

**FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**MARIANA MILANO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CADERINAS EM  
LINHAGEM HUMANA DE ADENOCARCINOMA  
COLORRETAL APÓS TRATAMENTO COM  
INIBIDOR DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE  
GASTRINA, RC-3095**

**Porto Alegre  
2009**

MARIANA MILANO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CADERINAS EM LINHAGEM  
HUMANA DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL APÓS  
TRATAMENTO COM INIBIDOR DO PEPTÍDEO  
LIBERADOR DE GASTRINA, RC-3095**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Ryff M. R. Vianna

Porto Alegre

2009

MARIANA MILANO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CADERINAS EM LINHAGEM  
HUMANA DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL APÓS  
TRATAMENTO COM INIBIDOR DO PEPTÍDEO  
LIBERADOR DE GASTRINA, RC-3095**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

## DEDICATÓRIA

*As mulheres da minha vida, a minha Mãe **Fernanda**, exemplo de mãe e mulher, contribuindo para formação do meu caráter e da pessoa que sou hoje, apoiando-me de maneira incondicional em todas as decisões, mesmo as mais difíceis e dedicando a mim e aos meus irmãos todo seu amor e cuidados.  
Sempre presente em meu coração.*

*A minha Irmã, **Júlia** pela pessoa maravilhosa que é, pelo apoio nas horas mais difíceis, conselhos e mesmo quando não se tem nada a dizer, a presença confortante. Pelo carinho, paciência e momentos de intensa alegria que me proporcionou e continua me proporcionando, em especial, com a chegada do Lucas.*

*A minha **Avó Manoela** pelo exemplo de mulher que é para mim, exemplo de fé em Deus, na vida e nas pessoas, por todo apoio que sempre me proporcionou especialmente nas decisões relacionadas à minha formação acadêmica e profissional e por sempre acreditar em mim até quando eu mesma não tinha mais tanta certeza.*

*Ao meu pai, **Humberto** pela inspiração, e exemplo de profissional, pelos valorosos conselhos ao apoio e incentivo na busca por meus objetivos.*

*Ao meu namorado **Leonardo** pelo apoio, compreensão e pelas palavras de força, ânimo e coragem sempre ditas nos momentos necessários, me incentivando e servindo de estímulo para continuar minha caminhada.*

*As minhas **amigas**, exemplos de amizade verdadeira, por sempre acreditaram em mim, e estarem sempre comigo me proporcionando momentos de alegria e descontração.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Professora Doutora **Mônica Ryff Moreira Rocca Vianna**, minha orientadora, exemplo a ser seguido como mulher, professora e pesquisadora. Pela paciência, conselhos, apoio e incansáveis incentivos, não medindo esforços para me ajudar no término deste trabalho.*

*Ao Professores Doutor **Rafael Roesler** pela intensa e contínua colaboração e ao Doutor **Mauricio Bogo** pela presteza e confiança em mim depositados, ambos disponibilizando-me seus laboratórios, sem os quais não finalizaria este trabalho.*

*Aos colegas **Caroline Brunetto de Farias**, **Denis Rosemberg** e **Laura Roesler** pela colaboração nos resultados desse trabalho.*

*Aos demais colegas do **LBDSN**, **Bioquímica**, **Genoma da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, e do **Laboratório de Pesquisas em Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** pela contribuição direta nesse trabalho ou indiretamente pela agradável convivência.*

*Aos membros da **CPGBCM**, em especial a Professora Doutora **Carla Bonan** pela oportunidade de conclusão deste mestrado.*

*E, finalmente, a **CAPES** pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

As caderinas desempenham um papel-chave na manutenção das adesões célula-célula e alterações em sua expressão têm implicações significativas na homeostasia tecidual, estando envolvidas na progressão do câncer. O RC-3095 é um antagonista sintético do receptor do peptídeo liberador de gastrina capaz de restringir o crescimento de tumores pela ação inibitória sobre proliferação, aumento da motilidade e morfogênese de células tumorais, representando uma nova e promissora estratégia farmacológica no tratamento anti-tumoral. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do tratamento com RC-3095 durante a progressão tumoral da linhagem de adenocarcinoma colorretal HT-29 sobre a expressão de caderinas dos tipos E e N. Nossos resultados corroboram achados prévios que demonstraram o efeito negativo do RC-3095 sobre a viabilidade celular, reforçando seu potencial no tratamento do câncer colorretal. O tratamento com RC-3095, contudo, não alterou o perfil de expressão de caderinas durante o período de 48h estudado. Neste período não foi detectada expressão de caderina do tipo N, enquanto a expressão de caderina E diminuiu progressivamente independente do tratamento com RC-3095, sugerindo que a adesividade celular não é alvo do antagonista do receptor do peptídeo liberador de gastrina nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** E-caderina. N-caderina. RC-3095. Droga anticâncer. Adenocarcinoma colorretal. Peptídeo liberador de gastrina.

## **ABSTRACT**

Cadherins play a crucial role in tissue homeostasis by maintaining cell-cell adhesion, and therefore have been implicated in cancer progression. The synthetic antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor RC-3095 have been shown to inhibit tumor growth by repressing cell proliferation, motility and morphogenesis, and is pointed as a promising anti-cancer drug. This work aimed to evaluate the effect of RC-3095 treatment on colorectal adenocarcinoma HT-29 cell line upon E and N cadherin expression. Our results corroborate previous findings demonstrating the negative effect of RC-3095 on cell viability, reinforcing its potential anti-cancer effect. However, our results failed to establish a correlation between RC-3095 treatment and cadherin expression, suggesting that modulation of cell adhesiveness is not a target of RC-3095 under these conditions. N cadherin was not detected while E cadherin expression decreased progressively along the 48h period tested.

**Key words:** E-cadherin. N-cadherin. RC-3095. Anticancer drug. Colon cancer. Gastrin releasing Peptide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Principais famílias de moléculas de adesão .....	11
Figura 2 - Superfamília das caderinas: representação da estrutura das Caderinas expressas no sistema nervoso .....	12
Figura 3 - Molécula de caderina clássica representando o domínio extracelular com os cinco domínios de caderina e o domínio citoplasmático com as cateninas p120, $\beta$ -catenina e $\alpha$ -catenina responsáveis pela modulação das adesões e sinalização celular.....	14
Figura 4 - Localização de duas diferentes caderinas durante o processo de neurulação.....	17



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	09
1.1 INTRODUÇÃO .....	10
<b>1.1.1 Moléculas de adesão celular</b> .....	10
1.1.1.1 Caderinas .....	11
<b>1.1.2 Transição Epitélio-mesenquimal na Embriogênese</b> .....	15
<b>1.1.3 Câncer</b> .....	17
1.1.3.1 Câncer e Caderinas.....	18
<b>1.1.4 Novos alvos terapêuticos seletivos no tratamento anticâncer</b> .....	19
1.1.4.1 Peptídeo liberador de gastrina (GRP) .....	21
1.1.4.2 RC-3095 .....	23
<b>1.1.5 Adenocarcinoma Colorretal</b> .....	23
1.2 JUSTIFICATIVA .....	24
1.3 OBJETIVOS .....	25
<b>1.3.1 Objetivo geral</b> .....	25
<b>1.3.2 Objetivos específicos</b> .....	25
<b>CAPITULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	26
<b>CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>ANEXOS</b> .....	49
ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo.....	50

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Moléculas de adesão celular

As moléculas de adesão celular medeiam as adesões diretas célula-célula, bem como a adesão de receptores de superfície celular a componentes de matriz-celular. Essas interações ligam as células entre si, dando identidade e coesão aos tecidos, e facilitam a comunicação entre as células e o ambiente (TAKEICHI, 1995).

Graças aos grandes avanços nas técnicas de biologia celular e molecular, inúmeras moléculas de adesão celular puderam ser identificadas. Algumas grandes famílias foram descritas, e seus integrantes, embora com variações, seguem alguns padrões estruturais e funcionais básicos (TASIC et al., 2002). Dentre estas características, os domínios na estrutura protéica, a dependência de íons como o cálcio e a capacidade de estabelecer adesões heterofílicas ou homofílicas se destacam (TASIC et al., 2002; WHEELLOCK and JOHNSON, 2003; SHAPIRO et al., 2007). Atualmente, ainda é sabido que o produto de um mesmo gene pode originar distintas isoformas de um mesmo tipo de molécula, graças a modificações pós-transcricionais (TASIC et al., 2002; ROY and BERX, 2008; STAMMLER, 2008).

As mais proeminentes famílias de moléculas de adesão de superfície celular (figura 1) que medeiam a adesão célula-célula, foco deste estudo, são compostas pelas caderinas (WHEELLOCK; JOHNSON, 2003). Dentre aquelas que mantêm a adesão célula-matriz extracelular, estão as integrinas (STUPP; RUEGG, 2007) e selectinas (LODISH et al., 2005).

