

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNAS-CININAS
NA PROGRESSÃO DE MELANOMA

Patrícia Dillenburg Pilla

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Participação do sistema caliceínas-cininas na progressão de melanoma

Patrícia Dillenburg Pilla

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutora em Ciências

Orientador: Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto

Ribeirão Preto
2010

Dillenburg-Pilla, Patrícia

Participação do Sistema Caliceínas-Cininas na Progressão do Melanoma
– Ribeirão Preto, 2010. 161 p.;

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – FMRP-USP, Departamento de Bioquímica e Imunologia.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto

1- Receptor B1; 2- Melanoma; 3-Câncer; 4- Sistema Caliceína-Cinina

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: a minha família.

Especialmente a minha super mãe, que é meu exemplo de vida, de luta, de batalha e principalmente de alegria de viver!

Ao meu irmão querido, Deco por toda torcida, apoio e companheirismo.

Aos meus avós, Darcy e Cicília, que também sempre torceram por mim e dividiram comigo todos os momentos deste trabalho, sempre com sábios conselhos.

Obrigado! Sem esta base forte e sólida que vocês me dão não sei se teria sido possível...

... e como não poderia faltar, dedico este trabalho àquele que deixa os meus dias mais coloridos e foi quem eu escolhi para começar uma nova família. O meu amor, o meu companheiro, o meu porto seguro, o meu melhor amigo, a melhor companhia do mundo em todas as ocasiões, o meu amado Carlos Rodrigo.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar àquela que me conhece melhor do que eu mesma. Àquela que é o meu exemplo de vida. Àquela que é minha cúmplice, minha grande amiga de todas as horas. Àquela que sempre me lembra que a vida é boa, mesmo durante as épocas turbulentas. Àquela que me apóia, que me suporta, e que me enche de amor e carinho. À minha mãe Inês! Muito obrigado mamizinha!

Ao meu irmão André pela torcida! Sempre! Pelo apoio e companheirismo incondicionais, mesmo a distância!

Aos responsáveis pela linda família que eu tenho os meus queridos avós Cicília e Darcy Dillenburg. Muito obrigado pela super torcida, pelo estímulo e suporte que nunca faltaram. Muito obrigado pelo exemplo de honestidade, ética e amor pela ciência. Tenho certeza que não é uma mera coincidência que tantos Dillenburgs tenham escolhido a vida acadêmica. Acredito que é um reflexo do amor, da alegria, do prazer que enchemos durante a vida toda no vô quando se trata do Instituto de Física da UFRGS, da própria UFRGS, ou de qualquer tema relacionado à educação superior no país; da paixão da vó pelas suas plantinhas, pela taxonomia vegetal, pela sua incansável curiosidade que nos fazia andar devagar para ir olhando as espécies que encontrava ao longo de um passeio. Quantas crianças brincavam de montar um herbário na casa da vó? Eu brincava! Muito obrigado por me contagiarem com este amor pela ciência!

Ao meu amado Carlos Rodrigo, por toda a torcida e amor! Pelo apoio incondicional! Pelas dicas, sugestões e críticas! Por me estimular a sempre buscar mais, a sempre querer o melhor! Pela deliciosa convivência que temos e principalmente por fazer com que eu te ame e te admire! Cada dia mais! Muito obrigado meu amor!

Ao Prof. Dr. Claudio da Costa Neto pela oportunidade de desenvolver o meu doutorado em seu laboratório;

À Prof. Dr. Clara Nahmias, minha orientadora durante o meu estágio de doutorado no Institut Cochin em Paris – França, por me acolher em seu laboratório, por todos os ensinamentos, pelas discussões científicas e pelo investimento que fez no meu crescimento como pesquisadora;

Ao pessoal do laboratório do Prof. Claudio: Rosana, Lucas, Laura, Natália, Mariela, Geisa e Fábio por fazerem do ambiente de trabalho um lugar mais prazeroso e pelas valiosas discussões científicas;

Ao Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes pelas discussões e sugestões enriquecedoras ao trabalho, bem como por sua contribuição no nosso grupo de seminários semanais;

Ao Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira pela convivência sempre enriquecedora, pelas conversas que tanto contribuíram na minha formação e principalmente pelo exemplo de

cientista e orientador que és. Professor, eu tenho uma grande admiração por ti e gostaria de te agradecer, especialmente, por me contagiar com um pouquinho da paixão e dedicação que tens pela ciência;

À Dr. Sylvie Rodrigues Ferreira pelas incansáveis discussões científicas, pelos conselhos nos experimentos, pela amizade e apoio durante o período que passamos juntas no Institut Cochin – Paris - França;

Gostaria de agradecer especialmente às minhas queridíssimas amigas Marília e Andrea Maria por todo apoio e amizade durante esta fase em Ribeirão Preto. Vocês com certeza fizeram esta fase aqui muito mais feliz!

