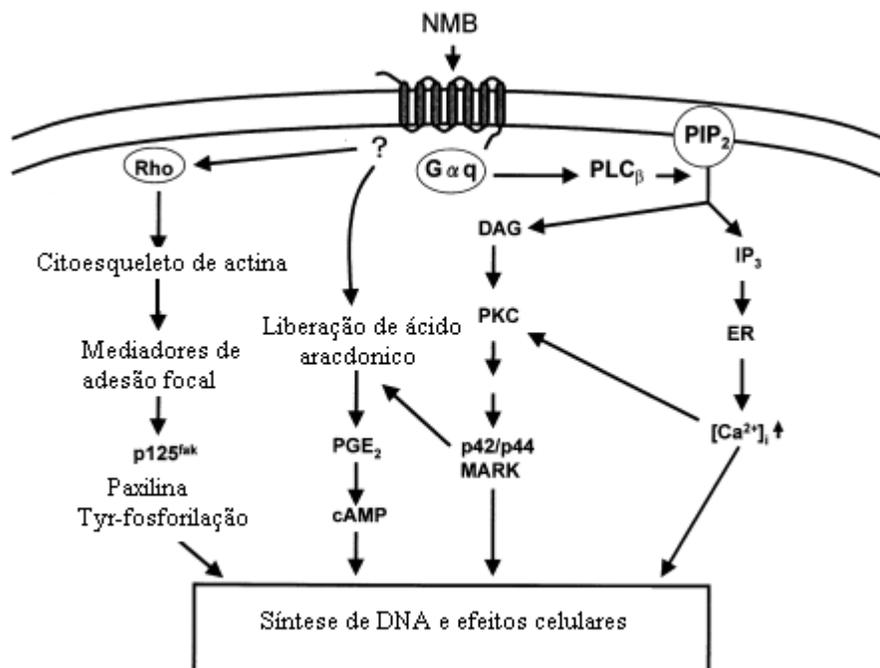


Figura 3: Proposta para a cascata de sinalização ativada por NMBR (adaptado de Ohki-Hamazaki et al., 2000).

As evidências indicando que NMBR age como um fator de crescimento em tumores e os estudos mostrando expressão aumentada de NMBR em vários tipos de câncer humano levaram ao desenvolvimento de antagonistas desse receptor como potenciais agentes antitumorais seletivos (Gonzalez et al., 2008; Jensen et al., 2008). Inibidores das vias MAPK e PI3K, que são ativadas por NMBR, tem sido propostos como novos agentes anti-câncer, e vários desses agentes já estão sendo avaliados em estudos clínicos em tumores (Vivanco & Sawyers, 2002; Roberts & Der, 2007; Wang et al., 2007).

Uma vez que a NMB é expressa em grandes quantidade em neurônios participando do desenvolvimento neuronal (Iwabuchi et al., 2006) e o seu receptor é expresso 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 a bombesina e seus receptores em meduloblastoma e nenhum estudo prévio investigou a expressão de NMB ou NMBR em meduloblastoma, bem como seus possíveis efeitos sobre o crescimento desses tumores.

2. OBJETIVOS

Esse trabalho visa caracterizar a expressão de NMBR e NMB em linhagens celulares de meduloblastoma humano.

Objetivos específicos:

- Analisar a expressão de mRNA para NMBR e NMB por reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) nas linhagens de células de meduloblastoma humano DAOY, D283 e ONS-76;
- Avaliar os efeitos da NMB e do antagonista NMBR, BIM 23127, sobre a proliferação celular nas linhagens de células de meduloblastoma humano DAOY, D283 e ONS-76 *in vitro*.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de janeiro a junho de 2010. A revista escolhida como modelo de normas de publicação foi a *Neurochemical Research*. Essa revista é direcionada a publicações de estudos que utilizam metodologia neuroquímica na pesquisa de função e estrutura do sistema nervoso. As normas para publicação nessa revista encontram-se em anexo.

Fator de Impacto (2009): 2,72

Expressão de Receptor de Neuromedina B e seu ligante em Células de Meduloblastoma Humano .

Mariane Jaeger^{1,2}, Carolina Nör^{1,2} e Rafael Roesler^{1,2,3*}

¹ Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas Experimentais, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 900035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

³ Grupo de Pesquisa de Neurofarmacologia Molecular e Celular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brasil

*Autor Correspondente

Rafael Roesler, PhD

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS)

90046-900 Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: +55 51 3308 3183; fax: +55 51 33083121

e-mail: rroesler@terra.com.br

RESUMO:

A expressão do receptor de neuromedina B (NMBR), um dos receptores da família da bombesina, tem sido avaliada em diferentes tipos de tumores e linhagens celulares de câncer e seu principal agonista, neuromedina B (NMB), tem sido proposto como um fator de crescimento autócrino em tumores. No presente estudo, nós examinamos a expressão do NMBR e NMB em diferentes linhagens celulares de meduloblastoma humano. A expressão do mRNA de NMBR e de NMB foi confirmada por reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (RT-PCR) nas células Daoy, D283 e ONS-76. A proliferação celular não foi afetada pelo tratamento por 48 horas com NMB. O antagonista desse receptor, BIM-23127, também não influenciou na proliferação celular. Os resultados demonstram a coexpressão de NMBR e NMB em meduloblastoma humano e sugerem que a interação NMB/NMBR não tem influência sobre proliferação desse tumor.

