

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MESTRADO PROFISSIONAL EM
BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
FACULDADE DE FARMÁCIA

ANA HELENA BRETANHA LOPES TORT

AVALIAÇÃO DO INIBIDOR DA p38/MAPK, ML3403 NA PROLIFERAÇÃO
CELULAR DE LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO

Porto Alegre

Janeiro 2016

ANA HELENA BRETANHA LOPES TORT

**AVALIAÇÃO DO INIBIDOR DA p38/MAPK, ML3403 NA PROLIFERAÇÃO
CELULAR DE LINHAGENS DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação de Mestrado realizado no Programa de Pós – graduação em Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica (MPBF), para aquisição do grau de Mestre. Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre

Janeiro/2016

TORT, Ana Helena Bretanha Lopes

Avaliação do inibidor p38/MAPK, ML3403 na proliferação celular de linhagens de glioma humano / Ana Helena Bretanha Lopes Tort. Porto Alegre, 2016.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2016.

Orientadora: Fernanda Bueno Morrone

1. Gliomas 2. Angiogênese 3. VEGF 4. Bevacizumab 5. P38/MAPK

AGRADECIMENTOS

À orientadora Fernanda Bueno Morrone por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência.

À Dra Angélica Regina Cappellari pela dedicação, disponibilidade na colaboração dos experimentos e da dissertação e por confiar em mim.

A todos os colegas do laboratório, pelo companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização dos experimentos.

À minha família, a qual amo muito, pelo apoio moral, carinho, paciência e incentivo.

Ao Paulo, um agradecimento especial pelo apoio e carinho e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos.

RESUMO

Por serem tumores primários localizados no sistema nervoso central, os gliomas apresentam altas taxas de mortalidade com sobrevida média de dois anos. Menos de 5% dos pacientes com gliomas sobrevivem mais de cinco anos após o diagnóstico, mesmo com os tratamentos mais avançados, os quais envolvem cirurgia, radiação e quimioterapia. Os tumores resultam de diferentes defeitos em vias de sinalização intracelulares, incluindo a via p38/MAPK. Entre as respostas celulares mediadas pela família de p38/MAPK, destaca-se a regulação da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de ML3403, um inibidor da p38/MAPK, sobre a viabilidade das células de glioma, e avaliar o seu efeito combinado com bevacizumab (BVZ). O BVZ, já utilizado na clínica como adjuvante no tratamento de gliomas, é um anticorpo monoclonal contra o receptor de VEGF-Ae reduz a sinalização envolvida no processo de angiogênese tumoral. As células de gliomas U138MG e U251MG foram tratadas com ML3403 (0,1 a 200 μ M) e BVZ (1 a 200 μ g/mL) e avaliadas para viabilidade celular, através do método do MTT e proliferação celular, através da contagem do número de células. Os resultados obtidos demonstraram redução da viabilidade e proliferação celular após o tratamento com ML3403. O co-tratamento com BVZ não apresentou efeito aditivo. A utilização de inibidores da via de sinalização p38/MAPK pode ser considerada como um tratamento promissor na diminuição do crescimento de gliomas.

Palavras-chaves: gliomas, angiogênese, VEGF, Bevacizumab, p38/MAPK.

ABSTRACT

Gliomas are primary tumors of the central nervous system that are associated with a high mortality rate; they course with an average survival rate of 2 years after the diagnosis. Less than 5 % of glioma patients survive more than five years after diagnosis, even those treated with state of the art protocols, which include surgery, radiotherapy and chemotherapy. Tumors result from impairments of intracellular signaling pathways, including the p38/MAPK pathway, which, are responsible to control of cell proliferation and tumorigenesis, among other cellular responses. The goal of the present work was to investigate the effects of ML3403, an inhibitor of p38/MAPK, on the viability and proliferation of glioma cells, and to assess its effect when combined with bevacizumab (BVZ). BVZ already used in the clinical setting as an adjuvant for treating gliomas. It is a monoclonal antibody against VEGF-A receptor and thus reduces the signaling involved in tumor angiogenesis. U138 and U251 glioma cells were treated with ML3403 (0.1 to 200 μ M) and BVZ (1 to 200 μ g/mL) and later assessed for cell viability, by MTT method and proliferation by cell counting. The results demonstrate that treatment with ML3403 reduces glioma cell viability and proliferation. Co-treatment with BVZ does not present any significant effect. The use of p38/MAPK inhibitors may constitute an interesting treatment against glioma progression.

Keys words: gliomas, angiogenesis, VEGF, Bevacizumab, p38/MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Funções especializadas das diferentes isoformas da p38/MAPK.....	14
Figura 2 - Mecanismos de isoformas de p38 MAPK.....	15
Figura 3 - Estrutura química de ML3403.....	16
Figura 4 –Efeitos de ML3403 na viabilidade celular de gliomas.....	34
Figura 5 –Efeitos de ML3403 na contagem celular.....	35
Figura 6 –Efeitos de ML3403 e BVZ na viabilidade celular de U138 MG e U251 MG.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato

BVZ – bevacizumab

ERKs – quinases reguladas por sinais extracelulares

GTP – guanosina trifosfato

IL -1 β – interleucina 1 β

IL-6 –interleucina6

JNKs – c-Jun N terminal

LPS – endotoxinalipopolissacarídeo bacteriano

MAPK – proteínas quinases ativadas por mitógenos

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNC –sistema nervoso central

SPAKs – proteínas quinases ativadas pelo estresse

TMZ – temozolomida

TNF- α – fator de necrose tumoral α

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGF-A – fator de crescimento endotelial vascular A

VEGFR –receptores de fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

Introdução.....	9
1.1. Gliomas.....	9
1.2. Diagnóstico e tratamento dos gliomas.....	11
2. Via de p38 MAPK.....	12
3.Objetivos.....	17
3.1 Geral.....	17
3.2 Específicos.....	17
4. Artigo científico.....	18
5. Considerações finais.....	37
6. Perspectivas.....	41
7. Referências bibliográficas.....	42

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 GLIOMAS

Os gliomas representam os tipos mais comuns de tumores primários do sistema nervoso central (SNC), com altas taxas de mortalidade (Jovcevska *et al.*, 2013). No mundo, anualmente são detectados novos casos de tumores primários cerebrais na proporção de 3,8 por 100.000 em homens e de 3,1 por 100.000 em mulheres. Desses casos, 70% são diagnosticados como gliomas malignos dentro de cinco a dez anos. Dados demonstram que os caucasianos são mais frequentemente afetados que os africanos e os asiáticos. Os gliomas ocorrem em todas as faixas etárias, no entanto, são mais predominantes em adultos com mais de 45 anos (Ohgaki *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2014, Altieri *et al.*, 2014).

O termo glioma foi inicialmente utilizado para definir os tumores originários de células da glia (Talibi *et al.*, 2014). Por serem as lesões mais agressivas e frequentemente persistentes, os gliomas são derivados de astrócitos, oligodendrócitos e também de seus precursores no SNC, apresentando morfologia e expressão gênica semelhantes a estas células (Ramakrishna *et al.*, 2015 e Suvà, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os gliomas são classificados em quatro graus, de acordo com o tipo histológico e o comportamento da neoplasia: grau I (astrocitoma pilocítico), grau II (astrocitoma de baixo grau, oligodendroglioma de baixo grau e oligoastrocitoma), grau III (astrocitoma anaplásico e oligodendroglioma anaplásico), e grau IV (glioblastoma multiforme). Quanto maior o grau, pior o prognóstico (Ahmed *et al.*, 2014 e Nanegrungsunk *et al.*, 2015).

O glioblastoma multiforme é um tipo de tumor primário mais comum, principalmente em adultos com mais de 45 anos. Este tumor exibe as características avançadas de malignância, inclusive proliferação celular e necrose. Ou seja, se espalha rapidamente em algumas partes do cérebro, assim, piorando o prognóstico e encurta a sobrevivência (em média de 14 meses) sem tratamento (Altieri *et al.*, 2014, Suvá 2014).