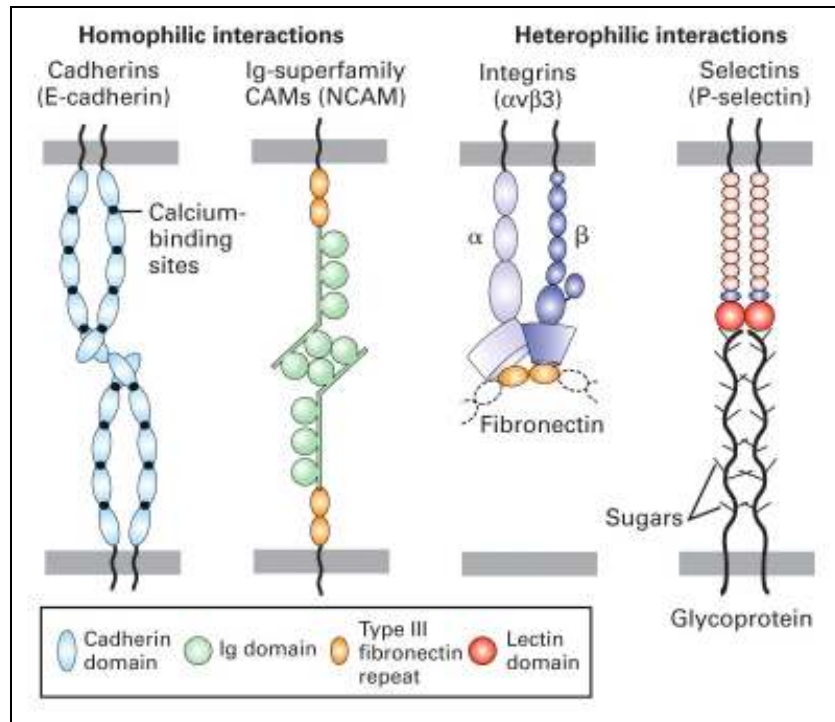


Figura1 - Principais famílias de moléculas de adesão

Fonte: Adaptado de Lodish et al. (2005).

### 1.1.1.1 Caderinas

As caderinas constituem uma ampla família de glicoproteínas com domínio extracelular responsável por interações célula-célula, um domínio transmembrana, e um domínio citoplasmático que frequentemente está ligado ao citoesqueleto (TAKEICHI, 1988; TAKEICHI, 1995; SHAPIRO et al., 2007). As caderinas têm um papel - chave nas interações célula-célula cálcio-dependentes e funcionam não somente para estabelecer adesões íntimas entre as células, mas também definem especificidade entre as adesões (HIRANO et al., 1987), inibindo a proliferação excessiva e a invasão de tecidos vizinhos (EDELMAN, 1986; CAVALLARO and CHRISTOFORI, 2001; WHEELLOCK and JOHNSON, 2003). Além disso, as caderinas podem interagir direta ou indiretamente com um grande número de vias de sinalização que regulam o comportamento celular (WHEELLOCK and JOHNSON, 2003; TAKEICHI, 2007).

As caderinas formam uma super família de moléculas de adesão celular que podem ser classificadas em pelo menos seis subfamílias, distinguidas das demais

com base na composição do domínio extracelular, estrutura genômica e análise filogenética da seqüência de suas proteínas (NOLLET et al., 2000). Essas subfamílias compreendem as caderinas clássicas ou de tipo I, as de tipo II, desmocolinas e desmogleínas que juntas compõem desmossomos, protocaderinas e caderinas flamingo (SHAPIRO et al., 2007), (figura 2).

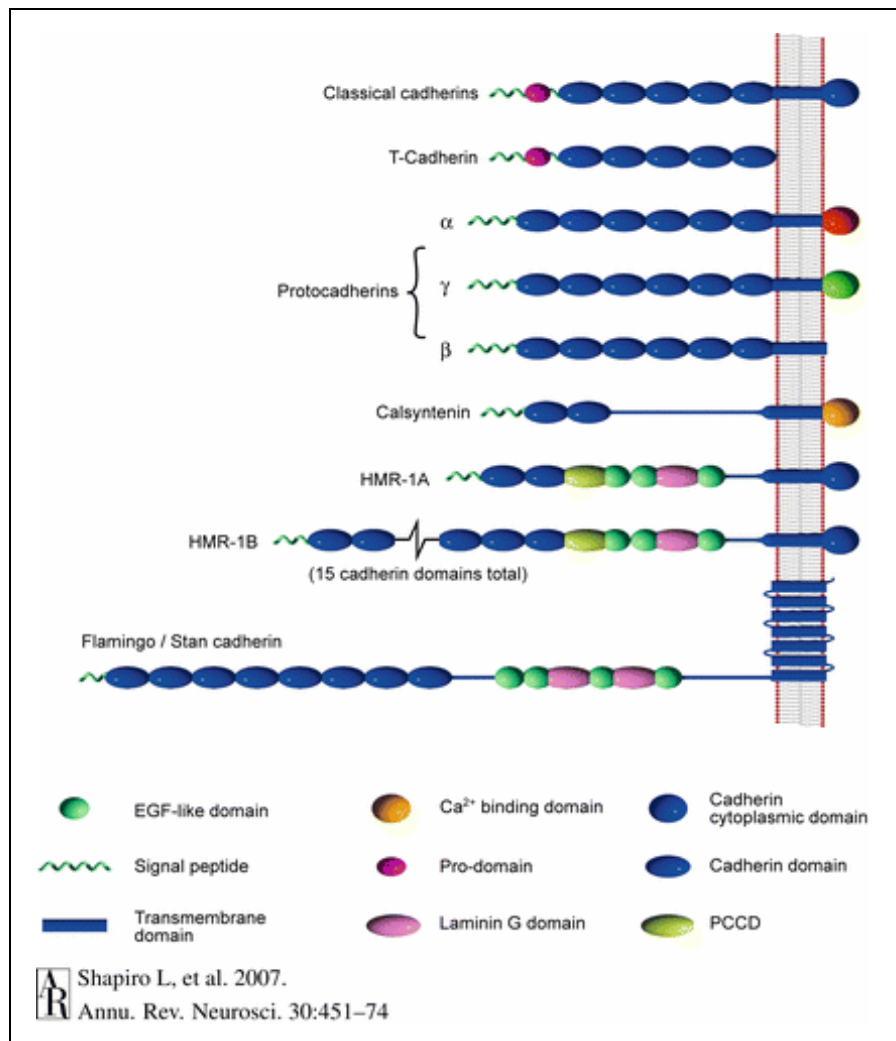


Figura 2 - Superfamília das caderinas: representação da estrutura das Caderinas expressas no sistema nervoso. Todos os membros desta família são proteínas extracelular tipo I. As caderinas clássicas apresentam cinco domínios de caderina extracelulares, um pró-domínio que deve ser clivado por uma protease que ativa a adesão e um domínio citoplasmático de interação com cateninas

Fonte: Adaptado de Shapiro et al. (2007).

Desde a descrição do primeiro membro desta superfamília, a caderina clássica do tipo epitelial, ou E-caderina, a família das caderinas cresceu e hoje inclui mais de 80 membros em vertebrados e invertebrados (NOLLET et al., 2000).

As caderinas também são divididas em subtipos distintos de acordo com o local onde são mais abundantemente expressas ou foram originalmente observadas: E-caderina, encontrada inicialmente e de forma mais abundante em epitélios; N-caderina encontrada primeiramente em tecido neural e fibroblastos (HATTA et al., 1987). As caderinas são encontradas na membrana das células comumente na forma de dímeros unidos por cálcio, (figura 3), e a adesão intercelular se dá pela interação dos domínios extracelulares típicos deste grupo, com aqueles de moléculas idênticas presentes em células vizinhas (TAKEICHI, 1988). O conjunto de adesões deste tipo entre membranas vizinhas estabelece o que é genericamente chamado de junção aderente (TAKEICHI, 1995). Esta interação em princípio é homofílica, de modo que, preferencialmente, células que expressam o mesmo subtipo de caderina mantêm adesões entre si (TAKEICHI, 1995).

As caderinas clássicas apresentam cinco domínios de caderinas (EC1-EC5) em sua porção extracelular (figura 3) (PEINADO et al., 2004), os quais são responsáveis pelas interações homofílicas entre moléculas. As caderinas clássicas, epitelial e neural, diferem entre si pela seqüência do domínio EC1. A associação de íons cálcio com a região de ligação conectando dois domínios de caderinas induz a mudança na conformação necessária para que o domínio extracelular de caderina medeie as interações de adesão (PEINADO et al., 2004). O domínio citoplasmático das caderinas também é conservado dentro de cada subfamília, e no caso das caderinas clássicas, é esse domínio que interage com as cateninas fazendo a ligação da caderina ao citoesqueleto de actina (figura 3) (WHEELLOCK and JOHNSON, 2003). E, embora o domínio extracelular seja suficiente para mediar o contato célula-célula, o domínio citoplasmático (figura 3) das caderinas é crucial para modular estas interações e para a sinalização celular (PEINADO et al., 2004).

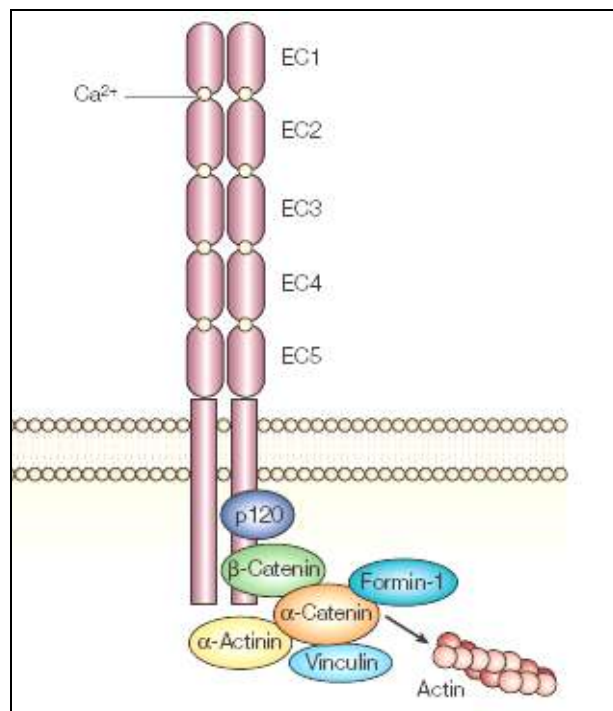


Figura 3 - Molécula de caderina clássica representando o domínio extracelular com os cinco domínios de caderina e o domínio citoplasmático com as cateninas p120, β-catenina e α-catenina responsáveis pela modulação das adesões e sinalização celular

Fonte: Gumbiner (2005).