Ao pessoal do nosso grupo de pesquisa, Adriana, Samico, Felipe e Mariana do laboratório do Prof. Marcelo Damário Gomes e Lara, Liliane e Hugo alunos do Prof. Eduardo Brandt, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas discussões científicas e pelos momentos de descontração;

Às técnicas Lúcia e Odete por estarem disponíveis quando nós alunos precisamos e por todo o suporte;

Aos amigos da secretaria, Ivone Maria e Ronaldo por toda ajuda, sempre;

Aos membros da banca examinadora: Andréia Leopoldino, Dario Zamboni, Sérgio Akira e Miriam Jasiulionis por aceitarem o convite de compor a banca e avaliarem este trabalho;

À Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado, por quem também guardo uma grande admiração e a seus alunos que sempre estiveram disponíveis em todos os momentos em que os procurei, sempre dispostos a ajudar;

À Profa. Dra. Simone Gusmão e sua querida técnica Elaine por toda a ajuda na parte de histologia deste trabalho e pelos vários momentos agradáveis e descontraídos durante o trabalho;

Ao laboratório do Prof. Dr. Fernando de Lucca, em especial às minhas amigas Viviane e Thais e à sua técnica Cacilda que me auxiliou nos experimentos de metástase pulmonar;

Ao Prof. Dr. Dario Zamboni por me abrir o laboratório para realização de alguns ensaios de microscopia, e aos seus alunos: Cati, Tati, Larissa, Joni, Marcelo, Lili, Jú que pela convivência sempre agradável e enriquecedora se tornaram bons amigos;

Um agradecimento muito especial à minha queridíssima amiga (e madrinha) Lalazinha pela grande amizade, pelos tantos momentos bons que passamos juntas, pelos inúmeros passeios gratuitos sempre muito agradáveis, pelas conversas, pela grande cumplicidade;

Ao laboratório do Prof. Dr. Celio Silva que sempre me recebeu de braços abertos e onde eu fiz grandes e inesquecíveis amigos. Izinha, Aninha, Pets, Wendy, Fredi, Rogério e Mix, Rodrigo, Nayara, Luana e Sheila muito obrigado pelo apoio, pela torcida, pelos cafezinhos e pela amizade!

Aos laboratórios da Prof. Dr. Christiane Salbego e do Prof. Dr. Guido Lenz, fundamentais no começo da minha vida científica e que sempre mantiveram as portas abertas.

Aos amigos da pós graduação: Lú, Tiaguinho, Zé Eduardo e Tati (Lab Prof^a. Arlete); Tânia, Degu, Drous, Clarissa, Marcos, Rose, Flor (República da Marília e agregados) Flávia (República da Lala), Larissa (Lab Prof. Coutinho e colega de doutorado direto), Fezinha, Fabi, Renata (Lab Prof. Fernando Cunha);

Às minhas queridas companheiras de queimada pelas divertidas sextas feiras;

Aos meus queridos familiares que sempre estiveram na torcida em todas as minhas empreitadas: Tia Thereza; Tio Afrânio; Tio Claudio, Tia Naadya e seus filhos Flávia e Vitor; Tio Sérgio, Fabrícia e seus filhos Rodrigo e Guilherme; Titi, Tio Mauro e seus filhos Lucas e Jonas; Tio Marcos, Tia Lúcia Helena e seus filhos Danielle e Felipe; Jacob, suas filhas e enteado Débora, Betina e Marcelo;

Aos queridos tios de coração Cristina, Thais e Daniel, Rita e Ricardo;

Aos bons amigos que fiz em Paris durante o meu doutorado sanduíche: Élene, Maurine, Julie, Christian, Armele. Obrigado pela companhia, amizade e apoio durante todo o meu estágio;

Aos meus grandes amigos da vida toda do Rio Grande do Sul: Lauren, Gabi, Negrinha, Deba, Caiá, e aos meus queridos amigos do colégio Lú, Cati, Tetê, Caio, Krause;

À família Zárate-Bladés: Nelly, Luis, Alejandro, Fedor, Carol, Paolo e Sebastián que me receberam de forma tão calorosa e me apoiaram muito durante a realização deste trabalho;

À Terezinha e à Cristiane, secretárias da minha casa em Porto Alegre e à Sra. Divina, nossa secretária aqui em Ribeirão Preto e à Lupe, secretária da família Zárate-Bladés pelo cuidado e carinho com que cuidam da gente e das nossas coisas;

E finalmente às agências de fomento, que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho: FAPESP, CAPES e CNPq.