Os astrocitomas são derivados de astrócitos (Yao *et al.*, 2014). Os astrocitomas pilocíticos (grau I) afetam a população juvenil, porém, apresentam bom prognóstico, pois os tumores são benignos. Raramente progridem para anaplasia e geralmente se encontram no cerebelo, no hipotálamo e vias ópticas (Hong *et al.*, 2014). Os astrocitomas de baixo grau (grau II) se situam em qualquer local de SNC, porém, são mais comuns nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e tendem a infiltrar-se difusamente no parênquima cerebral ao redor do tumor (Ostrom *et al.*, 2014). Os astrocitomas anaplásicos (grau III) se localizam em qualquer parte de cérebro, porém mais especificamente na parte frontal. São caracterizados por astrócitos fibrilares ou gemistocísticos. Os glioblastomas multiformes (grau IV) são mais frequentemente encontrados na região fronto-temporal e nos lobos parietais. Apresentam crescimento rápido que se espalha no tecido normal do cérebro, sendo tumores cerebrais de maior malignidade (Omuro *et al.*, 2013).

Dentre os principais fatores que contribuem para a tumorigênese estão a ativação de proto-oncogenes, perda de genes supressores tumorais e estimulação por fatores de crescimento (Ohgaki *et al.*, 2005). A angiogênese ocorre comumente nos tumores, e é um processo de desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Esse fenômeno é

regulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores. Os gliomas secretam altos níveis de VEGF e exibem caracteristicamente hiperplasia celular endotelial (Plate *et al.*, 2012, Yoshino *et al.*, 2006).

Atualmente estão sendo investigadas algumas anomalias genéticas que podem estar relacionadas com a classificação dos gliomas (Suvá, 2014). Em oligodendrogliomas foram identificados genes supressores localizados no braço do cromossomo 1p19q, que se apresentam deletados. Já para os astrocitomas de grau II e III, foram encontradas alterações na metilação da isocitratodesidrogenase1 e 2 (IDH $\frac{1}{2}$) e na metilação do gene promotor MGMT. (Suvá, 2014, Siegal, 2015).

Os pacientes com tumores cerebrais apresentam manifestações clínicas mais frequentes tais como cefaleia, mudanças cognitivas, papiledema, disfasia ou hemiparesia progressiva. Além dessas manifestações, alguns pacientes apresentam convulsões epiléticas que podem comprometer a função neuronal (Chandana *et al.*, 2008). O glutamato, liberado de células gliais em altas concentrações neurotóxicas, pode ser responsável pelas convulsões que ocorrem em pacientes com gliomas (Liubinas *et al.*, 2014).

1.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DOS GLIOMAS

A sobrevida média dos pacientes com tumores cerebrais é de dois anos, apresentando a terceira mais baixa taxa de sobrevida entre todos os tipos de câncer (pâncreas e pulmão têm a primeira e a segunda, respectivamente) (Omuro, *et al.*, 2013). O diagnóstico dos tumores cerebrais é geralmente feito por exames de imagem (ressonância magnética e tomografia

computadorizada), seguido por biópsia. O tratamento inicial para estes tumores é a cirurgia, associada à radioterapia, e, seguida ou não de quimioterapia (Grant *et al.*, 2014).

Mesmo com os tratamentos mais avançados, os quais envolvem as combinações de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, como a temozolomida (TMZ) e bevacizumab (BVZ), menos de 5 % dos pacientes sobrevivem mais que cinco anos após o diagnóstico. O TMZ é um agente alquilante com atividade antitumoral, o qual metila DNA, portanto, causa efeitos colaterais graves, tais como trombocitopenia, leucopenia, anemia, náuseas, vômitos e fadiga, entre outros (Altieri *et al.*, 2014, Bae *et al.*, 2014). O BVZ é um anticorpo monoclonal utilizado como tratamento adjuvante em pacientes com glioma. Ele age reconhecendo o receptor do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), desempenhando um papel de inativar este receptor e reduzir suas sinalizações subsequentes, envolvidas na angiogênese tumoral (Nanegrungsunk *et al.*, 2015, Plate *et al.*, 2012). Consequentemente, são necessários mais estudos sobre os mecanismos moleculares, a fim de facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para estes tumores cerebrais (Kondo *et al.*, 2014).

2. VIA DA p38/MAPK

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato do ATP, e em casos excepcionais do GTP, para os aminoácidos treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr) (Silva *et al.*, 2009).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) pertencem à família de quinases específicas para Ser/Thr que convertem os estímulos extracelulares em uma grande variedade de respostas celulares. Todas as células eucarióticas de mamíferos possuem múltiplas vias das MAPK, as quais coordenadamente regulam expressão gênica, mitose, metabolismo, mobilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação. A fosforilação proteica é o principal mecanismo regulatório utilizado por sistemas de segundos mensageiros que são acoplados a receptores de superfície ou induzidos por distúrbios celulares, tais como estresse e transformação oncogênica (Cargenello *et al.*, 2011; Strnisková *et al.*, 2002).

Pertencentes à família das MAPK estão c-Jun N-terminal (JNKs) 1, 2 e 3, quinases reguladas por sinais extracelulares, (ERKs) 1 e 2, p38 MAPK (p38 α , β , γ e δ) e proteínas quinases ativadas pelo estresse (SPAK α , β e γ) e são descritas por formarem o grupo clássico das MAPKs (Mitic *et al.*, 2014). Há outro grupo denominado de atípicos, que abrange ERKs 3, 4 e 7 e quinase similar a Nemo (NLK) (Cargenello, *et al.*, 2011). Nas células eucarióticas de mamíferos, existem diversas vias de sinalização das MAPK: cascata de proteína quinase ativada por sinal extracelular (cascata de ERK), cascata de proteína quinase ativada por estresse/c-Jun amino-terminal quinase (cascata de JNK/SAPK) e cascata dap38/MAPK (Strnisková *et al.*, 2002).

P38/MAPK foi primeiramente isolada durante um estudo que visava identificar proteínas que são fosforiladas em tirosina nos macrófagos estimulados com endotoxinalipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Até agora foram encontrados quatro membros de p38/MAPK que foram clonados e caracterizados: p38 α (SAPK 2), p38 β (SAPK 2b), p38 γ (ERK 6\SAPK 3) e p38 δ

(SAPK 4) (Strnisková *et al.*, 2002). Estas diferentes isoformas estão presentes no núcleo e no citoplasma das células eucarióticas. A expressão de p38 α e p38 β é alta na maioria de tipos celulares e no cérebro, respectivamente, enquanto que a p38 γ se encontra no músculo esquelético e cardíaco e a p38 δ , nas glândulas endócrinas, onde desempenham funções especializadas, como por exemplo indução da diferenciação celular e inibição da proliferação e tumorigênese em diferentes órgãos (Figura 1) (Cargnello *et al.*, 2011, Cuadrado *et al.*, 2010).

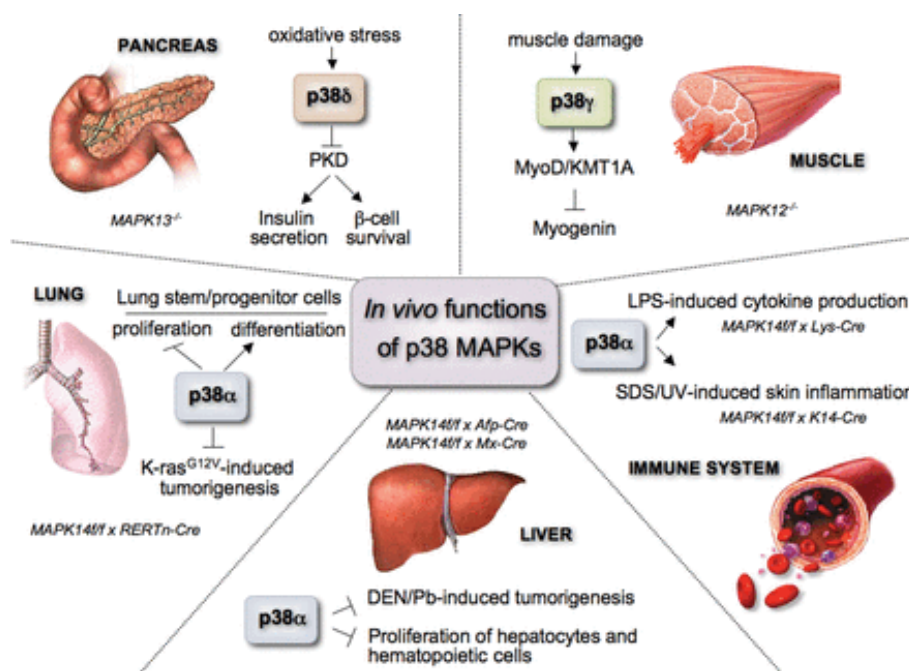


Figura 1: Funções especializadas das diferentes isoformas da p38/MAPK. Adaptado de Cuadrado, 2010.