Durante o desenvolvimento, a expressão de cada membro da família é espacial e temporalmente regulada de acordo com eventos morfogénéticos em que a adesão celular ou a segregação está envolvida (WHEELOCK and JOHNSON, 2003). Outros eventos como polarização, agregação e migração que ocorrem durante a formação dos tecidos na embriogénese também são dependentes de proteínas de adesão específicas (WHEELOCK and JOHNSON, 2003).

No desenvolvimento embrionário, as caderinas controlam a segregação de tecidos (TAKEICHI, 1995), mudanças estruturais e o próprio rearranjo celular, a transição de tecido epitelial a mesenquimal, migração celular e processos como a sinaptogénese (GUMBINER, 2005).

Já nos tecidos adultos, as caderinas estão envolvidas na coordenação da reposição de tecidos de crescimento rápido como a epiderme, na plasticidade e na regulação de sinapses, na regulação fisiológica do epitélio e das células das junções

endoteliais para permitir a passagem controlada de solutos, água e células linfóides através das camadas de células e na manutenção da organização e estabilidade do tecido prevenindo, a dissociação e propagação de células tumorais (GUMBINER, 2005).

Devido à importância das caderinas nos eventos supracitados, a perda da adesão entre as moléculas de caderina tem implicações significativas na homeostasia tecidual e está envolvida na evolução de doenças como o câncer (CHRISTOFORI and SEMB, 1999).

### **1.1.2 Transição Epitélio-mesenquimal na Embriogênese**

Durante os estágios iniciais da embriogênese, os três folhetos embrionários, ectoderma, mesoderma e endoderma, se formam através do processo ontogenético de gastrulação (THIERY, 2002), (figura 4). A gastrulação, em vertebrados, envolve um processo definido como transição epitélio-mesenquimal (TEM), no qual células desprendem-se do epitélio que constitui a futura ectoderme, formando um mesênquima migratório que passa através da fenda primitiva e ocupa a porção interna do embrião, dando origem aos precursores de mesoderma e endoderma (LEE et al., 2006). Após o processo de gastrulação, tem início um segundo fenômeno de transição epitélio-mesenquimal, a neurulação. Neste evento a ectoderme primitiva divide-se em dois grupos celulares: o primeiro composto de células epiteliais que se mantêm como ectoderme de revestimento no dorso do animal e que constituirão a epiderme e eventuais anexos de tegumento, e células que internalizadas dão origem ao sistema nervoso central e periférico. As células de neuroectoderme internalizadas neste processo poderão compor o tubo neural ou serem parte da ainda mais migratória crista neural (THIERY 2002; MOUSTAKAS and HELDIN, 2007). Nesse caso também as células mesenquimais alteram seu repertório de moléculas de adesão, adquirindo um perfil migratório, (figura 4).

A TEM tem um importante papel no desenvolvimento de tecidos durante a embriogênese, contudo alterações similares ocorrem em processos patológicos graves como o câncer (RADISKY, 2005), fazendo com que as células epiteliais retomem o seu fenótipo mesenquimal e adquiram um padrão menos adesivo e



migratório. Durante a transição de células epiteliais para mesenquimais são necessárias alterações na morfologia, arquitetura, adesão e capacidade migratória (RADISKY, 2005). As células progressivamente redistribuem ou reduzem a expressão de suas proteínas de adesão apical e basolateral e re-expressam moléculas mesenquimais (RADISKY, 2005). Essas mudanças conduzem a perda dos contatos célula-célula e o ganho de motilidade – mudanças necessárias à invasão. A recapitulação do processo de transição epitélio mesenquimal em processos patológicos é denominada *cadherin switch* – do inglês troca de caderina - e é induzida por vários fatores de crescimento, os quais são produzidos pelas próprias células tumorais ou pelas células do estroma e incluem o fator de crescimento transformado  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento tipo insulina (IGFs), o fator de crescimento de fibroblasto (FGFs) e também por super expressão da atividade proteolítica de metaloproteinases de matriz extracelular (CHISTOFORI, 2006).

Algumas moléculas são caracterizadas como marcadores moleculares para a TEM como: o aumento da expressão de N-caderina e vimentina, localização nuclear da  $\beta$ -catenina e aumento da transcrição de fatores como as Snail 1, snail 2, *twist*, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, e E47, que inibe a expressão de E-caderina. A presença desses marcadores determina o aumento da capacidade de migração e invasão tanto quanto resistência a apoptose (LEE et al., 2006).

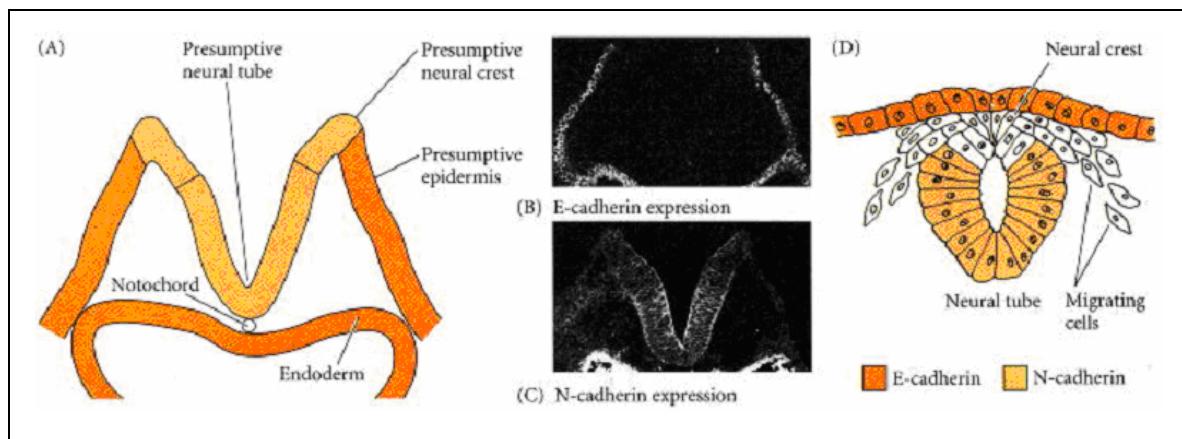


Figura 4 - Localização de duas diferentes caderinas durante o processo de neurulação. **(A)** Desenho esquemático representando o início da neurulação e indicando a expressão diferenciada de E-caderina (laranja) e N-caderina (amarelo). **(B)** e **(C)** Mostram imagens de imunofluorescência com anticorpos específicos contra E-caderina (B) e N-caderina (C) em cortes transversais de cérebro de rato de 8.5 dias. **(D)** Desenho esquemático representando os tecidos derivados de ectoderme ao final da neurulação, indicando a expressão diferenciada de E-caderina (laranja) e N-caderina (amarelo)

Fonte: Adaptado de Scott (2000).

### 1.1.3 Câncer

As mudanças genéticas e epigenéticas que envolvem a carcinogênese conduzem ao crescimento descontrolado do tecido tumoral (THOMPSON and NEWGREEN, 2005). O desenvolvimento de tumores malignos, em particular a transição de lesões benignas para malignas, é caracterizado pela habilidade das células tumorais em romper as adesões célula-célula e invadir os tecidos a sua volta (THOMPSON and NEWGREEN, 2005).

A quimioterapia e a radioterapia servem apenas como propostas paliativas na doença metastática, e algumas vezes oferecem uma modesta extensão do período de sobrevivência do paciente (STEEG, 2006). A morbidade e a mortalidade associadas à doença metastática podem resultar em dano direto ao órgão pelo crescimento das lesões, síndromes paraneoplásicas, ou por complicações do próprio tratamento (STEEG, 2006).

Muitas moléculas de adesão celular estão envolvidas na carcinogênese. Durante a transição de células normais para células tumorais altamente malignas, a

expressão de algumas dessas moléculas de adesão são inibidas enquanto a expressão de outras é ativada (MAEDA et al., 2004; BIRCHMEIER, 2005; MARIOTTI et al., 2007; MOUSTAKAS and HELDIN, 2007).

### 1.1.3.1 Câncer e Caderinas

Por volta de 90% dos cânceres se originam do tecido epitelial (CHRISTOFORI, 2006). A mudança morfológica mais aparente que ocorre durante a transição de um tumor benigno para um maligno e metastático é que as células perdem seu fenótipo altamente diferenciado, mudando da morfologia epitelial para a migratória e invasiva. As células tumorais metastáticas se tornam permeáveis à barreira da lâmina basal e invadem os tecidos a sua volta (HUBER et al., 2005).

Durante esse processo, as células redistribuem ou diminuem a expressão de suas moléculas de adesão, incluindo E-caderina, voltando a expressar moléculas mesenquimais, caracterizadas dentre outras, pela fibronectina, vitronectina e N-caderina (THIERY and SLEEMAN, 2006). Essas mudanças conduzem à perda dos contatos de adesão célula-célula e o ganho de motilidade por essas células – mudanças extremamente importantes para a aquisição do fenótipo invasivo (RADISKY, 2005).

A expressão de caderinas durante a progressão de tumores foi alvo de extensivos estudos nas últimas décadas, principalmente focados no papel que a E-caderina desempenha neste processo. A perda da expressão e/ou função dessa molécula de adesão foi observada na maioria dos carcinomas, e acredita-se que isto esteja relacionado às vias de sinalização que induzem a TEM (PEINADO et al., 2004) a qual, por sua vez, contribui para o comportamento invasivo dos processos malignos (RADISKY, 2005).

Entre as caderinas, a E-caderina é a mais amplamente estudada em processos neoplásicos, sendo caracterizada como uma molécula supressora de invasão tumoral e metástase (CHRISTOFORI and SEMB, 1999).