Muito obrigado!

*Nenhuma quantidade de experimentos é suficiente para provar que estou certo;
Mas um único experimento pode provar que estou errado.*

(Albert Einstein)

Resumo

A incidência de casos de melanoma tem aumentado significativamente nos últimos anos e esse aumento tem sido correlacionado a uma maior exposição da população à radiação ultravioleta. O contexto de aumento de incidência e ainda baixa eficácia terapêutica levaram a grandes esforços na busca de novos alvos para terapias mais efetivas. Embora classicamente relacionados com regulação da pressão arterial sistêmica, os sistemas renina-angiotensina e calicreínas-cininas vêm sendo cada vez mais estudados com relação à atuação local, tendo importante contribuição em patologias como epilepsias, obesidade e inflamação. Com relação ao câncer, alguns trabalhos relatam a diminuição de tamanho da massa tumoral, diminuição de angiogênese e redução de casos de metástase após tratamento com inibidores da ECA (enzima conversora de angiotensina; cininase II), bloqueadores do receptor AT₁ de angiotensina e do receptor B2 de cininas. Com relação ao receptor B1 existem poucos estudos, e estes estão concentrados principalmente em tumores de próstata e de mama. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação do sistema calicreínas-cininas, com ênfase no receptor B1, em diferentes etapas da progressão tumoral de melanoma. Para isto, utilizamos a linhagem de melanoma murino Tm5, a qual constatamos expressar constitutivamente o RNA mensageiro deste receptor, bem como da enzima carboxipeptidase M (uma das enzimas responsáveis pela formação dos agonistas deste receptor); e não expressar o RNA mensageiro do receptor B2 de cininas e nem dos receptores AT₁ e AT₂ do sistema renina-angiotensina. A funcionalidade do receptor foi avaliada por ensaios de sinalização celular, tais como mobilização de cálcio intracelular e fosforilação de ERK1/2. Nos ensaios *in vivo*, constatamos que o receptor B1 é expresso 4,5 vezes mais em estágios avançados do que em fases iniciais do tumor; e interessantemente o pré-tratamento de células Tm5 com o agonista do receptor B1 antes do implante levou a uma queda de mais de 50% na incidência do aparecimento de tumores. No grupo de animais que receberam as células pré-tratadas com o agonista observamos que 60% destes animais mantiveram-se livres de tumor por 150 dias após inoculação das células tumorais, enquanto que 100% dos animais que receberam as células não estimuladas morreram até 40 dias após a inoculação. Na busca pelos mecanismos que poderiam explicar tais fenômenos, realizamos ensaios *in vitro* de motilidade celular, que mostraram uma diminuição de 50% na habilidade das células tumorais em migrar após estímulo com o agonista do receptor B1. Desta forma, nossos dados sugerem que, ao contrário do receptor B2, o receptor B1 de cininas possui um papel protetor frente a progressão de melanomas.