Todas as quatro isoformas de p38/MAPK podem ser ativadas por um grupo de estímulos extracelulares que incluem citocinas pro-inflamatórias, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e inibidores da síntese de

proteínas. Embora elas exibam perfis similares de ativação, as diferenças são observadas nas cinéticas e nos níveis de ativação (Strnisková *et al.*, 2002, Cuadrado *et al.*, 2010). Na Figura 2, são mostrados os principais mecanismos de ativação das isoformas da p38/MAPK. Após a ativação, inicia-se uma sequência de fosforilações de diferentes proteínas citosólicas que culminam na ativação das isoformas da p38/MAPK. Estas, também por fosforilação, vão ativar diferentes fatores envolvidos na transcrição gênica, tradução e translação de proteínas, assim como na liberação de fatores de crescimento.

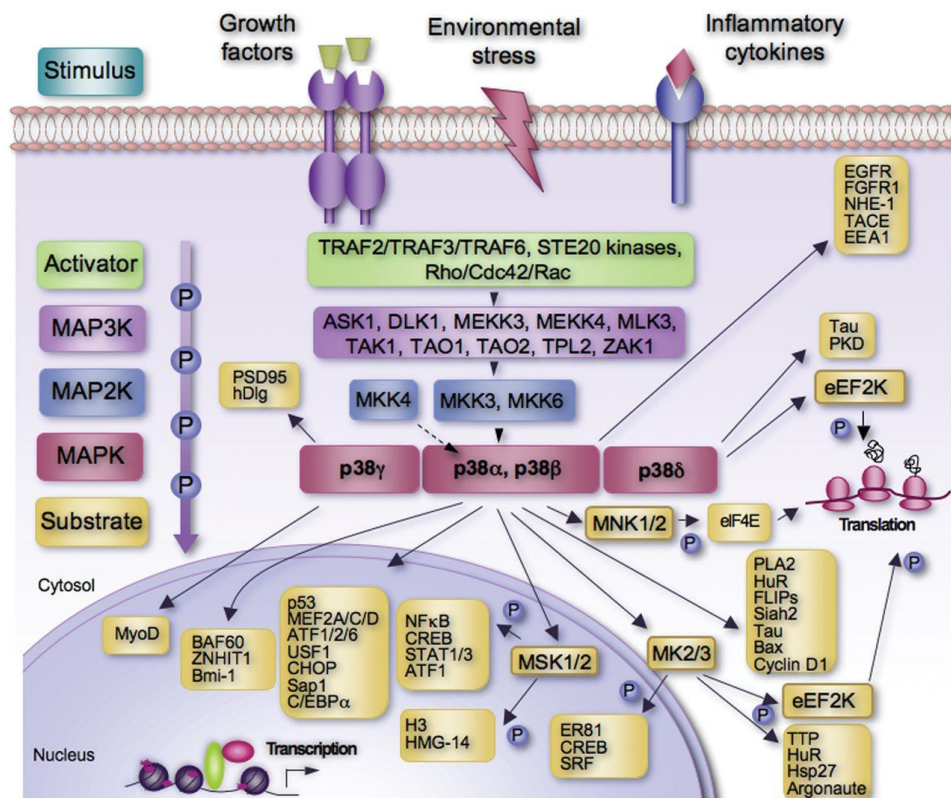


Figura 2: Mecanismos de isoformas de p38 MAPK. Adaptado de Cuadrado, 2010.

A identificação e o uso de inibidores específicos de MAPKs representam uma estratégia eficaz para estudo de substratos fisiológicos e os papéis das

MAPKs nas células de mamíferos. Até hoje, foram identificados alguns inibidores de p38/MAPK tais como, SB 203580 (inibidor de p38 α), SB 202190 (inibidor específico de todas isoformas de p38), CBS-3595 (inibidor duplo de p38 e de PDE4) e especialmente, o ML3403 (inibidor de p38 α) (figura 3) (Strnisková *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2013).

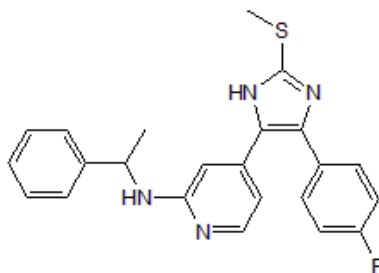


Figura 3: Estrutura química de ML3403. Adaptado de Koch, 2013

Dentre as inúmeras funções atribuídas às isoformas da p38/MAPK pode-se citar também o controle sobre a inflamação. Recentes estudos indicam que a inflamação crônica pode provocar certos tipos de tumores, inclusive gliomas. As células inflamatórias do tumor infiltrado produzem uma variedade de citocinas, tais como TNF, IL-1 β e IL-6, com o objetivo de induzir a sobrevivência, crescimento, proliferação, diferenciação e metástase das células tumorais. Essas citocinas ao ativarem as isoformas de p38/MAPK, desencadeiam sinais que promovem crescimento, proliferação e diferenciação celular, inclusive em células tumorais (Koul *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a ação do composto, inibidor da p38/MAPK, ML3403, sobre o crescimento de linhagens celulares de glioma humano U-138MG e U-251MG.

3.2. ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a ação do ML3403 na proliferação das linhagens de glioma humano U-138MG e U-251MG através do ensaio de contagem do número de células.
- b) Avaliar a ação do ML3403 na viabilidade das linhagens de glioma humano U-138MG e U-251MG através do ensaio de MTT.
- c) Investigar o efeito do co-tratamento entre ML3403 e o Bevacizumab (BVZ) sobre a viabilidade das linhagens de glioma humano U-138MG e U-251MG através do ensaio de MTT.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

EFFECTS OF ML 3403, a P38/MAPK INHIBITOR, AND BEVACIZUMAB ON HUMAN GLIOMA CELL PROLIFERATION

**Ana Helena Bretanha Lopes Tort^{1,2}; Angélica Regina Cappellari^{2,3};
Fernanda Olicheski⁴; Stefan Laufer⁵; Maria Martha Campos^{1,6}; Fernanda
Bueno Morrone^{1,2,3,4}**

¹ Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada, PUCRS, Porto Alegre/RS – Brasil;

² Programa de Pós Graduação em Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS, Porto Alegre/RS - Brasil

³ Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre/RS – Brasil;

⁴ Faculdade de Farmácia, PUCRS, Porto Alegre/RS;

⁵ Department of Pharmacy, EberhardKarls, Tübingen University, Germany

⁶ Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre

Correspondent Author with the concordance of all authors.