PALAVRAS-CHAVE: Meduloblastoma, Bombesina, Neuromedina B, Receptor de neuromedina B, Tumores cerebrais

Introdução

Meduloblastoma, um tumor neuroectodérmico primitivo do sistema nervoso central, é o tumor maligno intracranial mais comum em crianças. Apesar de avanços significativos na terapia, aproximadamente 30% dos pacientes apresentam baixa chance de cura e os que sobrevivem apresentam graves sequelas neurocognitivas e/ou neuroendócrinas, demonstrando, assim, a necessidade do desenvolvimento de novas terapias (1,2,3). Receptores de peptídeos similares à bombesina, como o receptor de neuromedina B (NMBR), tem sido propostos como alvos terapêuticos para diversos tumores (4,5,6) e poderiam também ser utilizados para o tratamento de meduloblastoma.

Neuromedina B (NMB), um peptídeo similar à bombesina presente em mamíferos, age através da ligação a receptores de membrana associados à proteína G, apresentando maior afinidade por um receptor específico conhecido como receptor de NMB (NMBR) (5). Esse receptor está presente no trato gastrointestinal (7) e no sistema nervoso central (8) e sua ativação está envolvida em diversos processos fisiológicos, incluindo contração do músculo liso; secreção exócrina e endócrina de tecidos gastrointestinais, pâncreas e pituitárias; e efeitos no sistema nervoso central como termoregulação, manutenção do ritmo circadiano, inibição da liberação de tirotrófina, efeitos comportamentais, ações sobre a saciedade e sobre a transmissão sensorial espinal (5,9,10). Além dessas funções, a expressão e ação de NMB/NMBR tem sido estudada no contexto do câncer.

Diversos estudos demonstram a expressão de NMBR em diferentes tipos de tumores, como câncer de pulmão de pequenas células e de não pequenas células (11,12),

carcinóides intestinais, tímicos e bronquiais (13), câncer epiteliais ovarianos (14) e glioblastomas (15,16). NMB, por sua vez, é relacionada ao crescimento de tumores como câncer de cólon e pulmão (17,18). Devido a essas observações, sugere-se que a interação NMB/NMBR seja responsável por uma sinalização autócrina envolvida na proliferação de células tumorais (19).

A relação de NMB e NMBR com câncer e o envolvimento de NMB no desenvolvimento neuronal (20) indica uma provável função de NMB/NMBR em tumores do sistema nervoso central. Evidências iniciais dessa relação foram demonstradas por Moddy e colaboradores (1995), os quais confirmaram que NMB liga-se com alta afinidade a células de linhagem C6 de glioma e é capaz de induzir a proliferação dessas células (21). A correlação entre NMB/NMBR e outros tumores do sistema nervoso central é pouco estudada, e não há estudo prévio analisando a expressão desse peptídeo e do seu receptor em meduloblastoma.

Assim, nesse trabalho, nós examinamos a expressão do NMBR e NMB nas linhagens celulares de meduloblastoma humano Daoy, D283 e ONS-76 e sua possível relação com a proliferação celular.

Materiais e Métodos

Cultura Celular e Tratamentos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da instituição. As linhagens celulares de meduloblastoma humano Daoy, D283 e ONS-76 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), e ONS-76 do *Institute for Fermentation* (Osaka, Japão). 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 fungizone, 100 U/L de gentamicina e 2,5% de ampicilina. As células foram mantidas a temperatura de 37°C, umidade relativa mínima de 95% e atmosfera de CO₂ de 5%.

Para avaliação de proliferação celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços em densidade de 6X10³ células por poço em quintuplicata. Após 24 h, as culturas foram submetidas à quiescência por 24 h em meio com 0,5% de SFB e então tratadas com NMB (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ou com o antagonista NMBR, BIM 23 127 (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), porém sem indução de quiescência. As doses das drogas foram escolhidas com base em estudos prévios que utilizavam metodologia e tratamento similar.

Método do MTT

Viabilidade celular foi medida através da reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT; Sigma-Aldrich) 48 h após o tratamento. Cada poço foi lavado com solução de Hank's (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brasil) e o MTT foi adicionado a uma concentração final de 10%. As células foram então encubadas por 4 h a 37°C. A placa permaneceu em temperatura ambiente até secar completamente. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em Dimetil sulfóxido (DMSO) e a absorbância foi lida a 492 nm em espectrofotômetro (23).