Abstract

The incidence of melanoma has increased significantly in the last years and this augment have been correlated to the exposure to ultraviolet radiation. This context of increasing in case numbers associated to low therapeutic efficacy enhanced the efforts to the development of new targets and more effective therapies. Although classically related to blood pressure control and inflammation, the kallikrein-kinin system has also been described as an important component in diseases, such as epilepsy, obesity and in many pathologies which inflammation plays an important role. Related to cancer, it has been already described that ACE (angiotensin-I converting enzyme – kininase II) inhibitors, AT₁ and B2 blockers decrease tumor growth, angiogenesis and metastasis. Concerning the kinin B1 receptor, there are a few studies describing its role in tumorigenesis, however most of them are in hormone-related tumors like prostate and breast cancer and nothing so far have been described in melanoma. Therefore, the aim of this work was to investigate the participation of the kallikrein-kinin system, with emphasis in the B1 receptor, in different stages of melanoma progression. For this purpose, we used the murine melanoma Tm5 cell line, which we found expressing constitutively the mRNA of B1 receptor and also of carboxipeptidase M (one of the enzymes involved in the generation of B1 agonists), but not expressing kinin B2 receptor neither angiotensin AT₁ and AT₂ receptors mRNA. Intending to confirm whether B1 receptor was functionally expressed, we performed a calcium mobilization assay and also a western blotting to look at MAPK pathway phosphorylation and we confirmed the activation of both signaling pathways after B1 agonist stimulation. Regarding the melanoma progression *in vivo*, we observed that B1 receptor has its expression increased in 4.5 times in late stages of tumor progression compared to the initial stages, and, surprisingly, the treatment of Tm5 cells with B1 agonist before the inoculation of these cells in mice occasioned the diminution in 50% of the incidence of tumor development. Moreover, 60% of all mices inoculated with B1 agonist-treated cells stayed tumor-free for 150 days after the inoculation, in contrast to 100% of control mice which died until day 40. Looking for a mechanism of the effects of B1 stimulation against melanoma progression, we performed a cellular motility assay *in vitro* and we could observe a reduction of 50% in cellular migration of B1 agonist stimulated cells. Taken together, our data indicate that in contrast of B2 receptor, the activation of kinin B1 receptor has a protective role against melanoma progression.

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Esquema representativo dos sete eventos associados à tumorigênese	3
Figura 2	Esquema representativo dos processos envolvidos no processo de metástase	13
Figura 3	Esquema representativo das fases de crescimento do melanoma humano	20
Figura 4	Sequência de aminoácidos dos peptídeos ativos do SCC	24
Figura 5	Representação esquemática do sistema calicreínas-cininas, evidenciando os componentes deste sistema bem como funções clássicas mediadas pelos seus receptores	25
Figura 6	Representação dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do receptor B1	31
Figura 7	Esquema do funcionamento da técnica de MTT para detectar viabilidade celular	46
Figura 8	Representação esquemática da indução de melanoma em camundongos C57/BL6 a partir da injeção subcutânea de células tumorais no dorso destes animais	47
Figura 9	Representação esquemática do desenho experimental de pré-estímulo das células Tm5	48
Figura 10	Esquema das fotos retiradas sempre nos mesmos campos nos tempos: 0 e 24h após a lesão, para quantificação da migração celular	51
Figura 11	Análise da expressão do RNA mensageiro por RT-PCR dos receptores do sistema renina-angiotensina AT ₁ e AT ₂ , dos receptores do sistema calicreínas-cininas B1 e B2 e da enzima Carboxipeptidase M (CPM), nas linhagens celulares Melan-a e Tm5	58
Figura 12	Avaliação da mobilização de cálcio intracelular em células da linhagem Tm5 através da sonda FLUO3/AM após estímulo com o agonista do receptor B1 (DABK – 1 µM) e/ou antagonista (DLBK – 10 µM)	59
Figura 13	Avaliação temporal da fosforilação/ativação da quinase-ativada-por-mitógeno ERK após estímulo com o agonista do receptor B1 – DABK (1 µM)	60
Figura 14	Efeito da ativação do receptor B1 na migração celular da linhagem Tm5	62
Figura 15	Efeito da ativação do receptor B1 na migração celular da linhagem B16/F10	63
Figura 16	Análise da expressão de CD44 em células da linhagem Tm5 48 h após estímulo com DABK	64
Figura 17	Análise da atividade das metaloproteases dos tipos 2 e 9 por zimografia após tratamento das células Tm5 com DABK (1 µM) e/ou DLBK (10 µM) por 24 h	65
Figura 18	Curva de progressão tumoral dos camundongos C57/BL6 que receberam injeção subcutânea de células de melanoma da linhagem Tm5	66