Recentes estudos indicam que a superexpressão de N-caderina pode estar correlacionada com o aumento do potencial invasivo em câncer de mama e que essa indução está relacionada também à diminuição da expressão de outras

caderinas, como a E-caderina (PEINADO et al., 2004). A neo-expressão de N-caderina tem sido também observada em outros tipos de tumores, como de próstata e carcinomas gastrintestinais (PEINADO et al., 2004), sugerindo um papel funcional para essa caderina na progressão do câncer. Essa hipótese pode ser suportada por dados que mostram que a atividade invasiva da N-caderina resultaria, ao menos em parte, da interação a receptores FGF na superfície das células, aumentando a transcrição de enzimas que degradam a matrix extracelular e possibilitando a dissolução e migração dessas células (ROY and BERX, 2008).

Em um estudo imunohistoquímico em que foram analisadas aproximadamente 600 amostras de tumores humanos, a Empresa Adherex<sup>1</sup> detectou em 100% dos cânceres de rim, útero, esôfago e laringe a expressão de N-caderina. O estudo também determinou que 87% dos cânceres de fígado, 83% dos cânceres colorretal e 60% dos carcinomas de pequenas células expressam N-caderina. Dessa forma, desenvolveu um peptídeo antagonista de N-caderina, o ADH-1®, o qual vem sendo aplicado com sucesso em testes como potencial droga antitumoral para várias neoplasias.<sup>2</sup>

Segundo esses pesquisadores, a molécula de N-caderina atua como um fator trófico para o tumor. Em cultivo de células, a inibição da adesão mediada pela N-caderina entre as células tumorais conduziu-as a apoptose, talvez pela ruptura do “sinal de sobrevivência” mediado por essa caderina (MARIOTTI et al., 2007). Baseado nessas evidências acredita-se que a ação antitumoral mediada pelo ADH-1® se deva a duas vias de atuação distintas: uma que induz apoptose e outra que promove angiólise dos vasos.<sup>3</sup>

#### **1.1.4 Novos alvos terapêuticos seletivos no tratamento anticâncer**

Na última década, os avanços na compreensão da biologia tumoral têm permitido a identificação de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer com mecanismos de ação específicos. As novas drogas

---

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.adherex.com/featuredlinks/ADH-1%20Copy%201/view>>.

<sup>2</sup> *Ibid.*

<sup>3</sup> Disponível em: <<http://www.adherex.com/products/ADH-1-08>>.

específicas com potencial uso terapêutico no tratamento do câncer incluem inibidores de vias de sinalização celular, tais como antagonistas de receptores de fatores de crescimento e inibidores de proteínas quinases envolvidas de forma importante no crescimento e proliferação de células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Acredita-se no desenvolvimento de inibidores de vias de sinalização celular como novas drogas antitumorais sendo fundamentais para o avanço da quimioterapia em tumores (IZBICKA; IZBICKI, 2005). Entre os novos alvos terapêuticos propostos para o desenvolvimento de inibidores de sinalização celular com potencial efeito antitumoral está o receptor do peptídeo liberador de gastrina (GRPR), a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (CORNÉLIO et al., 2007).

Alguns fármacos que atuam em vias de sinalização específicas já vêm beneficiando muitos pacientes: como o Avastin® (bevacizumabe) que atua na neutralização da atividade biológica do fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF), reduzindo a vascularização de tumores e inibindo assim o crescimento tumoral. Outra droga também comercializada pela Roche, o Herceptin® (trastuzumabe) é um anticorpo monoclonal que atinge seletivamente o domínio extracelular da proteína do receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O tarceva® (erlotinibe) potencialmente inibe a fosforilação intracelular de HER/EGFR. Nos modelos não-clínicos, a inibição da fosforilação do EGFR resulta em morte celular.<sup>4</sup>

Os receptores de fatores de crescimento parecem estar envolvidos em todas as etapas da progressão tumoral, aumentando a angiogênese, invasão local ou metástases. Além disso, a superexpressão de receptores de fatores de crescimento na superfície de células malignas pode estar associada a um comportamento mais agressivo e um prognóstico ruim. Por essas razões, tumores relacionados a receptores de fatores de crescimento são considerados como potenciais alvos para intervenções terapêuticas (CORNÉLIO et al., 2007).

---

<sup>4</sup> Disponível em: <[http://www.roche.com.br/Products/default\\_PT.htm](http://www.roche.com.br/Products/default_PT.htm)>.

#### 1.1.4.1 Peptídeo liberador de gastrina (GRP)

A hipótese autócrina para o desenvolvimento de cânceres postula que as células tumorais produzem fatores de crescimento e seus receptores, e que suas interações resultam em proliferação celular (PATEL et al., 2006). O reconhecimento do GRP/bombesina como um protótipo fator de crescimento autócrino foi originalmente baseado na detecção de GRP e um de seus receptores, o GRP-R (MATKOWSKYJ et al., 2003) em carcinoma pulmonar de pequenas células (SCLC) e no efeito antiproliferativo de anticorpos anti-GRP (PATEL et al., 2006).

A bombesina foi primeiramente isolada da pele do anfíbio *Bombina bombina* por Anastasi et al. em 1971; e no ano de 1978, McDonald et al. caracterizam seu homólogo mamífero no trato gastrointestinal de porco, o peptídeo liberador de gastrina (GRP). O GRP, um peptídeo de 27 aminoácidos, é o principal homólogo humano da bombesina (MATKOWSKYJ et al., 2003). A bombesina apresenta sua estrutura carboxiterminal idêntica ao GRP e se liga com alta afinidade ao seu receptor GRP-R, exibindo, ambos os peptídeos, idêntica atividade biológica (MATKOWSKYJ et al., 2003). O GRP e a neuromedina B, homólogos de mamíferos, esse último encontrado no tecido neural de medula espinhal de porcos, apresentam efeitos similares àqueles descritos para a bombesina, diferindo na potência relativa em função do efeito estudado (MATKOWSKYJ et al., 2003), mas apresentam um largo espectro de atividades biológicas e farmacológicas.

A bombesina/GRP e seu receptor GRP-R são amplamente expressos no sistema nervoso central e entérico onde atuam alterando a um grande número de processos fisiológicos normais incluindo saciedade, contração do músculo esquelético, função imune, tanto quanto a liberação de outros hormônios peptídeos (JENSEN et al., 2000).

O GRP parece ter uma importante e relevante ação na carcinogênese e seus efeitos incluem morfogênese, angiogênese, migração e adesão celular (MATKOWSKYJ et al., 2003).

Vários estudos mostram que os GRP-R são aberrantemente expressos em cânceres, recapitulando o papel no desenvolvimento fetal em que estavam envolvidos na regulação da diferenciação durante a organogênese (JENSEN et al., 2000). Alguns autores, (RADULOVIC et al., 1991; RADULOVIC 1994) destacam

essa expressão na linhagem de adenocarcinoma colorretal humano.

De todos os efeitos do GRP, o mais estudado é sua habilidade de aumentar o potencial proliferativo em tumores humanos (JENSEN et al., 2000). A sua atuação como um potente mitógeno em células neoplásicas de diversas origens foi relatada tanto *in vitro* quanto em modelos animais de carcinogênese (revisado em Patel et al., 2006). E também segundo Patel et al. (2006), a super expressão de GRP e seus receptores pode ser observada em neoplasias de pulmão, mama, próstata, estômago, pâncreas e cólon. O GRP parece alterar a forma da célula tanto quanto a adesão por alterar o citoesqueleto de actina via quinase de adesão focal (FAK) (CARROL et al., 2000; PATEL et al., 2006).

Até o momento, foram reconhecidos três tipos de receptores para peptídeos bombesina similares em mamíferos: GRP-R, para neuromedina B e o subtipo 3 (BRS-3), um receptor ainda sem ligante específico em mamíferos (PATEL et al., 2006). Os receptores para GRP, neuromedina B e o BRS-3 são proteínas de membrana plasmática com cerca de 50% de semelhança entre suas seqüências (PATEL et al., 2006). Todos os receptores caracterizados são nucleotídeos guanina dependentes, ligados a proteína G e apresentam sete domínios transmembrana (PATEL et al., 2006). Alguns mediadores intracelulares ativados por receptores GRP incluem proteína quinase mitógeno ativada, FAK, fosfatidil inositol 3-quinase e em algumas situações o elemento de ligação responsivo ao AMP cíclico (CREB), que modula a transcrição gênica (PATEL et al., 2006).

Na última década, grandes avanços no entendimento da progressão tumoral têm permitido a caracterização de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer com mecanismos de ação mais específicos.

#### 1.1.4.2 RC-3095

O RC-3095 é um antagonista sintético (PINSKI, et al., 1992; SCHWARTSMANN et al., 2006) do peptídeo liberador de gastrina que inibe tumores humanos pela ação antagonista ao receptor do peptídeo liberador de gastrina (CORNÉLIO et al., 2007). Diferentes estudos demonstraram a expressão de receptores funcionais para o GRP em tumor colorretal (PATEL et al., 2006; CORNÉLIO et al., 2007); a atuação desse peptídeo como mitógeno sobre essas células (CARROL, et al., 2000; PATEL ,et al., 2004) e o bloqueio da atividade proliferativa por antagonistas desse receptor (CARROL et al., 1999; CASSANO et al., 2001) em linhagem HT-29 de adenocarcinoma colorretal humano (PINSKI et al., 1993).

A maior expressão de receptores GRP, medida através de RNA mensageiro, foi observada em tumores pouco/moderadamente diferenciados e tumores que apresentaram invasão de vasos linfáticos (SAURIN et al., 1999) o que, em parte, poderia estar relacionado a redução da expressão das moléculas de adesão por essas células, pela perda da expressão de E-caderina (OKEGAWA et al., 2004) e/ou a neoexpressão de N-caderina (OKEGAWA, et al., 2004), ambas as causas associadas ao aumento do potencial proliferativo e metástase tumoral em tumores de origem epitelial (PEINADO et al., 2004).