Dr. Fernanda Bueno Morrone

*Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
90619-900 Porto Alegre-RS*

Brazil

Fone: + 55 51 33203512

Fax: + 55 51 33203612
e-mail: fernanda.morrone@pucrs.br

ABSTRACT

Gliomas are primary tumors of the central nervous system that are associated with a high mortality rate. Less than 5 % of glioma patients survive more than five years after diagnosis, even those treated with state of the art protocols, which include surgery, radiotherapy and chemotherapy. Tumors result from impairments of intracellular signaling pathways, including the p38/MAPK pathway, which, are responsible to control of cell proliferation and tumorigenesis, among other cellular responses. The goal of the present work was to investigate the effects of ML3403, an inhibitor of p38/MAPK, on the viability of glioma cells, and to assess its effect when combined with bevacizumab (BVZ). BVZ is already used in the clinical setting as a chemotherapeutic drug for treating gliomas. It is a monoclonal antibody against VEGF-A receptor and thus reduces the signaling involved in tumor angiogenesis. U-138MG and U-251MG glioma cells were treated with ML3403 (0,1 to 200 μ M) and BVZ (1 to 200 μ g/mL) and later assessed for cell viability and proliferation. Results obtained demonstrate that treatment with ML3403 reduces glioma cell viability and proliferation. Co-treatment with BVZ does not present any significant effect. The use of p38/MAPK inhibitors may constitute an interesting treatment against glioma progression.

Keys words: gliomas, angiogenesis, VEGF, BVZ, p38/MAPK.

1. INTRODUCTION

Gliomas are the most common tumor of the Central Nervous System (CNS) and presents high rates of mortality (Jovcevska *et al.*, 2013). On the world, annually there are detected new cases of brain primary tumors at a rate of 3.8 per 100,000 in men and 3.1 per 100,000 in women. Of those cases, 70% are diagnosed as malignant gliomas. Gliomas occur in all age groups, however, they are more prevalent in adults over 45 years old (Altieri *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2014; Ohgaki *et al.*, 2004). These tumors are generated from astrocytes, oligodendrocytes or from their precursors in the CNS and shown similar morphology and gene expression (Ramakrishna *et al.*, 2015; Suva, 2014). In accordance to World Health Organization (WHO), gliomas are classified in four grades: grade I (pilocytic astrocytoma), grade II (low-grade astrocytoma, low-grade oligodendroglioma and oligoastrocytoma), grade III (anaplastic astrocytoma and anaplastic oligodendroglioma) and grade IV (glioblastoma multiforme), where the higher grade presents a worse prognosis (Ahmed *et al.*, 2014; Nanegrungsunk *et al.*, 2015).

Patients with glioma present a median survival of two years, (Omuro *et al.*, 2013). Even with the most advanced treatments, which involve combinations of surgery, radiation and chemotherapy, including temozolomide (TMZ) and bevacizumab (BVZ), and less than 5% of patients survive more than five years after diagnosis. TMZ is an alkylating agent that causes serious side effects such as thrombocytopenia, leukopenia, anemia, nausea, vomiting and fatigue, among others (Altieri *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2014). BVZ is a monoclonal antibody that acts against vascular endothelial growth factor A

(VEGF-A), promoting the inactivation of its receptor (VEGFR) and reducing its subsequent signaling involved in the tumor angiogenesis. It has been used as adjuvant in glioma chemotherapy (Nanegrungsunk *et al.*, 2015; Plate *et al.*, 2012). Both treatments generate some collateral effects and promote a poor quality of life to patients. In this way, is necessary the development of new drugs with more efficacy and that promote a better survival to patients.

Most tumors result from different defects in intracellular signaling pathway, including the p38/MAPK. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) belong to the family kinases specific for Ser/Thr that convert extracellular stimuli in a variety of cellular responses. All eukaryotic cells have multiple pathways of MAPK, which coordinately regulate gene expression, mitosis, metabolism, motility, survival, apoptosis and differentiation. Protein phosphorylation is a major regulatory mechanism used by second messenger systems, which are coupled to surface receptors or induced cellular disorders such as stress and oncogenic transformation (Cargenello *et al.*, 2011; Strsnirková *et al.*, 2002). P38/MAPK is part of the MAPK family. There are four isoforms identified for their well-known functions. All four isoforms of p38 pathway (p38 α , p38 β , p38 γ and p38 δ) can be activated by a group of extracellular stimuli, including pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), protein synthesis inhibitors and stress (Cuadrado *et al.*, 2010). Among the main functions described for p38/MAPK, we highlighted the control of inflammation. Recent studies indicate that chronic inflammation can promote some types of cancers, including gliomas (Huang *et al.*, 2010). Inflammatory cells of infiltrate tumor produce a variety of cytokines, such as TNF, IL- 1 β and IL -6, in order to induce the survival, growth,

proliferation, differentiation and metastasis of tumor cells. The cytokines act by activating p38/MAPK isoforms and trigger these cell signals in the tumor cells (Koul *et al.*, 2013).

The identification and use of specific inhibitors of MAPKs represent an effective strategy to study the physiological substrates and roles of MAPKs in mammalian cells. To date, it has been identified some p38/MAPK inhibitors, such as SB 203580, SB 202190, CBS- 3595 and ML3403 (Strnisková *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2013). Therefore, the aim of this work is to investigate the effects of ML3403, a p38/MAPK inhibitor, on glioma cell viability and to evaluate its effect combined with BVZ, already used as treatment for human gliomas.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Compounds

ML3403 was generated by Department of Pharmacy, Eberhard Karls Tübingen University (Tübingen, Germany); dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum 10 % (FBS) and trypsin were obtained from Gibco - Life Technologies (St. Louis, USA), Bevacizumab (BVZ) was donated by Hospital São Lucas (Porto Alegre/RS, Brasil).

2.2 Cell lines and cell culture

The U-138 MG and U-251 MG human glioblastoma cell lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection). Cells were kept in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10 % fetal bovine serum

(FBS) at temperature of 37 ° C, a minimum relative humidity of 95 %, and an atmosphere of 5 % CO₂ in air.

2.3 Cell viability

Glioma cells were seeded at 5×10^3 cells per well in 96-well plates and grown for 24 h. The cells were treated with ML3403 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 and 200 μ M) or with BVZ (1, 10, 50, 100 and 200 μ g/mL). At the end of this period, the medium was removed, the cells were washed with calcium magnesium-free medium (CMF). Following, 100 μ l of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution 90% (diluted in DMEM 10% FBS) was added to the cells and incubated for 3h. The formazan crystals were dissolved with 100 μ l of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was quantified in 96-well plates (Spectra Max M2e, Soft Max®Pro 5 of Molecular Devices) at 492 nm. This absorbance was linearly proportional to the number of live cells with active mitochondria. The cell viability was calculated using the following equation: Cell viability (%) = $(Abs_s / Abs_{control}) \times 100$, where Abs_s is the absorbance of cells treated with different formulations and $Abs_{control}$ is the absorbance of control cells.

2.4 Cell counting

Glioma cells were seeded at 20×10^3 cells per well in 24 well plates. On the second day, the cells were treated with ML3403 (10, 20, 50, 100, 150 and 200 μ M). After 24 h, the medium was collected and 100 μ l of trypsin/EDTA solution was added to detach the cells. Follow, the cell number was determined

by Cell Counter – Countess FL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The results were expressed as percent in relation to control.

2.5 Statistical analysis

Data were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, using Graph- Pad Software (San Diego, CA, U.S.A.). p values <0.05 were taken to indicate statistical significance.

3. RESULTS

To analyze glioma cell viability, U-138 MG and U-251 MG cells were treated for 24h with different concentrations of ML3403 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 and 200 μ M), as described in Material and Methods section. As shown on Figure 1, ML3403 presented significant impact on cell viability at 200 μ M just in U-138 MG glioma cell line. In addition, glioma cells were assessed by cell counting under treatment with ML3403 in order to evaluate its effect on cell proliferation. As shown in the Figure 2, we chose the high concentrations of ML3403 (10, 20, 50, 100, 150 and 200 μ M) and we observed a significant reduction of U-138 MG cell number when treated with ML3403 100 μ M to 200 μ M, for 24 h. Similar results were obtained with U-251 MG cells at 150 and 200 μ M of ML3403. These results suggest that ML3403 promotes a reduction of human glioma cell viability and proliferation.