RT-PCR

A análise da expressão de mRNA de NMBR e NMB foi realizada por RT-PCR. O RNA total das linhagens Daoy, D283 e ONS-76 foi extraído utilizando o reagente TRIzol

(Invitrogen) 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 e NMB foram desenhados 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' TGAAGGTTCATTGAGCACA 3'

Como controle foi utilizada β -actina:

Forward primer: 5' AACTGGAACGGTGAAGGTG 3'

Reverse primer: 5' AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT 3'

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

A amplificação consistiu de 1 min a 95°C seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 59°C por 30 s, extensão de primers a 72°C por 45 s, e uma extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de NMBR (114 bp), NMB (367 bp) e β -actin (190 bp) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (22,23).

Análise estatística

Os resultados 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). Valor de *P* menor do que 0,05 foi utilizado como indicador de diferenças significativas.

Resultados e Discussão

Meduloblastoma expressa NMBR

A análise de RT-PCR demonstrou que as células Daoy, D283 e ONS-76 expressam mRNA de NMBR. A amplificação com primers específicos para NMBR gerou produtos com o tamanho esperado (114bp) em todas as amostras (Fig.1). Nenhum produto de PCR foi detectado no controle negativo, descartando a possibilidade de contaminação. Esse é o primeiro estudo a demonstrar a expressão de NMBR em meduloblastomas.

FIGURA 1

Meduloblastoma é um tumor do sistema nervoso central que ocorre no cerebelo e acredita-se que sua origem esteja relacionada a células progenitoras neuronais dessa estrutura (24). A expressão de receptores da família da bombesina tem sido estudada no desenvolvimento do cerebelo. Iwabuchi e colaboradores (2006) caracterizaram a expressão de NMBR e outros receptores durante o desenvolvimento embrionário de cerebelo de galinhas e demonstraram que a expressão do NMBR diminui gradativamente com o passar do desenvolvimento (25). Assim, a expressão de mRNA de NMBR em

meduloblastomas indicaria a manutenção de um estado indiferenciado das células desse tumor, confirmando a hipótese de sua origem.

A expressão de NMBR foi caracterizada também em linhagem de glioma C6. Estudo de Moody e colaboradores (2000) demonstrou que, nessa linhagem, antagonistas desse receptor são capazes de inibir a proliferação celular. Nesse estudo, os autores sugerem a produção endógena de peptídeos similares a NMB pelas células tumorais e a utilização desse peptídeo como fator de crescimento (26).

Meduloblastoma expressa NMB endógeno

A expressão do agonista endógeno de NMBR, NMB, também foi analisada por RT-PCR. As linhagens Daoy, D283 e ONS-76 expressaram mRNA de NMB. A amplificação com primers específicos gerou produtos com o tamanho esperado (367bp) em todas as amostras, porém ocorreu a amplificação de banda com peso molecular menor nas linhagens de ONS-76 e Daoy (Fig.2). Uma vez que não houve amplificação do controle negativo, descartando a hipótese de contaminação, a segunda banda pode ser decorrente de um *splicing* alternativo do gene de NMB. Esse é o primeiro estudo a demonstrar a expressão de NMB em meduloblastomas.

FIGURA 2

A expressão de NMB ocorre em câncer de pulmão (27,28) e de cólon (29). NMB é expressa em tecido epitelial de cólon normal (29) e está envolvida no desenvolvimento do pulmão (30). Assim como nesses tecidos, o cerebelo, local onde ocorre a maioria dos meduloblastomas, apresenta baixa expressão de NMB (10). Essas evidências indicam o

papel fisiológico desse peptídeo e sua relação com o desenvolvimento de tumores pode envolver a expressão ou liberação alterada desse peptídeo.

Assim como em meduloblastoma, a coexpressão de NMB e NMBR ocorre em outros tumores. Matusiak e colaboradores (2005) detectaram 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 (19).

Tratamento com NMB exógena e BIM-23127 não altera a taxa de proliferação celular

Para avaliar a possível influência do NMBR sobre a poliferação celular, tratamentos com o agonista NMB e com o antagonista BIM-23127 foram realizados. Ambos os tratamentos não afetaram a proliferação das células Daoy, D283 e ONS-76 (Fig.3).

FIGURA 3

Apesar de as linhagens de meduloblastomas analisadas apresentarem coexpressão de NMB e NMBR, o envolvimento dessa interação no crescimento celular não foi confirmado. A expressão, em meduloblastoma, de outro receptor similar a bombesina, o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR), foi investigada por um estudo anterior e, assim como no estudo atual, o receptor estava presente em todas as linhagens utilizadas, mas nenhum efeito na proliferação foi encontrado (31).

Uma possível explicação para a falta de efeito dos ligantes de NMBR em meduloblastoma poderia ser que, nesse tumor, NMB age regulando a diferenciação, não

sendo essencial para a proliferação celular. Uma segunda explicação é baseada na dinâmica de seu receptor. Após o acoplamento com o seu ligante, o NMBR é rapidamente internalizado. Benya e colaboradores (1994) demonstraram que após estimulação com agonista, ocorre a internalização de NMBR, a qual foi confirmada pela diminuição no número de receptores, e a dessensibilização, que foi confirmada pela diminuição no aumento de Ca^{++} intracelular (32). Esse efeito de dessensibilização poderia estar ocorrendo nas células de meduloblastoma utilizadas nesse estudo, uma vez que elas expressam NMB.