#### 1.1.5 Adenocarcinoma Colorretal

O carcinoma colorretal está entre as três causas de morte mais freqüentes por câncer nos Estados Unidos; com aproximadamente 150.000 novos casos e 55.000 mortes em 2006 (WASHINGTON MK, 2008). Na Europa são registrados 213.000 novos casos e 110.000 mortes por ano (PISANI et al., 1999). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008 é de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Em termos de incidência, o câncer colorretal é a



terceira causa de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos.<sup>5</sup>

O adenocarcinoma colorretal representa a grande maioria dos tumores malignos que acometem o intestino grosso e atinge indistintamente tanto homens quanto mulheres (WASHINGTON, 2008).

A presença de receptores funcionais do tipo GRP-R para bombesina/GRP foi observada em câncer colorretal humano (RADULOVIC et al., 1991; RADULOVIC, et al. 1994; CARROL et al., 1999) mostrando a importância deste mitógeno no desenvolvimento e progressão tumoral.

Apesar das indiscutíveis melhoras na prática médica, com técnicas de detecção precoce e novas drogas antitumorais, a taxa de mortalidade por câncer colorretal pouco se alterou nas últimas quatro décadas e a sobrevivência após o período de remissão se mantém baixa (WASHINGTON, 2008).

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos em que moléculas de adesão têm um papel determinante seja pela manutenção da integridade epitelial, seja pelo controle da diferenciação celular (CAVALLARO and CHRISTOFORI, 2001). A transição de um adenoma bem diferenciado para um carcinoma invasivo geralmente resulta em um prognóstico ruim para o paciente. Essa transformação maligna geralmente está relacionada com forte redução nas adesões célula-célula combinadas a alterações nas vias de transdução de sinal (CAVALLARO and CHRISTOFORI, 2004; PEINADO et al., 2007).

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Acredita-se que o desenvolvimento de inibidores de vias de sinalização celulares específicas como novas drogas antitumorais serão fundamentais para o avanço das estratégias farmacológicas de tratamento não só em adenocarcinoma colorretal, mas em outras neoplasias onde as moléculas de adesão tenham papel chave na progressão e malignidade. Além disso, a elucidação das eventuais relações entre os mecanismos de sinalização envolvidos nos efeitos da ativação do

---

<sup>5</sup> Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5)>.

GRP-R e a expressão das caderinas, responsáveis por modificações agressivas no fenótipo celular que ocorrem na carcinogênese, será de grande importância no planejamento de estudos clínicos utilizando o RC-3095 como fármaco principal ou em associação com outros quimioterápicos.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo geral

- Caracterizar e avaliar alterações na expressão das moléculas de adesão de E-caderina e N-caderina durante a progressão tumoral *in vitro* através de células tratadas ou não com a droga antagonista do GRP, o RC-3095.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Confirmar o efeito anti-proliferativo do tratamento com o antagonista do GRPR, RC-3095, nas concentrações  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-3}$  e 1  $\mu$ M durante 24h e 48h sobre linhagem HT-29 de adenocarcinoma colorretal humano através do ensaio de MTT;

- Avaliar a expressão das moléculas de adesão N-caderina e E-caderina nestes cultivos tratados com o antagonista do GRPR, RC-3095, nas concentrações  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-3}$  e 1  $\mu$ M durante 24h e 48h através de RT-PCR.

## **CAPITULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO**

Submetido ao periódico Protein & Peptide Letters (índice de impacto 2007: 1.01)

## **Protein & Peptide Letters**

### **Letter**

#### **E-cadherin expression in HT-29 Human Colon Cancer Cells Treated with the GRPR Antagonist RC-3095**

Mariana Rodrigues Milano<sup>a, +</sup>, Laura Roesler<sup>a, +</sup>, Denis Broock Rosemberg<sup>b</sup>, Caroline Brunetto de Farias<sup>c, d</sup>, Ana Lucia Abujamra<sup>c, d</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>b</sup>, Gilberto Schwartzmann<sup>c</sup>, Rafael Roesler<sup>c, e</sup>, Monica Ryff Moreira Vianna<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> *Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>b</sup> *Genomic and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>c</sup> *Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

<sup>d</sup> *Children's Cancer Institute, Porto Alegre, Brazil*

<sup>e</sup> *Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil*

+ Both authors contributed equally to this work

\* Address correspondence to this author at the Laboratory of *Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil* E-mail: [monica.vianna@pucrs.br](mailto:monica.vianna@pucrs.br)

**Abstract:** E-cadherin is recognized as a determinant of tumor progression, acting as a suppressor of invasion and metastasis. The gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) is a therapeutic target in colon cancer. In this study we investigated the effects of RC-3095, a selective GRPR antagonist, on E-cadherin expression in HT-29 human colon carcinoma cells. We found that E-cadherin, but not N-cadherin, is expressed in HT-29 cells, and that the expression decreases over the 48h period studied. We also confirmed RC-3095 inhibits HT-29 cell proliferation but the effect was not correlated with the cell adhesion molecule expression.

**Keywords:** Gastrin-releasing peptide receptor, RC-3095, E-cadherin, colon cancer.

## INTRODUCTION

Tumor progression and metastasis are based on a multitude of cellular and molecular mechanisms and pathways that are causally involved with these processes may represent suitable targets for development of efficient anti-cancer therapies. Changes in cell adherence are crucial for invasion and metastasis [1,2] and among the cell-adhesion molecules the epithelial cadherin (E-cadherin) is recognized as a determinant of tumor progression, serving as a suppressor of invasion and metastasis in many contexts, although the exact mechanism of its activity is less well defined [1, 2]. E-cadherin has been shown to be down-regulated and inactivated by gene mutation in a myriad of cancer types, including colon cancer [2,3], being either lost or replaced by more permissive adhesion molecules such as the mesenchymal N-cadherin [4].

Gastrin-releasing peptide (GRP) is a mammalian homolog of the amphibian peptide bombesin (BB) that stimulates cell proliferation and acts as a growth factor in various cancers cells in culture and in experimental models of carcinogenesis through binding to the GRP receptor (GRPR). Aberrant expression of both GRP and GRPR has been reported in many types of tumors, including colon cancer [5, 6, 7]. The GRPR synthetic antagonist RC-3095 have been shown to inhibit proliferation of experimental colon cancer [5, 8, 9] and represent a potential new class of targeted anticancer drugs [5, 6].

As both changes in a cell's capabilities to adhere and communicate with neighboring cells and with its extracellular environment are involved in progression to tumor malignancy we analyzed the possible effect of RC-3095 on expression of E-cadherin and N-cadherin in the human colon adenocarcinoma cell line HT-29.

## MATERIALS AND METHODS

HT-29 human colon carcinoma cells (American Type Culture Collection, USA) were seeded ( $7 \times 10^3$  cells per well) in 96-well polystyrene tissue-culture-treated flatbottom microtiter plates (TPP, Switzerland) in RPMI medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Soral, Brazil), gentamicin (4 mg/ml, Nova Pharma, Brazil), and fungizone (250 mg/kg, Invitrogen, Brazil) in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The cells were treated with the GRPR antagonist RC-3095 at  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  or 1  $\mu$ M for 24 or 48 h. Previous studies have shown that RC-3095 at this concentration range inhibits proliferation of HT-29 cells [10].

Cell viability was measured by 3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich), which measures the mitochondria activity, 24 and 48 h after RC-3095 treatment. Cells were washed with hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 90  $\mu$ l of DMEM plus 10  $\mu$ l of MTT 5 mg/mL solution was added to each well and then incubated for 4 h at 37°C. The plate was left at room temperature until completely dried. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added and absorbance was read in 492 nm in a multiple reader.

Total RNA from the HT-29 adenocarcinoma cells was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer instructions. Cells were collected harvested and resuspended in 15  $\mu$ l RNase-free water. Before storing at –70°C, 0.4  $\mu$ l of RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor (Recombinant) (Invitrogen, USA) was added. RNA purity was quantified spectrophotometrically calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280 nm. All samples were adjusted to 160

ng/ $\mu$ l and cDNA species were synthesized with SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, USA).

Human E-cadherin and N-cadherin mRNA sequences were retrieved from GenBank database and aligned using ClustalX program. Regions with low scores of similarity among the sequences were used for designing specific primers using Oligos 9.6 (**Table 1**). Primers specificity was confirmed by human genome search and identification of specific target sequences, ensuring no cross-amplification.  *$\beta$ -actin* primers were designed as described previously [4].

RT-PCR conditions were optimized in order to determine the number of cycles that would allow product detection within the linear phase of mRNA transcripts amplification. The following conditions were used for PCR reactions: 1 min at 94°C, 1 at 64°C, 1 min at 72°C for 35 cycles. A post-extension cycle at 72°C was performed for 10 min. For each set of PCR reactions, a negative control was included. PCR products were resolved using 1.0% agarose gel containing GelRed® (Biotium) visualized with ultraviolet light. The fragments length of PCR reactions was confirmed with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, USA) and  *$\beta$ -actin* was used as a sample standard. The relative abundance of each mRNA versus  *$\beta$ -actin* was determined by densitometry using the freeware ImageJ 1.37 for Windows.

---

**Table 1 should be inserted here**

---

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM or as mean  $\pm$  SEM percentage of control values. Differences among groups at 24 or 48 h after treatment were evaluated by



one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparisons test. Differences between independent groups maintained for 24 h and 48 h under the same treatment were evaluated by independent samples t-test. In all comparisons,  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## RESULTS AND DISCUSSION

Treatment with RC-3095 at  $10^{-6}$   $\mu\text{M}$  for 24 h and at all tested concentrations during 48 h significantly reduced cell proliferation (**Fig. 1**). The RC-3095 inverted U-shaped dose-response pattern observed in both 24 and 48 h groups is consistent with previous experiments examining the effects of different doses of RC-3095 on the growth of HT-29 and glioma cells *in vitro* [10, 11]. These findings corroborate previous results showing RC-3095 efficiency in inhibiting tumor cell proliferation [6].