At the sequence, it was evaluated the effect of ML3403 treatment in combination to BVZ, which is an important monoclonal antibody used as adjuvant treatment of glioma patients. The effect of the co-treatment was evaluated by cell viability protocol (MTT). U-138 MG and U-251 MG cells were

treated for 24h with different concentrations of BVZ (1 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alone or combined with ML3403 20 μM or 200 μM . BVZ did not generate any effect on glioma cell proliferation when administrated alone (Figura 3A). As shown on Figure 3B, BVZ (1 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) combined with ML3403 (20 μM) showed no significant impact on cell proliferation. When glioma cell lines were treated with ML3403 (200 μM) and BVZ (10 to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 3C) there was a reduction of the cell viability which was attributed to ML3403 effects. Co-treatment between ML3403 and BVZ did not generate any affects in comparison it respectively controls.

DISCUSSION

The MAPK signaling presents important role on anticancer therapies. Studies indicate that glioma cells require cascades of intracellular signals, mainly p38/MAPK, to proliferate (Zhang *et al.*, 2014). The use of selective and potent inhibitors of p38/MAPK has been fundamental in the research of molecular mechanisms of transduction signals. Among the cellular responses mediated by p38/MAPK family it is highlighted its implication in inflammation processes (Ono *et al.*, 2000; Saklatvala, 2004). The most common isoform is p38 α , which presents a central role in inflammation, since it is expressed in immune, inflammatory and endothelial cells (Yeung *et al.*, 2012). In addition, growth factors can also stimulate the family of p38/MAPK, especially p38 α , promoting cellular responses including synthesis of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL- 1 β and IL -6) (Herlaar *et al.*, 1999; Grivennikov *et al.*, 2010). The high levels of cytokines may contribute to the malignant and metastatic tumors to favour the invasion and cellular migration (Yeung *et al.*, 2012). ML3403 is a

p38 α inhibitor and was demonstrated to reduce the effects of inflammation triggered by rheumatoid arthritis (Koch *et al.*, 2013).

Recent studies showed that members of MAPKs are often activated in human tumors and were associated with cell proliferation, migration and metastasis. The inhibitors of p38/MAPK have been described as tumor suppressors, under stress conditions. Tumor cells such as lung, breast and pancreas, treated with inhibitors of p38/MAPK presented a significantly reduction of cell proliferation (Cheng *et al.*, 2014). Here, we demonstrated that ML3403 promotes reduction of cell viability and proliferation in human glioma cell lines U-138 MG and U-251 MG.

Gliomas are highly vascularized and angiogenic, exhibiting endothelial cell hyperplasia and further secrete high levels of VEGF, which is involved in the growth and progress of malignant tumors to favoring angiogenesis. Growth factors and cytokines released in the inflammatory responses regulate the VEGF expression (Yoshino *et al.*, 2006). Studies indicate the involvement of p38/MAPK in angiogenesis since the cellular and morphological events in stress can lead to angiogenic appearance (Gee *et al.*, 2010). It should be noted that the stress stimulates the activation of p38/MAPK, which appears the process of angiogenesis resulting in high expression of VEGF. Regulation of VEGF production by p38/MAPK family was reported in previous studies as an important step in angiogenesis (Aeosy *et al.*, 2008, Gee *et al.*, 2010). Recent studies indicate that inhibitors of VEGF and its receptors significantly reduce the phosphorylation of p38/MAPK in glioma cells lines, T98G, U373 MG, U87 MG and A172 (Yoshino *et al.*, 2006). Here, we demonstrated that the co-treatment with ML3403 and BVZ, a monoclonal antibody that blocks the VEGFR, did no

promote an additive effect on glioma cell proliferation. These results with BVZ treatment are in accordance to previous published data with other glioma cell line, U-87 MG, where the treatment with BVZ does not generate any effect *in vitro* (Mesti *et al.*, 2014). Probably this occurs because BVZ promotes an inhibition of angiogenesis from preexistent vessels in the tumor microenvironment which are absent *in vitro* conditions. Further experiments *in vivo* would be necessary to confirm this hypothesis.

The development of a therapy including p38/MAPK inhibitors together with other antineoplastic drugs can constitute a new tool to cancer treatment. Accordingly, in this work we demonstrated that ML3403 has beneficial effects in cell culture. More experiments are necessary to prove the efficiency of ML3403 in combination of the monoclonal antibody BVZ in glioma cell lines.

REFERENCES

- Aeosy R, Sanchez B.C, Norum J.H, Lewensohn R, Viktorsson K, Linderholm B (2008). An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 6(10): 1630-38.
- Ahmed R, Oborski M, Hwang M, Lieberman F.S, Mountz J.M (2014). Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*, 24(6): 149-70.
- Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, Garbossa D, Calamo Specchia F.M, Bozzaro M, Fornaro R, Mencarani C, Lanotte M, Spaziante R, Ducati A (2014). Molecular biology of gliomas: present and future challenges. *Translational Medicine*, 10(7): 29-37.
- Bae S H, Park M.J, Lee M.M, Kim T.M, Lee S.H, Cho S.Y, Kim Y.H, Kim Y.J, Park C.K, Kim C.Y (2014). Toxicity Profile of Temozolomide in the treatment of 300 Malignant Glioma Patients in Korea. *Journal Korean Medical Science*, 29(7): 980-84.
- Cargnello M, Roux P.P (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1): 50-83.
- Cheng X, Holenya P, Can S, Alborzinia H, Rubbiani R, Ott I, Wolf S (2014). A TrxR inhibiting gold (I) NHC complex induces apoptosis through ASK 1-p38/MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer*, 13:221.

Cuadrado A, Nebreda A.R (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3): 403-17.

Gee E, Milkiewicz M, Haas T.L (2010). P38 MAPK is activated by vascular endothelial growth factor receptor 2 and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *Journal Cell Physiology*, 222(1): 120-26.

Grivennikov S, Greten F.R, Karin M (2010). Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 140(6): 883-99.

Herlaar E, Brown Z (1999). P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*, 5: 439-447.

Huang P, Han J, Hui L (2010). MAPK signalling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 1(3): 218-26.

Koch D.A, Silva R.B.M, Souza A.H, Leite C.A, Nicoletti N.F, Campos M.M, Laufer S, Morrone F.B (2013). Efficacy and gastrointestinal tolerability of ML3403, a selective inhibitor of p38 MAP kinase and CBS-3595, a dual inhibitor of p38 MAP kinase and phosphodiesterase 4 in CFA-induced arthritis in rats. *Rheumatology*, 53:425-32.

Koul HK, Pal M, Koul S (2013). Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer*, 4(9-10): 342-59.

Jovceska, I., Kocevar N, Komel R (2013). Glioma and glioblastoma- how much do we (not) know? *Molecular and Clinical Oncology*, 1: 935-941.

Mesti T, Savarin P, Triba M.N, Le Moyec L, Ocvirk J, Banissi C, Carpentier A.F (2014). Metabolic impact of anti-angiogenic agents on U87 gliomas cells. *Plos One*, 9(6):e99198.

Nanegrungsunk D, Onchan W, Chattipakorn N, Chattipakorn S.C (2015). Current evidence of temozolomide and bevacizumab in treatment of gliomas. *Neurological Research*, 37(2): 167-83.

Ohgaki H, Kleihues P (2004). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathology*, 27(109): 93-108.

Omuro A, DeAngelis L (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *The Journal of the American Medical Association*, 310(17): 1842-50.

Ono K, Han J (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cellular signalling*, 12: 1-13.

Plate K.H, Scholz A, Dumont D (2012). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathology*. 124: 763-775.

Ramakrishna R, Pisapia D (2015). Recent Molecular Advances in our Understanding of Glioma. *Cureus*, 7(7): e287.

Saklatvala J (2004). The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Science direct*, 4: 372-77.

Strnisková M, Barancik M, Ravingerová T (2002). Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Genetic Physiology Biophys*, 21: 231-55.

Suvá M (2014). Genetics and epigenetics of gliomas. *Swiss Medical Weekly*, 144: w14018.

Yeung Y, Bryce N, Adams S, Braidy N, Konayagi M, McDonald K.L, Teo C, Guillemin G.J, Grewal T, Munoz L (2012). P38 MAPK inhibitors attenuate pro-

inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U-251 MG glioblastoma cells. *Journal Neurooncology*, 109: 35-44.