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar a expressão de NMBR e NMB em linhagens de meduloblastoma humano Daoy, ONS-76 e D283. Apesar de os resultados indicarem que a interação de NMBR/NMB não influencia na proliferação de meduloblastoma, o receptor de NMBR pode ser utilizado como alvo para a entrega de fármacos devido a sua rápida internalização (33). Devido a possibilidade de ser utilizado como alvo terapêutico, será importante o desenvolvimento de mais estudos que determinem a relação de NMB/NMBR e meduloblastoma.

Apoio Financeiro

Esta pesquisa foi subvencionada pela Fundação SOAD para Pesquisa do Câncer (SOAD), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Instituto do Câncer Infantil (ICI), pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Translacional em Medicina.

Referências

1. Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ (2007) Medulloblastoma in childhood: New biological advances. *Lancet Neurology*. 6:1073-1085
2. Packer RJ, Vezina G (2008) Management of and prognosis with medulloblastoma: Therapy at a crossroads. *Archives of Neurology*. 65:1419-1424
3. Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A (2008) Medulloblastoma: From molecular pathology to therapy. *Clinical Cancer Research*. 14:971-976
4. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, et al (2008) Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15: 58-64
5. Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, et al (2008) International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol. Rev.* 60:1-42
6. Yegen BC (2003) Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. *Curr. Pharm. Des.* 9:1013-1022
7. Severi C, Jensen RT, Erspamer V et al (1991) Different Receptors Mediate the Action of Bombesin-Related Peptides on Gastric Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol.* 260:683-690
8. Wada E, Way H, Kusano SK, et al (1991) cDNA cloning, characterization and brain region-specific expression of a neuromedin-B preferring bombesin receptor. *Neuron*. 6:421-430

9. Rouissi N, Rhaleb NE, Natel F, et al (1991) Characterization of bombesin receptors in peripheral contractile organs. *Br. J.Pharmacol.* 103: 1141-1147
10. Ohki-Hamazaki H (2000) Neuromedin B. *Progress in Neurobiol.* 62:297-312
11. Corjay MH, Dobrzanski DJ, Way JM, et al (1991) Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 266:18771-18779
12. DeMichele MA, Davis AL, Hunt JD, et al (1994) Expression of mRNA for Three Bombesin Receptor Subtypes in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11: 66-74
13. Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, et al (2002) Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand ^{125}I -[D-TYR⁶, β -ALA¹¹, PHE¹³, NLE¹⁴] Bombesin (6-14). *Clinical Cancer Research.* 8:1139-1146
14. Sun B, Schally AV, Halmos G (2000) The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul. Pept.* 90:77-84
15. Wang LH, Battey JF, Wada E, et al (1992) Activation of neuromedin B-preferring bombesin receptors on rat glioblastoma c-6 cells increase cellular C^{2+} and phosphoinositides. *Biochem. J.* 286:641-648
16. Sharif TR, Luo W, LSharif M (1997) Functional expression of bombesin receptor in most adult and pediatric human glioblastoma cell lines: role in mitogenesis and in

stimulating the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 130:119-130

17. Cassano GRN, Gasparre G, Lippe C, et al (2001) The proliferative response of HT-29 human colon adenocarcinoma cells to bombesin-like peptides. *CancerLett* 172:151-157

18. Siegfried JM, Krishnamachary N, Davis AG, et al (1999) Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 12:291-302

19. Matusiak D, Glover S, Nathaniel R, et al (2005) 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

20. Battey J, Wada E, Wray S (1994) Bombesin receptor gene expression during mammalian development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 739:244-252

21. Moody TW, Fagarasan M, Zia F (1995) Neuromedin B Stimulates Arachidonic Acid Release, c-Fos Gene Expression, and the Growth of C6 Glioma Cells. *Peptides.* 16(6):1133-1140

22. Farias CB, Lima LC, Lima LO, et al (2008) Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* 75:27-31

23. Flores DG, Farias CB, Oliveira MS, et al (2008) Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Cur. Neurovasc. Res.* 5:99-105
24. Gilbertson RJ, Ellison DW (2008) The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3:341-365
25. Iwabuchi M, Maekawa F, Tanaka K, et al (2006) Overexpression of Gastrin-releasing Peptide Receptor Induced Layer Disorganization in Brain. *Neuroscience.* 138: 109-122
26. Moody TW, Jensen RT, Garcia L, et al (2000) Nonpeptide neuromedin B receptor antagonists inhibit the proliferation of C6 cells. *Europ. J. Pharmacol.* 409: 133-142
27. Cardona C, Rabbitts PH, Spindel ER, et al (1991) Production of neutromedin B and Neutromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res.* 51:5205-5211
28. Giaccone G, Battey G, Gazdar AF, et al (1992) Neuromedin B is present in lung cancer cell lungs. *Cancer Res.* 52: 2732-2736
29. Chave HS, Gough AC, Palmer K, et al (2000) Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br. J. Cancer* 82:124-130
30. Spindel ER (1996) Roles of bombesin-like peptides in lung development and lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:407-408