Figura 19	Expressão relativa do receptor B1 nas fases latente (inicial) e exponencial (final) da progressão tumoral avaliados por PCR em tempo real	67
Figura 20	Avaliação da viabilidade celular dos grupos controles após estímulo ou não com DABK.	68
Figura 21	Análise da incidência de animais com tumores palpáveis após injeção de células estimuladas ou não com DABK (1 μ M)	69
Figura 22	Análise da progressão tumoral dos animais injetados com células estimuladas ou não com DABK (1 μ M)	70
Figura 23	Avaliação do peso dos tumores dos animais injetados com células Tm5 estimuladas ou não com DABK (1 μ M)	71
Figura 24	Curva de sobrevivência dos animais após receberem inóculo de células da linhagem Tm5 expostas a DABK (1 μ M) por 24 h ou não (controle)	71
Figura 25	Análise histológica dos tumores obtidos de animais que foram inoculados com células Tm5 controle ou tratadas com DABK (1 μ M) por 24 h	73
Figura 26	Análise quantitativa do número de vasos e células em mitose dos tumores dos animais que receberam células controle ou estimuladas com DABK (1 μ M) por 24 h	74
Figura 27	Análise quantitativa do número de células inflamatórias: macrófagos, neutrófilos e linfócitos na região peri-tumoral dos animais que receberam células controle ou estimuladas com DABK (1 μ M) por 24 h	75
Figura 28	Avaliação por ELISA da secreção de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) nas células da linhagem Tm5, após 24 h de estímulo com DABK (1 μ M) e/ou DLBK (10 μ M) <i>in vitro</i>	77
Figura 29	Avaliação por ELISA da quantidade de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) circulante no plasma de animais sem tumor, inoculados com células Tm5 não estimuladas ou inoculados com células tratadas com DABK (1 μ M) por 24 h	78
Figura 30	Análise da expressão de IFN γ em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h	79
Figura 31	Análise da expressão de VEGF em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h	80
Figura 32	Análise da expressão de E-caderina (A) e TGF β (B) em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h	81
Figura 33	Análise da incidência de animais com tumores palpáveis após injeção de células da linhagem B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h	82
Figura 34	Análise da progressão tumoral dos animais injetados com células da linhagem B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h	83
Figura 35	Avaliação do peso dos tumores dos animais injetados com células B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h	84

Figura 36	Curva de sobrevivência dos animais após receberem inóculo de células da linhagem B16/F10 expostas ou não a DABK (1 μ M) por 24 h	84
Figura 37	Avaliação por ELISA da quantidade de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) circulante no plasma de animais inoculados com células da linhagem B16/F10 tratadas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h	85
Figura 38	Análise do número de nódulos metastáticos encontrados no pulmão de animais que tiveram células da linhagem Tm5 tratadas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h	86
Figura 39	Modelo esquemático dos mecanismos envolvidos na perda de agressividade dos tumores formados a partir de células estimuladas com o agonista do receptor B1	100

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de anelamento (T_m) dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR semi-quantitativo para os genes analisados	41
Tabela 2	Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de anelamento (T_m) dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real para os genes analisados	44

Lista de Abreviaturas

7TM	Receptor com sete alças transmembranares
AM	Penta acetoxi-metil
ANOVA	Análise de variância
APS	Persulfato de amônia
ATCC	<i>American type culture collection</i>
AMP	Adenosina monofosfato
API	Proteína ativadora 1
AT₁	Receptor de angiotensina do tipo I
AT₂	Receptor de angiotensina do tipo II
B1	Receptor de cininas do tipo 1
B2	Receptor de cininas do tipo 2
BK	Bradicinina
BRAF	Homólogo B1 do oncogene viral do sarcoma V-raf murino
BSA	Albumina sérica bovina
CD44	Cluster de diferenciação 44
CDK4	Ciclina dependente de quinase 4
CDKN2A	Quinase dependente de ciclina 2A
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂	Dióxido de carbono
COX₂	Ciclooxygenase 2
CPB	Carboxi-peptidase B
CPD	Carboxi-peptidase D
CPM	Carboxi-peptidase M
CPN	Carboxi-peptidase N
CREB	Elemento ligador responsivo ao AMPcíclico
CT	<i>Cycle threshold</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
CXCL12	Ligante 12 do tipo CXC
CXCR4	Receptor 4 do tipo CXC
DABK	desArg ⁹ -bradicinina
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dimetilpirocarbonato
DLBK	desArg ⁹ [Leu ⁸]-bradicinina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima conversora de angiotensina-I
E-caderina	Caderina endotelial
ECL	Eletro-químico-luminescência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicotetraacético
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FACS	Separação celular por fluorescência ativada
Fmoc	Fluorenilmetoxilcarbonil
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito macrófago
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroetil)-1-piperazinil]-etanosulfônico