Yoshino Y, Aoyagi M, Tamaki M, Duan L, Morimoto T, Ohno K (2006). Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *International Journal of Oncology* 29: 981-87.

Zhang Z, Lv J, Lei X, Li S, Zhang Y, Meng L, Xue R, Li Z (2014). Baicalein reduces the invasion of glioma cells via reducing the activity of p38 signaling pathway. *Plos one*, 9(2):e90318.

LIST OF LEGENDS

Figure 1. Effect of ML3403 on glioma cell viability. Cell viability was assessed by MTT assay as described in Material and Methods section. DMSO was used as vehicle. **A)** Represent data obtained with U-138 MG glioma cell line and **B)** with U-251 MG cell line. Experiments were performed five times in triplicate. Values represent the means \pm SD and (***) $p < 0.001$ indicate significant difference in relation to DMSO.

Figure 2. Effect of ML3403 on cell counting. Cell number was assessed by trypan blue exclusion and follow the cell number was evaluated by Cell Counter, as described in Material and Methods. Experiments were performed five times in triplicate. Values represent the means \pm SD of the experiments performed. (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ indicate the significant difference in relation to DMSO.

Figure 3. Effect of ML3403 and BVZ on U-138 MG and U-251 MG cell viability. Cell viability was assessed by MTT assay and DMSO was used as vehicle. **A)** Glioma cell viability after treatment with different concentrations of BVZ. **B)** Represent data obtained after co-treatment of BVZ plus ML3403 20 μ M and **C)** BVZ plus ML3403 200 μ M. Experiments were performed three times in triplicate. Values represent the means \pm SD and (*) $p < 0.05$ indicate significant difference in relation to DMSO.

LIST OF FIGURES

Figure 1

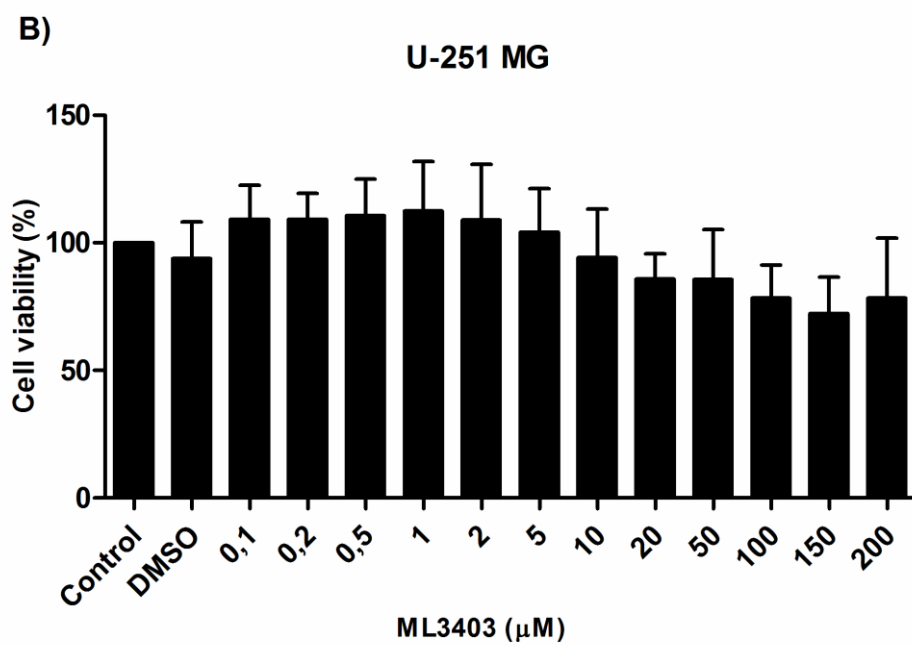
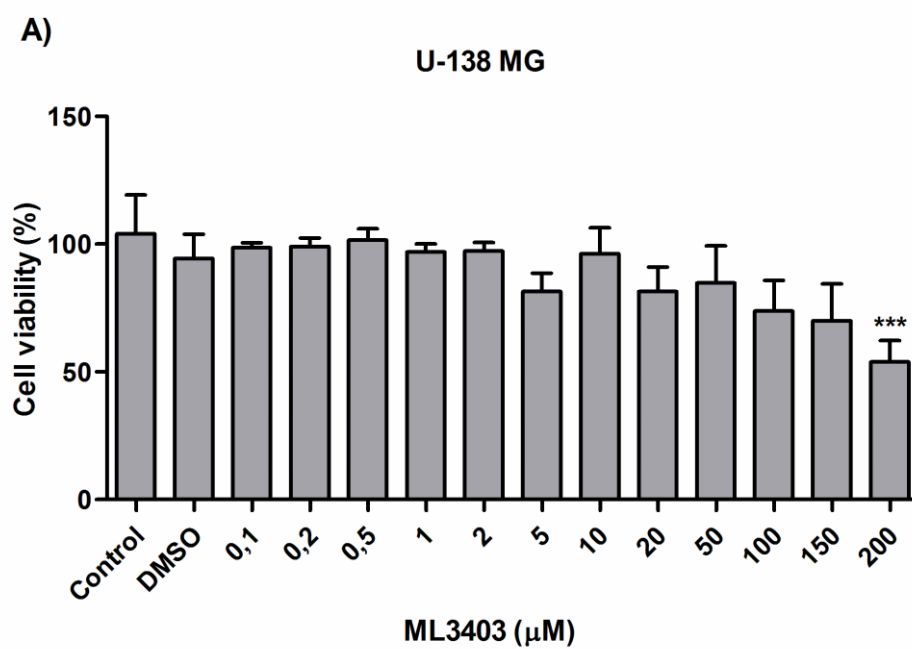