31. Schimidt AL, Farias CB, Abujamra AL, et al (2010) BDNF and PDE4, but not the GRPR, Regulate Viability of Human Medulloblastoma Cells. *J. Mol. Neurosci.* 40:303-310
32. Benya RV, Kusui T, Shikado F et al (1994) Desensitization of Neuromedin B Receptors (NMB-R) on Native and NMB-R-transfected Cells Involves Down-regulation and Internalization. *J. Biol. Chem.* 269 (16):11721-11728
33. Moody TW, Sun L, Mantey SA et al (2006) In Vitro and in Vivo Antitumor Effects of Cytotoxic Camptothecin-Bombesin Conjugates Are Mediated by Specific Interaction with Cellular Bombesin Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(3):1265-1272

Legendas das figuras

Figura 1: Análise de RT-PCR de mRNA de NMBR em linhagem de meduloblastoma humano. RNA foi extraído das células Daoy, D283 e ONS-76 e análise de RT-PCR foi realizada. Um transcrito de 114 bp, representando o fragmento de NMBR, foi identificado em todas as três linhagens celulares. A expressão de β -actina, fragmento de 190bp, foi utilizada como controle. P: padrão de pares de base.

Figura 2: Análise de RT-PCR de mRNA de NMB em linhagem de meduloblastoma humano. RNA foi extraído das células Daoy, D283 e ONS-76 e análise de RT-PCR foi realizada. Um transcrito de 367 bp, representando o fragmento de NMB, foi identificado em todas as três linhagens celulares. Um fragmento menor foi amplificado, sugerindo um splicing alternativo desse gene, uma vez que não houve contaminação (N:controle negativo). A expressão de β -actina, fragmento de 190bp, foi utilizada como controle. P: padrão de pares de base.

Figura 3: Tratamento por 48 h com agonista (NMB) e antagonista (BIM-23127) de receptor de neuromedina B (NMBR) não influenciam a proliferação celular de linhagens de meduloblastoma. Dados são expressos como média \pm desvio padrão da média da porcentagem do número de células encontradas após 48h de tratamento com (A) NMB (10, 100, 1.000 ou 10.000 nM) ou com (B) BIM-23127 (10, 100, 1.000, 10.000 nM) comparado com o número de células encontradas no meio sem tratamento e com 10% de soro fetal bovino (FBS) (controle), o qual foi aceito como 100%; n = 3 repetições.