HIF	Fatores induzidos por hipóxia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IFNγ	Interferon gamma
IGF	Fator de crescimento de insulina
IGFBP	Proteína ligadora do fator de crescimento de insulina
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IP3	Inositol-3-fosfato
KD	Calidina
KLK	Calicreína
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
Ma	Melan-a
MAPK	Quinase-ativada-por-mitógeno
MDSC	Células supressoras de origem mielóide
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
MMP2	Metaloprotease 2
MMP9	Metaloprotease 9
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
N-caderina	Caderina neural
NEP	Endopeptidase neutra
NFκB	Fator nuclear ativador da cadeia leve kappa de células B ativadas (<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NK	<i>Natural killers</i>
N-terminal	Amino-terminal
PAGE	Eletroforese em gel de poli-acrilamida
PAI-I	Inibidor do ativador de plasminogênio do tipo I
PAR	Receptor ativado por proteases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE-Cy5	Ficoeritrina-Cy5
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PSA	Antígeno específico de próstata
PTEN	Proteína fosfatase e homóloga a tensina
R-715	Antagonista não peptídico do receptor B1
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
SCC	Sistema calicreínas-cininas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – desnaturante
SFB	Soro Fetal Bovino

SRA	Sistema renina angiotensina
TBS	Tris tamponado com salina
TCR	Receptor de células T
TEM	Trasformação epitelial-mesenquimal
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamine
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
Th (1,2 e 17)	Linfócitos T auxiliares do tipo 1, 2 ou 17
TLR	Receptor tipo Toll
TMB	Tetrametilbenzidine
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
TTBS	Tris tamponado com salina + Tween
uPA	Plasminogênio-tipo-uroquinase
uPAR	Receptor de plasminogênio-tipo-uroquinase
UV	Ultra-violeta
VE-caderina	Caderina vascular endotelial
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR	Receptor do fator de crescimento vascular endotelial

Sumario

	Página
1. Introdução	1
1.1. Biologia dos tumores	2
1.1.1. Câncer: uma abordagem ecológica e evolutiva	4
1.1.2. O microambiente tumoral	5
1.1.3. A luta por oxigênio e nutrientes	6
1.1.4. Células do sistema imunológico na tumorigênese: mocinhas ou vilãs?	8
1.1.5. Desbravando novos nichos: o processo de metástase	11
1.1.5.1. Migração e invasão	14
1.1.5.2. Entrada no vaso e a passagem pela circulação	15
1.1.5.3. A decisão pelo órgão alvo	16
1.1.5.4. Migração trans-endotelial	18
1.1.5.5. Colonização do novo nicho – modificações no microambiente	18
1.2. Melanoma	19
1.3. O sistema calicreínas-cininas	24
1.3.1. Um breve histórico do sistema	24
1.3.2. Formação da bradiginina e da calidina	26
1.3.3. Formação da desArg ⁹ -BK e desArg ¹⁰ -KD por cininases do tipo I	27
1.3.4. Degradação da bradiginina e calidina por cininases do tipo II	28
1.3.5. Os receptores do SCC	29
1.4. O sistema calicreínas-cininas e o câncer	32
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. Materiais e Métodos	37
3.1. Materiais	38
3.2. Métodos	38
3.2.1. Cultura de células	38
3.2.1.1. Linhagem Melan-a	38

3.2.1.2.	Linhagem Tm5	39
3.2.1.3.	Linhagem B16/F10	39
3.2.3.	Análise da expressão de RNA mensageiro por PCR	39
3.2.3.1.	Extração de RNA por Trizol	39
3.2.3.2.	Tratamento das amostras com DNase	40
3.2.3.3.	Transcrição reversa	41
3.2.3.4.	Desenho e padronização dos <i>primers</i> específicos para PCR	41
3.2.3.5.	PCR semi-quantitativo	43
3.2.3.6.	PCR em tempo real	43
3.2.4.	Ensaio de mobilização de cálcio intracelular	44
3.2.5.	<i>Western Blotting</i>	45
3.2.6.	Ensaio de viabilidade celular – MTT	46
3.2.7.	Modelo de melanoma <i>in vivo</i>	47
3.2.8.	Delineamento experimental de pré-estímulo das células tumorais <i>in vitro</i> e subsequente inóculo das células <i>in vivo</i>	48
3.2.9.	Histologia	48
3.2.10.	Ensaio de colonização pulmonar por injeção de células tumorais na veia caudal de camundogos	50
3.2.11.	Ensaio de migração celular	51
3.2.12.	Ensaio de ELISA para detecção de citocinas	52
3.2.13.	Ensaio de zimografia para avaliar a atividade das gelatinases MMP2 e 9	52
3.2.14.	Análise da expressão de CD44 por citometria de fluxo	54
4.	Resultados	56
4.1.	Caracterização da linhagem Tm5 quanto à expressão de componentes dos sistemas caliceínas-cininas e renina-angiotensina	57
4.2.	Análise da presença e funcionalidade do receptor B1 na linhagem de melanoma Tm5	59
4.3.	Avaliação do papel exercido pelo receptor B1 na migração celular	61
4.4.	Avaliação da expressão de CD44 após estímulo com o agonista do receptor B1 em células da linhagem Tm5	64