Figure 2

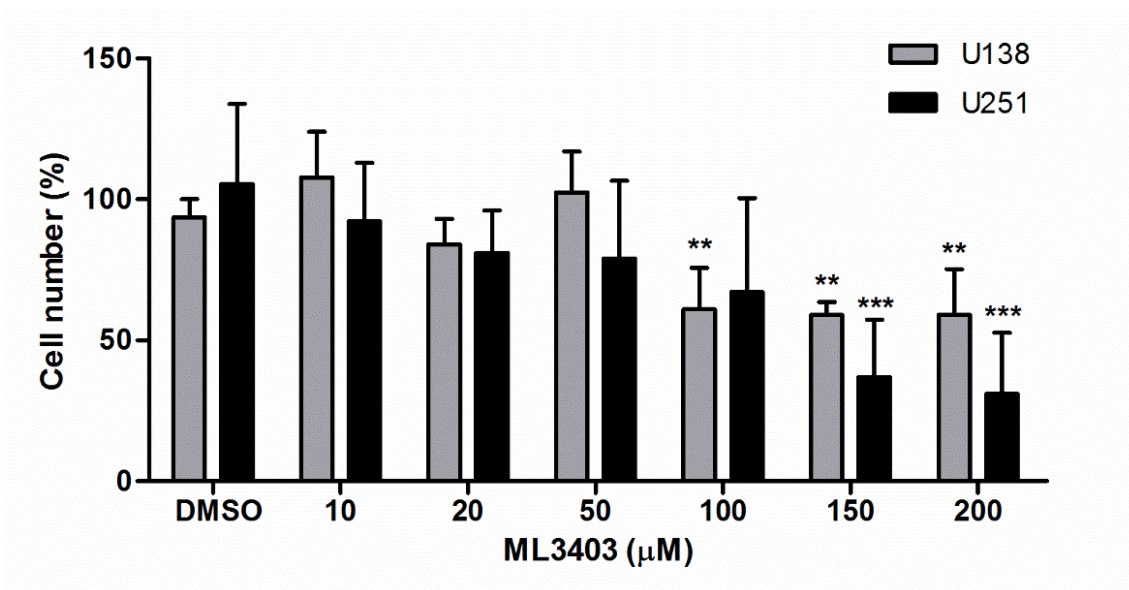
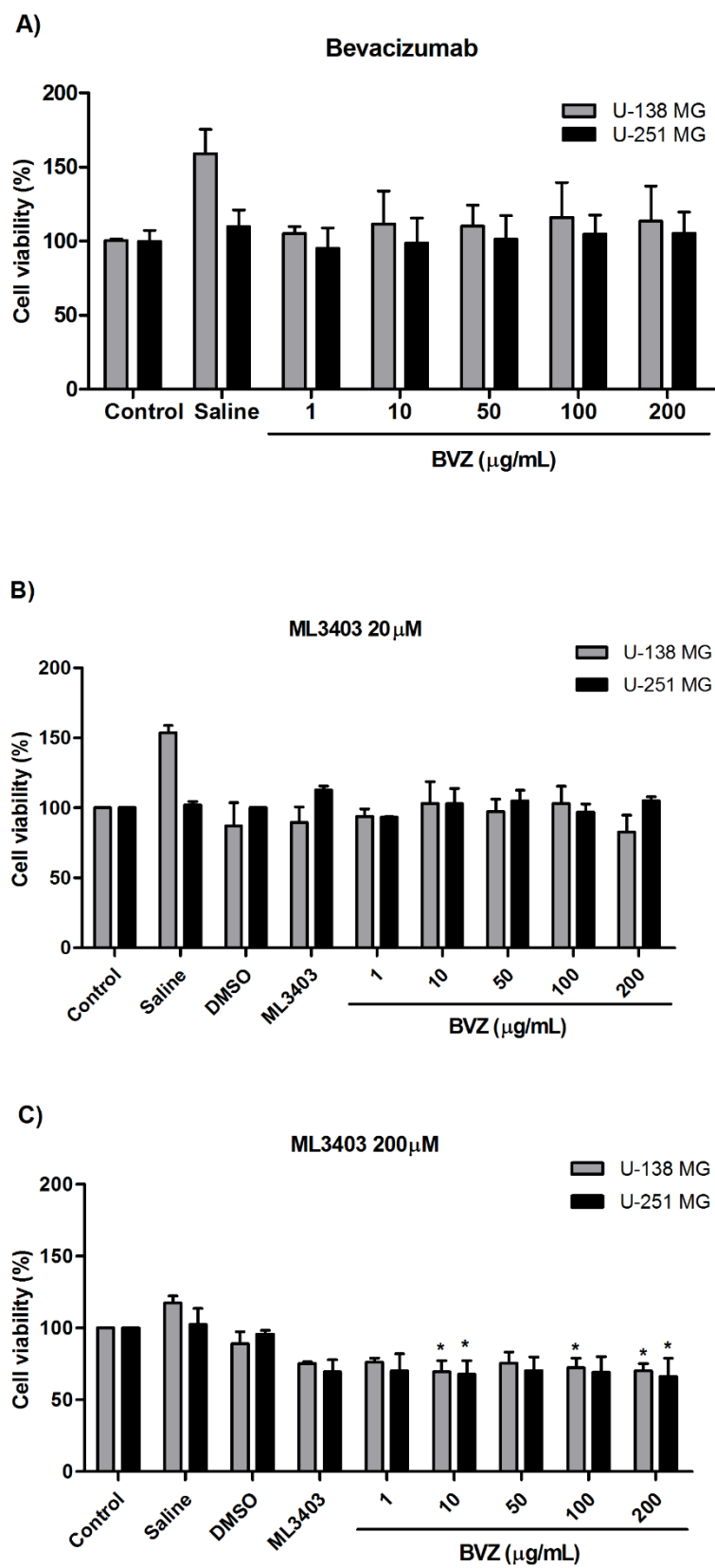


Figure 3



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tumores resultam de diversos defeitos nas sinalizações intracelulares, destacando-se a sinalização da MAPK como um papel importante no tratamento de cânceres. De acordo com estudos prévios, as células de glioma requerem várias cascatas de sinalizações intracelulares, principalmente a via da p38/MAPK para os processos celulares como a proliferação e o crescimento (Zhang *et al.*, 2014). O desenvolvimento de inibidores seletivos e potentes de p38/MAPK tem sido fundamental na investigação de mecanismos moleculares de transdução de sinal e de regulação de respostas celulares.

Até hoje, foram identificadas quatro isoformas de p38/MAPK e as suas funções têm sido conhecidas, tais como diferenciação e sobrevivência celular. Entre as respostas celulares mediadas pela família de p38/MAPK, destaca-se a inflamação (Ono *et al.*, 2000, Saklatvala, 2004). Por ser a isoforma mais comum, a p38 α desempenha um papel central na inflamação, pois a mesma se localiza em células imunes, endoteliais e inflamatórias (Yeung *et al.*, 2012). No século 19, o estudo de Rudolf Virchow indicou a primeira correlação entre a inflamação e o câncer. Os mecanismos moleculares de inflamação no desenvolvimento tumoral estão sendo elucidados e demonstram que evidentemente o microambiente de inflamação é um componente essencial de todos os tumores (Grivennikov *et al.*, 2010). O microambiente tumoral contém células imunes inatas (macrófagos, neutrófilos, mastócitos, entre outros) e as células imunes adaptativas (linfócitos T e B). Durante o processo inflamatório desencadeado pelo tumor, ocorre o recrutamento de leucócitos e a ativação de células inflamatórias, os quais promovem a liberação dos fatores de

crescimento. Esses fatores de crescimento estimulam a família de p38/MAPK, principalmente a p38 α , enviando respostas celulares, inclusive a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) (Herlaar *et al.*, 1999 e Grivennikov *et al.*, 2010). Os altos níveis de citocinas podem contribuir para a malignidade e a metástase de tumores, pois favorecem a invasão e a migração celulares (Yeung *et al.*, 2012).

Estudos iniciais realizados por nosso grupo demonstraram que o ML3403, inibidor de p38 α , promoveu a redução dos efeitos da inflamação desencadeada pela artrite reumatoide em um modelo animal (Koch *et al.*, 2013). Aqui, nossos resultados apontam que o ML3403 foi efetivo em diminuir a viabilidade e proliferação celular nas linhagens de glioma humano U-138MG e de U-251MG. Estes dados demonstram que houve diminuição na proliferação da linhagem celular U-138 MG quando tratada com ML3403 na concentração de 200 μ M. Quanto maior a concentração utilizada deste inibidor de p38/MAPK, mais evidente é a inibição de via de p38/MAPK. No entanto, a proliferação celular da linhagem U-251 MG quando tratada com a mesma concentração de ML3403 não foi inibida. É importante salientar que ML3403 pode se ligar à forma ativa ou inativa de isoformas de p38/MAPK com afinidades diferentes (Strnisková *et al.*, 2002, Koch *et al.*, 2013). No que diz respeito à contagem celular, houve efeitos significativos observados nas linhagens U-138 MG e U-251 MG nas concentrações com mais de 100 μ M de ML3403. Isto provavelmente se deve ao fato de que as vias de p38/MAPK encontram-se inibidas devido à ação de ML3403, e conseqüentemente há uma diminuição da proliferação celular.

Além disso, cabe salientar a importância da participação das MAPKs na inflamação e no desenvolvimento tumoral, demonstrado em diversos estudos que apontam a sinalização da MAPK como promissores alvos terapêuticos no tratamento de tumores (Koul *et al.*, 2013). É de suma importância o papel central que a p38/MAPK desempenha nos aspectos da biologia celular do câncer: proliferação, sobrevivência, diferenciação, apoptose, morte celular, invasão e migração celular. Entretanto, os mecanismos moleculares de inflamação mediada por MAPK no desenvolvimento de tumor ainda são desconhecidos. No nosso próximo estudo, devemos quantificar a expressão de citocinas pro-inflamatórias liberadas e as isoformas de p38 nas linhagens celulares de glioma, além de avaliar o possível mecanismo de morte celular desencadeado pelo ML3403.