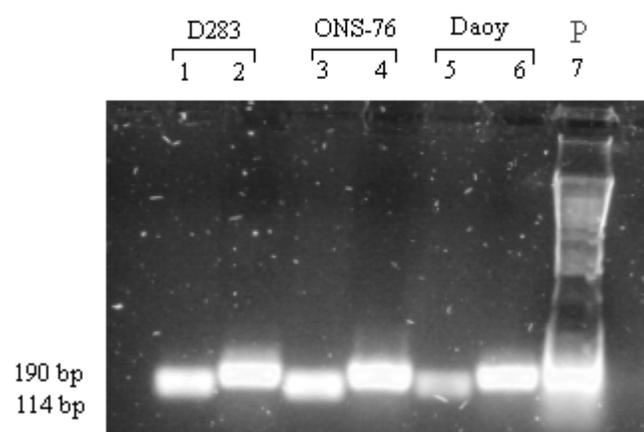
Figuras**Figura 1**

Figura 2

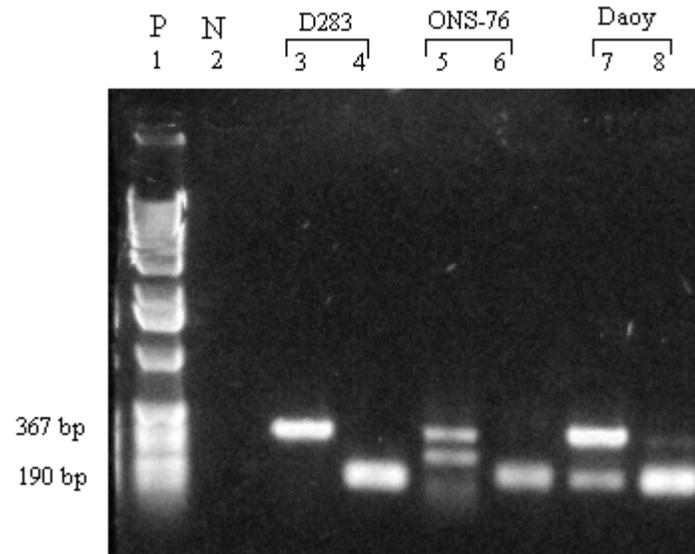
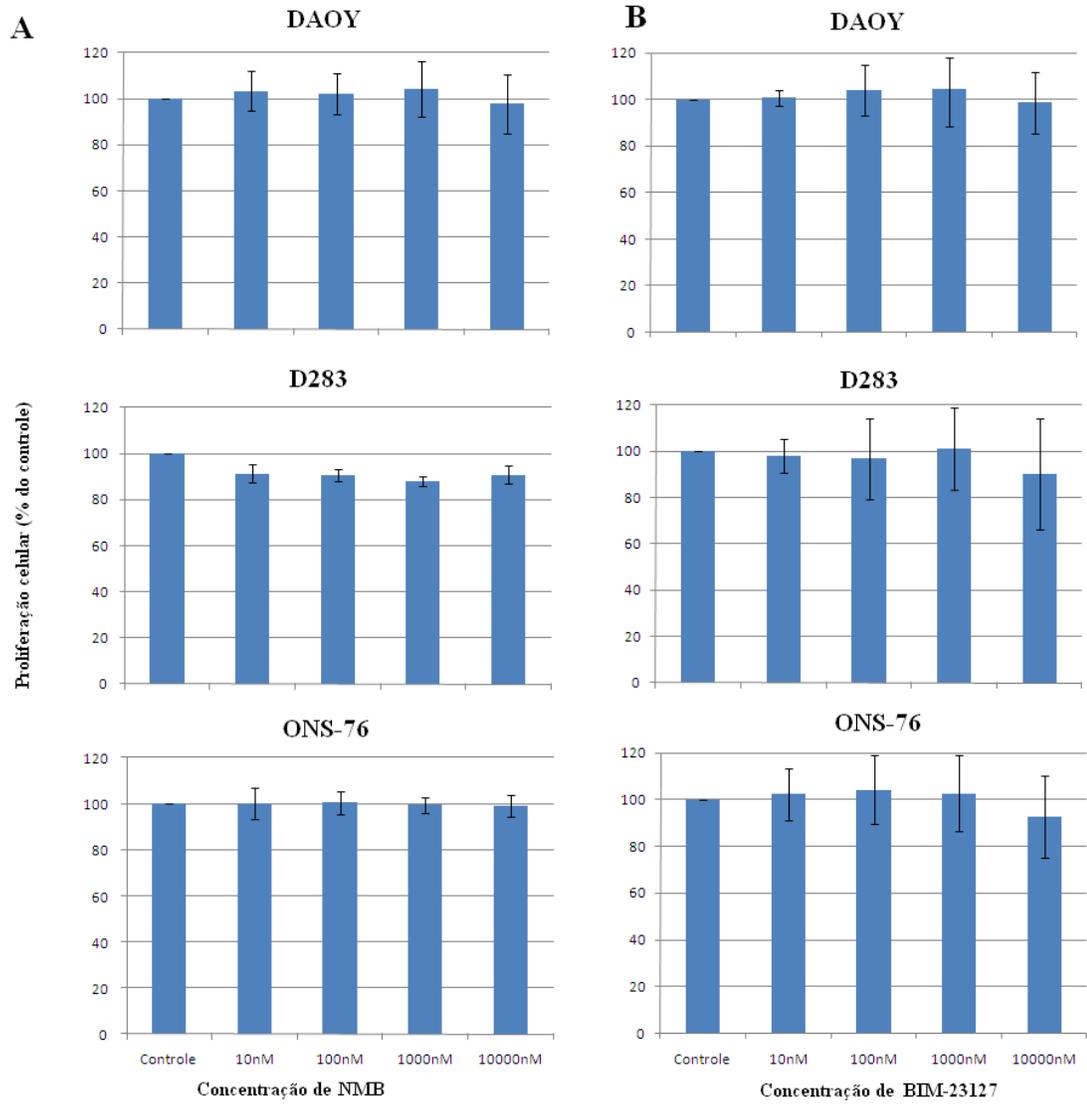


Figura 3



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão do receptor de neuromedina B (NMBR) e de seu ligante, neuromedina B (NMB), bem como o possível efeito do agonista e do antagonista desse receptor sobre a proliferação de células de meduloblastoma humano *in vitro*, uma vez que esses poderiam ser alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de terapias-alvo para meduloblastomas.

Este trabalho mostrou que as linhagens de meduloblastoma humano Daoy, D283 e ONS-76 expressam o receptor NMBR e NMB. No entanto, os tratamentos por 48 h com o agonista de NMBR, neuromedina B, e com o antagonista de NMBR, BIM-23127, não tiveram efeito sobre a proliferação celular dessas linhagens.

O NMBR sofre internalização após ativado e este fenômeno reduz os efeitos de NMB ou de outro ligante, o que poderia estar interferindo nos experimentos. Assim, a determinação da localização desses receptores auxiliaria na compreensão dos resultados. Uma vez que já existem anticorpos específicos para esse receptor, a realização de análise imunohistoquímica seria viável e complementar os resultados deste trabalho.

Como demonstrado, células tumorais de meduloblastoma expressam mRNA de NMB, então seria importante determinar se esse neuropeptídeo é secretado para o meio. A detecção de NMB secretada em meio celular de outros tumores é descrita na literatura e o resultado dessa análise poderia confirmar uma possível sinalização autócrina de NMB em células de meduloblastoma humano.

Os resultados apresentados nesse trabalho são insuficientes para determinar a importância ou relevância de NMB/NMBR em meduloblastomas. Estudos adicionais são necessários para ampliar o conhecimento sobre a influência desse peptídeo e seu receptor nesse tumor.

5. BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

- 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*. **1971**, 27: 166-167.
- Carlotti CG, Smith C, Rutka JT. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev*. **2008**, 31: 359–369.
- 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*. **1991**, 266: 18771-18779.
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischeler A, Minna JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer cells. *Nature*. **1985**, 316: 823-826.
- 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*. **1994**, 11: 66-74.
- Ellison DW, Clifford SC, Gajjar A, Gilbertson RJ. What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *European Journal of Paediatric Neurology*. **2003**, 7: 53-66.
- Erspamer V, Erspamer GF, Mazzanti G, Endean R. Active peptides in the skins of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. *Comp Biochem Physiol C*. **1984**, 77: 99-108.
- Fuller GN, Scheithauer BW. Symposium: The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: Newly Codified Entities. *Brain Pathology*. **2007**, 17 (3): 304-307.

- Gessi M, Maderna E, Guzzetti Z, Cefalo G, Massimino M, Solero CL, Finocchiaro G, Pollo B. Radiation-induced glioblastoma in a medulloblastoma patient: a case report with molecular features. *Neuropathology*. **2008**, 28: 633-639.
- Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, Ohgaki H. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta Neurophatol*. **2006**, 112: 5-12.
- Gilbertson RJ. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *The Lancet Oncology*. **2004**, 5: 209-218.
- Gilbertson R.J.; Ellison D.W. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. **2008**, 3: 341-365
- 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*. **2008**, 15:58-64.
- Guessous F, Li Y, Abounader R. Signaling Pathways in Medulloblastoma. *J. Cell. Physiol*. **2008**, 217: 577-583.
- Iwabuchi M.; Maekawa F.; Tanaka K.; Ohki-Hamazaki H. Overexpression of Gastrin-releasing Peptide Receptor Induced Layer Disorganization in Brain. *Neuroscience*. **2006**, 138: 109-122.
- Jensen R. T.; Battey J. F.; Spindel E. R.; Benya R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Boombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling and Functions in Normal and Disease States. *Pharnacol Rev*. **2008**, 60: 1-42.
- Jensen RT, Moody TW. Bombesin-related peptides and neurotensin: effects on cancer growth/proliferation and cellular signaling in cancer, em *Handbook of Biologically Active Peptides* (Kastin AJ ed). **2006**, pp 429-434. Elsevier, Amsterdam.

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **2007**, 114: 97-109.
- Marino S. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *TRENDS in Molecular Medicine.* **2005**, 11(1): 17-22.
- McDonald TJ, Jornvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* **1979**, 12: 227-233.
- Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* **1983**, 114: 541-548.
- 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.* **1985**, 130: 685-691.
- 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.* **1995**, 16: 1133-1140.
- Mutti CF, Paula CC, Souto MD. Assistência à Saúde da Criança com Câncer na Produção Científica Brasileira. *Revista Brasileira de Cancerologia.* **2010**, 56(1): 71-83.
- Ohki-Hamazaki H, Iwabuchi M, Maekawa F. Development and Function of Bombesin-Like Peptides and Their Receptors. *Int J Dev Biol.* **2005**, 49: 293-300.
- Ohki-Hamazaki H. Neuromedin B. *Progress in Neurobiology.* **2000**, 62: 297-312.
- Orbuch M, Taylor JE, Coy DH, Mrozinski JE, Mantey SA, Battey JF, Moreau J, Jensen R. T. Discovery of a Novel Class of Neuromedin B Receptor Antagonists, Substituted Somatostatin Analogues. *Molecular Pharmacology.* **1993**, 4: 841-850.
- Packer RJ, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, Muraszko K, Rorke LB, Wara WN, Cohen BH, Boyett JM. Treatment of children with medulloblastomas

- with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol.* **1999**, 17: 2127-2136.
- Palmer SL, Reddick WE, Gajjar A. Understanding the cognitive impact on children who are treated for medulloblastoma. *J Pediatr Psychol.* **2007**, 32: 1040-1049.
- Patel O, Shulks A, Baldwin GS. Gastrin-Releasing Peptide and Cancer. *Biochem Biophys Acta.* **2006**, 1766: 23-41.
- Perez-Martinez A, Lassaletta A, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Diaz MA, 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.* **2005**, 71: 33-38.
- Ris MD, Packer R, Goldwein J, Jones-Wallace D, Boyett JM. Intellectual outcome after reduced-dose radiation therapy plus adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* **2001**, 19: 3470-3476.
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* **2007**; 26: 3291-3310.
- 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.* **2005**, 21(11):940-944.
- Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy. *Clin Cancer Res.* **2008**, 14(4): 971-976.
- Sano H, Feighner SD, Hreniuk DL, Iwaasa H, Sailer AW, Pan J, Reitman ML, Kanatani A, Howard AD, Tan CP. Characterization of the Bombesin-Like Peptide receptor Family in Primates. *Genomics.* **2004**, 84: 139-146.
- Schally AV, Comaru-Schally AM, Plonowski A, Nagy A, Halmos G, Rekasi Z. Peptide analogs in the therapy of prostate cancer. *Prostate.* **2000**, 45: 158-166.