---

**Fig. 1 should be inserted here**

---

N-cadherin expression was not detected in control or treated cells during the evaluated period in any RT-PCR condition tested. This could not be attributed to primer inability to detect N-cadherin transcripts as confirmed by its performance on U138-MG human glioblastoma cells (data not shown). During tumor progression cancer cells undergo significant changes in the expression profile of adhesion molecules leading to invasiveness, when *de novo* expression of N-cadherin is considered a hallmark at epithelial tumors, and a high level of its expression is often

associated with poor prognosis [1,2,3,12]. However, the absence of an adhesion molecule conventionally more permissive to cell migration and proliferation such as N-cadherin [4] is not unexpected at early stages of epithelial tumors, and the lack of N-cadherin expression in our study could be related to the short time interval studied, as it has been shown in other cell lines [3,12].

E-cadherin expression was detected in all groups studied, and RC-3095 did not significantly affect expression (**Fig. 2**). Notably, when E-cadherin expression levels are compared between 24 h and 48 h after treatment in control cells, a significant reduction was found, indicating a progressive loss of E-cadherin mediated cell-adhesion over time. This finding was observed also in cells treated with RC-3095 at  $10^{-3}$   $\mu$ M, but did not reach statistical significance in cells treated with other concentrations of RC-3095. The cell adhesion function of the epithelial E-cadherin is frequently disturbed in carcinomas either by downregulation or by mutation of the genes of the cadherin and its intracellular binding proteins, and expected to progress over time [2,13]. Although different alternatives have been hypothesized, the exact mechanism through which loss of E-cadherin function promotes tumor progression is yet poorly understood, and several candidate mediators are under scrutiny [2,14].

---

**Fig. 2 should be inserted here**

---

Microenvironment plays critical roles in malignant tumor progression and autocrine stimulation is an important characteristic to sustain proliferation and exacerbate survival and migratory behaviors [7]. Our results substantiate those

demonstrating RC-3095 potential as an anti-cancer drug on colon cancer [8, 9]. However, RC-3095 effects on proliferation were not mirrored on E-cadherin expression, suggesting that, at least for the evaluated period, cell adhesiveness is not a major pathway mediating GRPR antagonist actions. Further experiments using extended treatment period could be useful to identify an eventual connection between RC-3095 anti-proliferative effect and E-cadherin mediated cell-adhesion loss.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil) grants 312137/2006-0 and 490753/2006-0 to M.R.V. and 400839/2005-9 and 301578/2006-0 to R.R.; the South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD; Porto Alegre, Brazil); and the Children's Cancer Institute (ICI-RS; Porto Alegre, Brazil), and CAPES fellowship to M.M.R

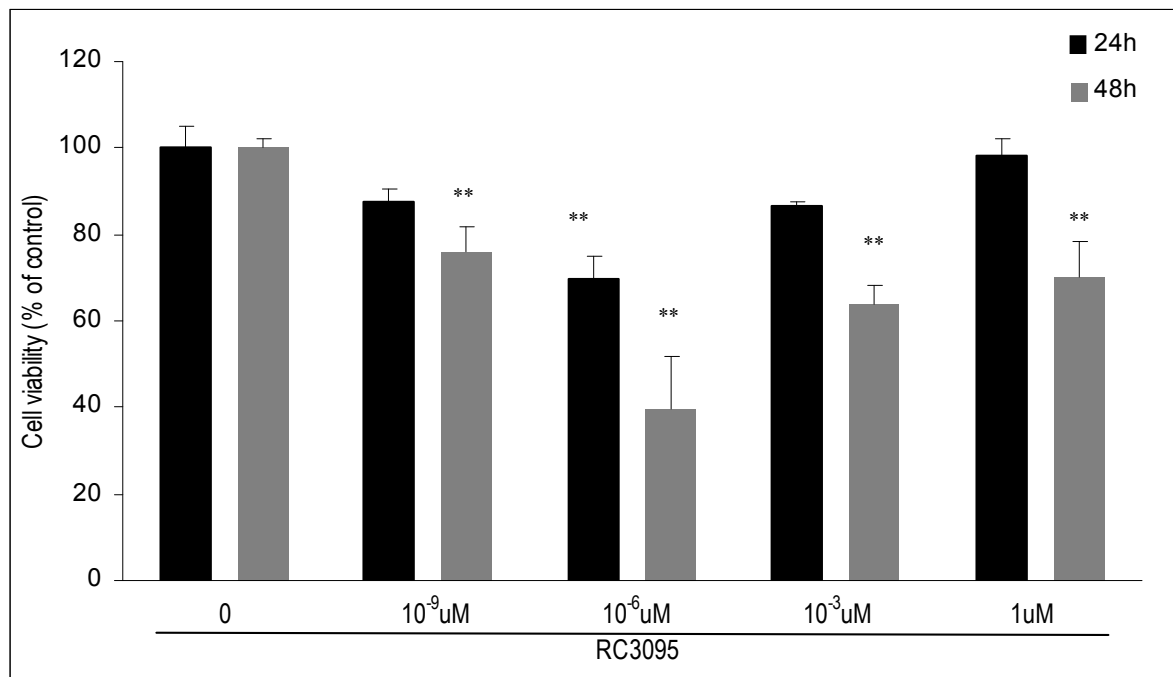
## REFERENCES

- [1] Thompson, E.W., Newgreen, D.F. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, **2005**, 65(14), 5991-5995.
- [2] Yang, J., Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. **2008**, 14(6), 818-29.
- [3] Natalwala, A., Spychal, R., Tselepis, C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*, **2008**, 14 (24), 3792-3797.
- [4] Gumbiner, B.M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2005**, 6(8), 622-34.
- [5] Farias, C.B., Lima, R.C., Lima, L.O., Flores, D.G., Meurer, L., Brunetto, A.L., Schwartzmann, G., Roesler, R. Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology*. **2008**, 75(1-2), 27-31.
- [6] Cornelio, D.B.; Roesler, R.; Schwartzmann, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann. Oncol.*, **2007**, 18(9), 1457-1466.
- [7] Patel, O.; Shulkes, A.; Baldwin, G.S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1766(1), 23-41.
- [8] Radulovic, S.; Miller, G.; Schally, A.V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, **1991**, 51(21), 6006-6009.

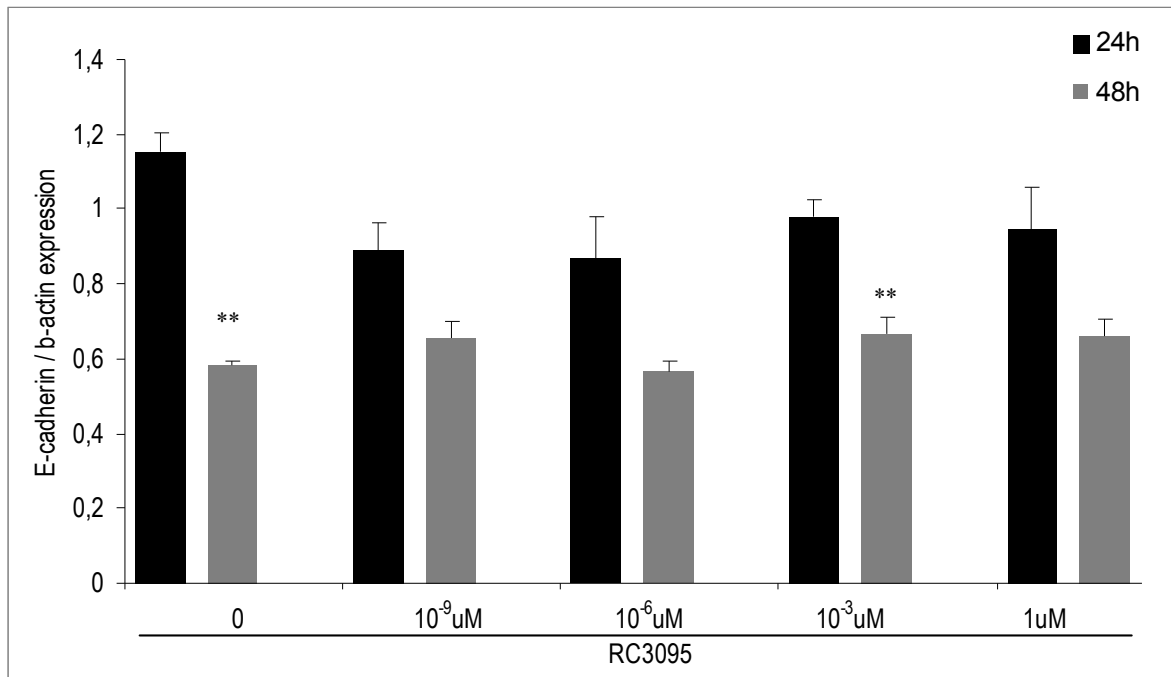
- [9] Radulovic, S.; Schally, A.V.; Reile, H.; Halmos, G.; Szepeshazi, K.; Groot, K.; Milovanovic, S.; Miller, G.; Yano, T. Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. *Acta Oncol.*, **1994**, 33(6), 693-701.
- [10] Fernando, A.; Farias, C.B.; Roesler, R.; Schwartzmann, G. Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: a potential therapeutic role for gastrin-releasing peptide receptor antagonists. *Oncology*, **2007**, 72(3-4), 160-161.
- [11] Flores, D.G.; Leites, J.; Farias, C.B.; Oliveira, M.S.; Lima, R.C.; Tamajusuku, A.S.K.; DiLeone, L.P.; Meurer, L.; Brunetto, A.L.; Schwartzmann, G.; Lenz, G.; Roesler, R. Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Curr. Neurovasc. Res.* **2008**, 5(2), 99-105.
- [12] Hazan, R., Phillips, G., Qiao, R., Norton, L., Aaronson, S. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* **2000**, 148, 779–790.
- [13] Connaci-Scorrel, M.; ZhurinSki, J.; Ben-Ze'ev, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* **2002**, 109 (8), 987–991.
- [14] Klaus, A., Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* **2008**, 8 (5): 387-398.