Os gliomas possuem alta vascularização por ter mecanismos angiogênicos e exibem hiperplasia celular endotelial. Por serem vascularizados, os gliomas secretam altos níveis de VEGF, o qual está envolvido no crescimento e na progressão de tumores malignos. A expressão de VEGF é regulada por fatores de crescimento e citocinas liberadas durante a resposta inflamatória (Plate *et al.*, 2012). De acordo com alguns estudos, a via da p38/MAPK, ao ser ativada pelo estresse, pode estar envolvida na angiogênese, a qual expressa os altos níveis de VEGF (Gee *et al.*, 2010). Cabe salientar que a regulação da produção de VEGF pela família de p38/MAPK foi relatada nos estudos anteriores por ser uma etapa importante na angiogênese. Neste estudo investigamos os efeitos do uso combinado de ML3403 e de BVZ, porém os resultados não apresentaram efeito aditivo significativo em ambas as linhagens avaliadas. Estudos recentes indicam que a fosforilação da p38/MAPK

pode ser reduzida por inibidores da secreção de VEGF e a inibição dos receptores para VEGF (VEGFR) podem reduzir a fosforilação da p38/MAPK (Yoshino *et al.*, 2006, Aeosy *et al.*, 2008). É descrito que células de gliomas secretam altos níveis de VEGF através da ativação da p38/MAPK, via estresse e algumas citocinas (TNF- α e IL-1). Deste modo, seria importante quantificar a expressão de VEGF e de seus receptores em gliomas humanos em próximos experimentos.

Em conclusão, este estudo demonstrou os efeitos inibitórios do ML3403 sozinho ou combinado com BVZ na proliferação de células glioma humano U-138 MG e U-251 MG. Esses achados revelam o ML3403 como um promissor tratamento contra gliomas, porém, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual este fármaco promove uma ação inibitória no crescimento dos gliomas.

6. PERSPECTIVAS

Este estudo traz as seguintes perspectivas:

- Avaliação de tipo de morte celular através de citometria de fluxo.
- Realização do co-tratamento com o quimioterápico temozolamida a fim de comparar a atividade do ML3403
- Quantificação da expressão de VEGF e de seus receptores em gliomas humanos em próximos experimentos.
- Realização de *in vivo* a fim de avaliar a ação dos fármacos na invasão e formação de vasos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aeosy R, Sanchez B.C, Norum J.H, Lewensohn R, Viktorsson K, Linderholm B (2008). An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 6(10): 1630-38.

Ahmed R, Oborski M, Hwang M, Lieberman F.S, Mountz J.M (2014). Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*, 24(6): 149-70.

Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, Garbossa D, CalamoSpecchia F.M, Bozzaro M, Fornaro R, Mencarani C, Lanotte M, Spaziante R, Ducati A (2014). Molecular biology of gliomas: present and future challenges. *Translational Medicine*, 10(7): 29-37.

Bae S H, Park M.J, Lee M.M, Kim T.M, Lee S.H, Cho S.Y, Kim Y.H, Kim Y.J, Park C.K, Kim C.Y (2014). Toxicity Profile of Temozolomide in the treatment of 300 Malignant Glioma Patients in Korea. *Journal Korean Medical Science*, 29(7): 980-84.

Cargnello M, Roux P.P (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1): 50-83.

Chandana S.R, Movva S, Singh T (2008). Primary brain tumors in adults. *American Family Physician*, 77(15): 1423-30.

Cuadrado A, Nebreda A.R (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal*, 429(3): 403-17.

Gee E, Milkiewicz M, Haas T.L (2010). P38 MAPK is activated by vascular endothelial growth factor receptor 2 and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *Journal Cell Physiology*, 222(1): 120-26.

Grant R, Kolb L, Moliterno J (2014). Molecular and genetic pathways in gliomas: the future of personalized therapeutics. *CNS Oncology*, 3:123-136.

Grivennikov S, Greten F.R, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-99.

Herlaar E, Brown Z (1999). P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*, 5: 439-447.

Hong C.S, Lehman N.L, Sauvageau E (2014). Pilocytic Astrocytoma Mimicking a Clinoidal Meningioma. *Case Report Radiology*, 2014: 524-74.

Huang P, Han J, Hui L (2010). MAPK signalling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 1(3): 218-26.

Jovceska, I., Kocevar N, Komel R (2013). Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Molecular and Clinical Oncology*, 1: 935-941

Koch D.A, Silva R.B, deSouza A.H, Nicolleti N, Campos MM, Laufer S, Morrone F.B (2013) Efficacy and gastrointestinal tolerability of ML3403, a selective inhibitor of p38 MAP kinase and CBS-3595, a dual inhibitor of p38 MAP kinase and phosphodiesterase 4 in CFA-induced arthritis in rats. *Rheumatology*, 53: 425-432.

Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K (2014). Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Science*, 105 (4): 363 -369.

Koul HK, Pal M, Koul S (2013). Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes Cancer*, 4(9-10): 342-59.

Liubinas S.V, O'Brien T.J, Moffat B.M, Drummond K.J, Morokoff A.P, Kaye A.H (2014). Tumour associated epilepsy and glutamate excitotoxicity in patients with gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(6): 899-908.

Mitic M, Lukic I, Bozovic N, DjorjevicAdzic M (2014). Fluoxetine Signature on Hippocampal MAPK Signalling in Sex-Dependent Manner. *Journal Molecular Neuroscience*, 55(2):335-46.

Nanegrungsunk D, Onchan W, Chattipakorn N, Chattipakorn S.C (2015). Current evidence of temozolomide and bevacuzumab in treatment of gliomas. *Neurological Research*, 37(2): 167-83.

Ohgaki H, Kleihues P (2004). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathology*, 27(109): 93-108.

Ohgaki H (2005). Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology*. 25: 1-7.

Omuro A, DeAngelis L (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *The Journal of the American Medical Association*, 310(17): 1842-50.

Ono K, Han J (2000). The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cellular signalling*, 12: 1-13.

Ostrom Q.T, Gittleman H, Stetson L, Virk S.M, Barnholtz-Sloan J.S (2014). The epidemiology of gliomas in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncology*, 7: 896-913.

Plate K.H, Scholz A, Dumont D (2012). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathology*. 124: 763-775.

Ramakrishna R, Pisapia D (2015). Recent Molecular Advances in our Understanding of Glioma. *Cureus*, 7(7): e287.

Saklatvala J (2004). The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Science direct*, 4: 372-77.

Siegal T (2015). Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *Journal Clinical Neuroscience*, 22(3): 437-44.

Silva B.V, Horta B.A.C, Alencastro R.B, Pinto A.C (2009). Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, 32: 2.

Strnisková M, Barancik M, Ravingerová T (2002). Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Genetic Physiology Biophys*, 21: 231-55.

Suvá M (2014). Genetics and epigenetics of gliomas. *Swiss Medical Weekly*, 144: w14018.

Talibi S.S, Talibi S.S, Aweid B, Aweid O (2014). Prospective therapies for high-grade glial tumours: A literature review. *Annals Medicine and Surgery*, 3(3): 55-59.

Yao P.S, Kang D.Z, Lin R.Y, Ye B, Wang W, Ye Z.C (2014). Glutamate/glutamine metabolism coupling between astrocytes and gliomas cells: Neuroprotection and inhibition of glioma growth. *Biochemical Biophysics Research Community*, 450(1): 295-99.

Yeung Y, Bryce N, Adams S, Braidy N, Konayagi M, McDonald K.L, Teo C, Guillemin G.J, Grewal T, Munoz L (2012). P38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells. *Journal Neurooncology*, 109: 35-44.

Yoshino Y, Aoyagi M, Tamaki M, Duan L, Morimoto T, Ohno K (2006). Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF

secretion in human malignant glioma cells. *International Journal of Oncology* 29: 981-87.

Zhang Z, Lv J, Lei X, Li S, Zhang Y, Meng L, Xue R, Li Z (2014). Baicalein reduces the invasion of glioma cells via reducing the activity of p38 signaling pathway. *Plos one*, 9(2):e90318.