- Serafim A, Vilanova LCD, Silva SN. Neurological evaluation of children and adolescents with brain tumor, based on ambulatory-oriented follow-up. *Arq Neuropsiquiatr.* **2001**, 59(4): 849-53.
- Torres LF, Jacob GV, Reis-Filho JS, de Noronha L. Primary pediatric tumours of central nervous system: anatomopathology study of 623 cases. *Arq Neuropsiquiatr.* **1997**, 55(4): 795-800.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* **2002**; 2: 489-501.
- Wang D, Boerner SA, Winkler JD, LoRusso PM. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1773: 1248-55.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell.* **2008**, 14: 135-145.

6. ANEXOS

6.1. Normas para publicação do manuscrito

Terms of Manuscript Consideration

Submission is a representation that the manuscript has not been published previously and is not currently under consideration for publication elsewhere. A statement transferring copyright from the authors (or their employers, if they hold the copyright) to Springer will be required before the manuscript can be accepted for publication. The form for this transfer can be found on the opening screen of the on-line manuscript submission web site

<http://editorialmanager.nere.com/> (please use the link above!)

or in the journals web site: (please use the link below). Such a written transfer of copyright, which previously was assumed to be implicit in the act of submitting a manuscript, is necessary under the U.S. Copyright Law in order for the publisher to carry through the dissemination of research results and reviews as widely and effectively as possible.

<http://www.springer.com/west/home/generic/search/results?SGWID=4-40109-70-35549743-0>

Manuscript Organization

A. Copy guidelines

- Manuscripts should be typed double-spaced on 8 1/2 inch opaque paper with margins of at least 1 inches all around.

B. Title page

A title page is to be provided and should include

- the title of the article
- author's name (no degrees)
- author's affiliation
- and suggested running head

The affiliation should comprise

- the department
- institution (usually university or company)
- city
- and state (or nation)

and should be typed as a (numbered) footnote to the author's name. The suggested running head should be less than 80 characters (including spaces) and should comprise the article title or an abbreviated version thereof.

For office purposes, the title page should include

- the complete mailing address
- telephone number
- fax number
- and e-mail address

if available, of the one author designated to review proofs. Proofs will be sent to corresponding authors via e-mail in PDF format. If an e-mail address is not available, paper proofs will be mailed to the address of the corresponding author.

The manuscripts should be arranged in the following order:

- title page
- body of article
- references

Tables, figure captions page, and figures should be on separate pages at the back of the manuscript.

C. Abstract

- An abstract of no more than 150 words should be provided on a separate page.

D. Key words

- A list of 4-6 key words should be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes.

E. Main text

Papers reflecting original results should be organized into the following sections:

- Introduction
- Experimental Procedure
- Results
- Discussion
- and References

The use of subheadings in the Experimental Procedure, Results, and Discussion sections is recommended. All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be consolidated in a separate section directly preceding the References.

F. Figures

- Illustrations (photographs, drawings, diagrams, and charts) should be numbered in one consecutive series of Arabic numerals and referred to by number in the text.
- Include an indication of "top," if not obvious
- Each figure should have an accompanying brief but adequate caption, and all figure captions should be on a separate sheet.
- Electronic artwork should be in TIFF or EPS format (1200 dpi for line and 300 dpi for half-tone and gray-scale art).
- Color art should be in the CYMK color space.
- Artwork should be separated from the text, and hard copy must accompany the disk.
- The publisher charges \$1150 per article for color printing. Color figures on the web are free of charge.

G. Tables

- Tables should be numbered in one consecutive series of Roman numerals and referred to by number in the text.

H. References

References should be typed double-spaced in a separate section at the end of the paper and numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Cite in the text by the appropriate Arabic numeral enclosed in parentheses on the base line. In references to journal articles, please include: (1) surname and initials (without periods) of the first three authors and et al. for all others, (2) year in parentheses, (3) article title, (4) abbreviated journal name, (5) volume number followed by a colon, and (6) inclusive page numbers. An example follows:

- Laskin RS, Beksac B, Phongkunakorn A et al (2004) Minimally invasive total knee replacement: an outcome study. *Clin. Orthop.* 428:74--81

In references to books, please include: (1) surname and initials (without periods) of the first three authors and et al. for all others, (2) year in parentheses, (3) chapter title, if any, (4) editor(s), if any, (5) title of book, (6) publisher, (7) city of publication, and (8) inclusive page numbers. Volume and edition numbers, and name of translator should be included when appropriate. Examples follow:

- Harlan BJ, Starr A, Harwin FM (1996) Anesthesia for cardiac surgery. In: *Illustrated handbook of cardiac surgery*. Springer-Verlag, New York, pp 6—12
- Jones MC, Smith RB (1976) Treatment of gastric cancer. In: Ford TL (ed) *Cancer of the digestive system*. Springer-Verlag, Berlin, pp 140--154

I. Footnotes

- Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be typed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text. Use the appropriate superscript numeral for citation in the text.