Table 1. Primer sequences and PCR amplification conditions

	GenBank accession number	Primers (5'–3')	PCR Product (bp)
E-cadherin	Z13009	F- CGTCTGTAGGAAGGCACAGCCTGTCTG R-GAGAATCATAAGGCCGGGGCTGTGG	410
N-cadherin	S42303	F-AATCAAATATTTCCATCCTGCGCGTG R-TTCCCACAGGCTTGATGGCATCAGG	348
$\beta$ -actin	NM_001101	F-GAGACCTTCAACACCCAG R-GTGGTGGTGAAGCTGTAGC	210



**Figure 1:** The GRPR antagonist RC-3095 inhibits the proliferation of HT-29 human colorectal cancer cells *in vitro*. Data are shown as mean + SEM percentage of control. N=4. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc tests revealed a significant effect of RC-3095 10<sup>-6</sup>  $\mu$ M at 24 h and of all tested concentrations at 48 h when compared to respective control. (\*\*  $p < 0.01$ ).



**Figure 2.** HT-29 human colon carcinoma E-cadherin expression after 24 h and 48 h RC-3095 treatment. The GRPR antagonist RC-3095 did not significantly affect the E-cadherin expression when compared to non-treated controls. Data are shown as mean  $\pm$  SEM of experiments performed in triplicate. N=3. There was a significant reduction on E-cadherin expression when 24h and 48h control groups were compared by independent-samples t-test. Expression between RC-3095  $10^{-3} \mu\text{M}$  cells treated for 24 h and 48 h also differed. (\*\*  $p < 0.01$ ).

### **CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**



### 3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma dos passos mais importantes do processo de desenvolvimento tumoral na aquisição do fenótipo maligno é a habilidade que as células tumorais adquirem de ativar a remodelagem tecidual, conduzidas por vias de sinalização que conduzem a reprogramação de suas moléculas de adesão na superfície celular e ao ganho de motilidade (NATALWALA et al., 2008). A expressão de GRP/GRP-R parece estar envolvida na regulação da remodelagem em células HT-29 e Caco-2, via FAK (GLOVER et al., 2004) o que possivelmente possibilita o aumento da motilidade e do potencial invasivo das células tumorais. Contudo, as condições celulares que afetam a expressão de GRP/GRP-R, e as vias bioquímicas envolvidas na mediação de suas propriedades morfogênicas ainda não estão totalmente esclarecidas (GLOVER et al., 2004).

Evidências diretas ligando moléculas de adesão celular e progressão tumoral já foram extensivamente discutidas na literatura (revisado em HAZAN et al., 2004), principalmente focadas no papel que a E-caderina, como supressora tumoral desempenha nesse processo (DORUDI et al., 1993). A recapitulação do processo de transição epitélio mesenquimal nos processos patológicos, a *cadherin switch* é induzida por fatores de crescimento, os quais são produzidos pelas próprias células tumorais ou pelas células do estroma (CHISTOFORI, 2006).

Neste trabalho tivemos como objetivo identificar alterações na expressão de moléculas de adesão celular, caracterizadas pelas moléculas de E- e N-caderinas na progressão do adenocarcinoma colorretal humano representado pelo cultivo *in vitro* da linhagem HT-29 e os efeitos do candidato a droga anti-tumoral RC-3095, antagonista do GRP.

O peptídeo liberador de gastrina é conhecido por estimular a proliferação em vários tipos celulares, incluindo o adenocarcinoma colorretal (RADULOVIC et al., 1991; RADULOVIC et al., 1994). De maneira que, a ação específica de anticorpos e antagonista sobre determinados tipos de neoplasias, que expressem receptores funcionais para esse peptídeo, bloqueia seu crescimento (CUTTITA et al., 1985).

O RC-3095 é um antagonista seletivo do peptídeo liberador de gastrina sintetizado por *Schally e colaboradores* (Pinski et al, 1992) o qual promove significativo efeito anti-tumoral em tumores experimentais.

Analisamos a atividade antitumoral do RC-3095 através da viabilidade celular em células de adenocarcinoma colorretal humano 24 e 48 horas após o tratamento em diferentes concentrações ( $10^{-9}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-3}$ ;  $1\mu\text{M}$ ) do antagonista. Obtivemos uma redução estatisticamente significativa na viabilidade das células tumorais e, principalmente na concentração de  $10^{-6}$   $\mu\text{M}$  tanto em 24 h quanto em 48 h. Esses resultados estão de acordo com os dados previamente apresentados na literatura (RADULOVIC et al., 1991; FERNANDO et al., 2007). Mostrando que o RC-3095 acena como uma promessa de representar uma nova classe de medicamentos eficientes no tratamento tumoral (RADULOVIC et al., 1991; FERNANDO et al., 2007).

Quanto a análise da expressão da molécula de adesão N-caderina no tecido estudado, esperávamos detectar a expressão de N-caderina ao longo da progressão tumoral, principalmente pelo fato dessa estar envolvida com a aquisição do comportamento invasivo pelas células tumorais (OKEGAWA et al., 2004). Porém, mesmo após confirmar a habilidade do *primer* em detectar os transcritos da expressão de N-caderina em linhagem de glioblastoma (U-138), não detectamos a expressão da N-caderina em HT-29 nem em 24 h e nem em 48 h. Esse fato poderia estar relacionado às características da linhagem selecionada, ao tempo de progressão tumoral avaliado, a não ativação das vias da transição epitélio mesenquimal, como a Wnt.

A diminuição da expressão da molécula de E-caderina ao longo do tempo, como mostrado pela diferença significativa entre os controles 24 h e 48 h em todos os grupos analisados, evidencia o que talvez represente o início da manifestação do efeito esperado dessa droga sobre a adesão. Haja visto que a expressão das caderinas após o tratamento foi analisada num período talvez curto para alguma mudança detectável pelas técnicas utilizadas em sua análise.

Os avanços obtidos com as técnicas da biologia molecular, em especial aplicadas para o câncer colorretal vêm contribuindo para a compreensão dos mecanismos de patogenicidade e para o desenvolvimento de drogas com ação mais específica. Novas estratégias terapêuticas, desenvolvidas com base em vias moleculares ou em estruturas moleculares alteradas, ou ainda no perfil de expressão dos genes nos tecidos tumorais serão mais efetivas e menos tóxicas por terem como alvo específico às próprias células tumorais e suas vias de sinalização.

O efeito inibitório observado pela administração do RC-3095, em parte, poderia ser atribuído à ação da droga em diminuir a expressão de receptores EGF

(FERNANDO et al., 2007). Ainda de acordo com esse achado, outros trabalhos demonstram em tumor pancreático, colorretal, gástrico e pulmonar que a terapia com RC-3095 de fato diminui a capacidade de ligação máxima dos receptores EGF (Halmos and Shally, 1997). Contudo, as drogas inibidoras de receptores EGF apresentam limitada atividade antitumoral quando administradas como monoterapia (Zhang et al, 2007).

Estudos *in vitro* com câncer de mama humano sugerem que a inibição do crescimento tumoral atribuída ao RC-3095 está associada a uma substancial redução nos níveis de expressão de mRNA e proteína de fatores pró-angiogênicos como o IGFb, IGF-II e VEGF-A (Bajo et al, 2004).

A manutenção de uma inibição constante do crescimento do tumor parece ser dependente da ativação por RC-3095 de outros efeitos relevantes à inibição tumoral. O que sugere a existência de diferentes mecanismos para atuação desse antagonista.

Nossos resultados demonstraram que o RC-3095 é uma potencial droga anti-câncer para o tratamento do câncer colorretal. Contudo, o efeito do RC-3095 na **proliferação** não se deve a alterações na expressão da E-caderina, sugerindo que no período avaliado a adesividade celular não foi a maior via mediada pela ação do antagonista GRP-R.

Acreditamos que estudos futuros usando um período de tratamento maior possa ser utilizado para identificar uma eventual ligação entre o efeito **antitumoral** e a perda de adesão mediada pela E-caderina.

## REFERÊNCIAS

**Adherex.** Disponível em: <<http://www.adherex.com/products/ADH-1-08>> Acesso em: 3 fev. 2009.

**Adherex.** Disponível em: <<http://www.adherex.com/featuredlinks/ADH-1%20Copy%201/view>>. Acesso em: 3 fev. 2009.

Anastasi A, Esparmer V, Bucci M. **Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes.** Experimentia.1971;27:166-67.

Asano K, Duntsch CD, Zhou Q, Weimar JD, Bordelon D, Robertson JH, Pourmotabbed T. **Correlation of N-cadherin expression in high grade gliomas with tissue invasion.** Journal of Neurooncology.2004;70:3-15.

Bajo AM, Schally AV, Groot K,Szepeshazi K. **Bombesin antagonist inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers.** British Journal of Cancer. 2004; 245-52.

Birchmeier W. **Cell adhesion and signal transduction in cancer.** EMBO reports. 2005;6:413-17.

Carroll RE, Matkowskyj KA, Chakrabarti S, McDonald TJ, Benya RV. **Aberrant expression of gastrin releasing and its receptor by well-differentiated colon cancer in humans.** American Journal Physiology.1999: G655-G665.

Carroll RE, Matkowskyj KA, Tretiakova MS, Battey JF, Benya RV. **Gastrin-releasing peptide is a mitogen and a morphogen in murine colon cancer.** Cell Growth & Differentiation. 2000;11:385-93.

Cassano G, Resta N, Gasparre G, Lippe C, Guanti G. **The proliferative response of HT-29 human colon adenocarcinoma cells to bombesin-like peptides.** Cancer Letters. 2001;172:151-157.

Cavallaro U, Christofori, G. **Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer.** Nature Reviews Cancer. 2004;4:118-132.

Cavallaro U and Christofori G. **Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough.** *Biochimica et biofysica Acta.* 2001;1552:39-45.

Christofori G. **New signal from the invasive front.** *Nature.* 2006;44:444-50.

Christofori G, Semb H. **The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene.** *TIBS.* 1999; 24:73-6.

Cornelio DB, Roesler R, Schwartsmann G. **Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy.** *Annals of Oncology.* 2007;18:1457-66.

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD. **Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer.** *Nature.* 1985;316:823-6.

Edelman GM. **Cell adhesion molecules in neural histogenesis.** *Annual Reviews in Physiology* 1986;48:417-30.

Fernando A, Brunetto de Farias C, Roesler R, Schwartsmann G. **Targeting the epidermal growth factor in colorectal cancer: a potential therapeutic role for gastrin-releasing peptide receptor antagonist.** *Oncology.* 2007;72:160-1.

Glover S, Nathaniel R, Shakir L, Perrault C, Anderson RK, Tran-Son-Tay R, Richard V. Benya. **Transient upregulation of GRP and its receptor critically regulate colon cancer cell motility during remodeling.** *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology.* 2005;288:1274-82.

Gumbiner BM. **Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.** *Nature Molecular Cell Biology,* 2005;6:622-34.

Halmos G, Schally AV. **Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small-cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095.** *PNAS.* 1997; 94: 956-60.

Hanahan D, Weinberg R A. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000;100:57-70.

Hatta K, Takagi S, Fujisawa H, Takeichi M. **Spatial and temporal expression**

**pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos.** *Developmental Biology*. 1987;120:215-27.

Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. **Cadherin switch in tumor progression.** *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1014: 55-63.

Hirano S, Nose A, Hatta K, Kawakami A, Takeichi M. **Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins) subclass specificities and possible involvement of actin bundles.** *Journal of cell biology*.1987;105:2501-10.

Huber M, Kraut N, Beug H. **Molecular requirements of epithelial-mesenchymal transition during tumor progression.** *Current Opinion in Cell Biology*. 2005;17:548-58.

**Instituto Nacional do Câncer (INCA).** Disponível em:

<[http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5)> Acesso em 3 de fevereiro de 2009.

Izbicka E, Izbicki T. **Therapeutic strategies for the treatment of neuroblastoma.** *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2005;6:1200-14.

Jensen Jo Annah G, Carrol RE, Benya RV. **The case for gastrin- releasing peptide acting as a morphogen when it and its receptor are aberrantly expressed in cancer.** *Peptides*. 2000;22:689-99.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. **The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *The Journal of Cell Biology*. 2006;172:973-81.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scottt M. et al. **Biologia celular e molecular.** 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. **Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition.** *Journal of Cell Science*. 2004;118:873-87.

Mariotti A, Perotti A, Sessa C, Rüegg C. **N-cadherin as a therapeutic target in cancer.** *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2007;16:1-15.

Matkowskyj KA, Keller K, Glover S, Kornberg L, Tran-Son-Tay R, Benya RV. **Expression of GRP and Its Receptor in Well-differentiated Colon Cancer Cells Correlates with the Presence of Focal Adhesion Kinase Phosphorylated at Tyrosines 397 and 407.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2003;51:1041–48.

McDonald TJ, Nilson G, Vagne M, Bloom SR, Mutt V. **A gastrin-releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue.** Gut 1978; 19:767-74.  
Moustakas A, Heldin C. **Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression.** Cancer Science. 2007; 98:1512-20.

Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. **Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract.** World Journal of Gastroenterology. 2008;14:3792-3797.

Nollet F, Kools P, Van Roy F. **Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members.** Journal of Molecular Biology. 2000;299:551-72.

Okegawa T, Pong RC, Li Y, Hsieh. **The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy.** Acta Biochimica Polonica. 2004; 51:445-457.

Patel O, Dumesny C, Giraud AS, Baldwin GS, Shulkes A. **Stimulation of proliferation and migration of a colorectal cancer cell line by amidated and glycine-extended gastrin-releasing peptide via the same receptor.** Biochemical Pharmacology. 2004;68:2129-42.

Patel O, Shulkes A, Baldwin GS. **Gastrin- releasing peptide and cancer.** Biochimica et biophysica Acta. 2006;1776:23-41.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. **Snai, Zeb and factors in tumor progression: na alliance against the epithelial phenotype?** Nature Review Cancer. 2007;7:415–28.

Peinado, H, Portillo F, Cano A. **Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.** International Journal of Developmental Biology. 2004;48:365-75.

Perego C, Vanoni C, Massari S, Raimondi A, Pola S, Cattaneo MG, Francolini M,

Vincentini LM, Pietrini G. **Invasive behaviour of glioblastoma cell lines is associated with altered organization of the cadherin-catenin adhesion system.** Journal of Cell Science. 2002;115:3331-40.

Pinski J, Shally AV, Halmos K, Szepeshazi K. **Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesina/gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC-3 human prostate-cancer xenografts in nude mice.** International Journal of Cancer. 1993;55:963-967.

Pinski J, Yano T, Rekasi Z, Cai RZ, Radulovic S, Schally AV. **High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration.** Regulatory Peptides. 1992; 241:185-193.

Radisky DC. **Epithelial-mesenchymal transition.** Journal of Cell Science. 2005;118:4325-26.

Radulovic S, Miller G, Schally AV. **Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesina/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095).** Cancer Research. 1991; (21): 6006-9.

Radulovic S, Schally AV, Reile H, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, Milovanovic S, Miller G, Yano T. **Inhibitory effects of antagonists of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice.** Acta Oncologica. 1994;33:693-701.

**Roche Brasil.** Disponível em: <[http://www.roche.com.br/Products/default\\_PT.htm](http://www.roche.com.br/Products/default_PT.htm)> Acesso em: 4 set. 2007.

Roy EV, Berx G. **The cell-cell adhesion molecule E-cadherin.** Cellular and Molecular Life Sciences. 2008;65:3756-88.

Saurin JC, Rouault JP, Abello J, Berger F, Remy L, Chayvialle JA. **High gastrin releasing peptide receptor mRNA level is related to tumor dedifferentiation and lymphatic vessel invasion in human colon cancer.** European Journal of Cancer. 1999; 35:125-132.

Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Pohlmann P, De Nucci G. **A phase I trial of the bombesina/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies.** Investigational New Drugs. 2006; (24) 5:403-12.



Scott, F. G. **Developmental biology**. 6.ed. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=dbio.TOC&depth=2>>. Acesso em: 20 out. 2007.

Shapiro L, Love J, Colman D. **Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity**. Annual Review of Neuroscience. 2007;30:451-74.

Steeg, PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nature Medicine**, 2006;12:895- 904.

Stemmler MP. **Cadherins in development and cancer**. Molecular BioSystems. 2008;4:835-50.

Stupp R; Rugg C. **Integrin inhibitors reaching the clinic**. Journal of Clinical Oncology. 2007;13:1637-1638.

Szepeshazi K, Schally AV, Cai RZ, Radulovic S, Milovanovic S, Szoke B. **Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analogue RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters**. Cancer Research. 1991;51:5980-6.

Takeichi M. **Morphogenetic roles of classic cadherins**. Current Opinion in Cell Biology. 1995;7:619-27.

Takeichi M. **The cadherin: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis**. Development. 1988;102:639-55.

Takeichi M. **The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions**. Nature. 2007;8:11-20.

Tasic B, Nabholz CE, Baldwin KK, Kim Y, Rueckert EH, et al. **Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing**. Molecular Cell. 2002;10:21–33.

Thiery JP. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression**. Nature. 2002;2:442-54.

Thiery JP, Sleeman JP. **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions**. Nature Reviews in Molecular Cell Biology. 2006;7:131-42.

Thompson EW, Newgreen DF. **Carcinoma invasion and metastasis: A role for Epithelial-Mesenchimal Transition?** Cancer Research, 2005;14:5991-95.

Washington MK. **Colorectal Carcinoma Selected Issues in Pathologic Examination and Staging and Determination of Prognostic Factors.** Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2008;132:1600-07.

Wheelock MJ, Johnson KR. **Cadherins as modulators of cellular phenotype.** Annual review of cell and developmental biology. 2003;19:207-35.

Zhang Q, Bholra NE, Wai Yan Lui V, Siwak DR, Thomas SM, Gubish CT et al. **Antitumor mechanisms of combined gastrin-releasing peptide receptor and epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer.** Molecular cancer therapeutics. 2007;6; 1414-24.

## **ANEXOS**

## ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo

Dear Dr. Moreira Vianna,

Thank you for submitting your paper for **Protein & Peptide Letters**. It will be sent out for reviewing shortly and the decision conveyed to you in due course. As soon as a considerable number of referees' reports are received, we will forward them to you so that you can change/improve your manuscript accordingly.

Could you please visit the journal's Web site and pick names of an appropriate Associate Editor and five Board Members as potential referees to your paper. Also, please provide names of five potential external referees along with their email addresses and field of expertise. Please be advised the reviewers must be experts in the field but must not be your colleagues, acquaintance or co-authors. The reviewer must belong to an advanced country and have considerable number of publications in the relevant field.

Thank you for considering the journal for your worthy submission

Thanks & regards,

Sarwat Aziz Abbasi

Sr. Manager (Publications)

Bentham Science Publishers