4.5.	Avaliação da atividade das gelatinases MMP 2 e 9 secretadas pelas células Tm5 estimuladas com o agonista do receptor B1	65
4.6.	Padronização do modelo <i>in vivo</i>	66
4.7.	Avaliação da expressão do receptor B1 ao longo da progressão tumoral	67
4.8	Efeito do tratamento das células tumorais da linhagem Tm5 com o agonista do receptor B1 sobre: a incidência de tumores quando inoculadas em camundongos, sobre o tamanho desses tumores e sobre a sobrevida dos animais	68
4.8.1.	Avaliação da viabilidade celular após estímulo com o agonista do receptor B1	68
4.8.2.	Avaliação da incidência de tumores, do tamanho desses tumores e da sobrevida dos animais que foram inoculados com células de melanoma Tm5 pré-tratadas por 24h com o agonista do receptor B1	69
4.8.3.	Análise histológica das amostras de tumor dos animais injetados com células controle ou tratadas com o agonista do receptor B1	72
4.9.	Avaliação da secreção de TNF α , IL-6 e IL-10 após estímulo das células da linhagem Tm5 com o agonista do receptor B1 <i>in vitro</i>	76
4.10.	Avaliação dos níveis séricos de TNF α , IL-6 e IL-10 dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1	78
4.11.	Avaliação da expressão de IFN γ nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1	79
4.12.	Avaliação da expressão de VEGF nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1	80
4.13.	Avaliação da expressão de E-caderina e TGF β nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1	80

4.14.	Avaliação da incidência de tumores, do tamanho desses tumores e da sobrevivência dos animais que foram inoculados com células de melanoma da linhagem B16/F10 pré-tratadas por 24h com o agonista do receptor B1	82
4.15.	Avaliação dos níveis séricos de TNF α , IL-6 e IL-10 dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem B16/F10 tratadas ou não com o agonista do receptor B1	85
4.16.	Avaliação da habilidade das células da linhagem Tm5 estimuladas ou não com o agonista do receptor B1 em estabelecer metástase pulmonar	86
5.	Discussão	87
6.	Conclusões	104
7.	Referências Bibliográficas	106
8.	Anexo	129
8.1.	Artigo de revisão publicado: <i>Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies</i>	

1. Introdução

1.1. Biologia dos tumores

O câncer é, atualmente, uma das maiores causas de morte em humanos, sendo responsável por 13% de todas as mortes do ano de 2007 segundo a Organização Mundial de Saúde e, acredita-se que este número duplique até 2030. O motivo deste grande aumento na incidência ainda não é completamente compreendido, mas acredita-se que esteja relacionado com o estilo de vida da população (Colditz et al., 2006), o aumento na expectativa de vida, bem como ao desenvolvimento de técnicas que permitem agora um diagnóstico mais preciso, o que não acontecia anteriormente. Embora as neoplasias sejam muito mais frequentes em humanos do que em outros animais, elas não são exclusividade da nossa espécie. Existem registros de desenvolvimento de tumores em muitos animais, dentre eles primatas (que apresentam uma taxa de incidência de 1-2%), mamíferos marinhos como as belugas, marsupiais como o demônio da Tasmânia e invertebrados como moluscos (revisado por Greaves, 2007). De fato, alguns dos primeiros registros de neoplasias também não são em humanos, datam do período jurássico e foram descobertos através do estudo de fósseis de alguns dinossauros (Rothschild et al., 1998; Rothschild et al., 1999). Em um trabalho recente McAloose & Newton (2009) demonstraram que o atual aumento na incidência de tumores não ocorre apenas entre indivíduos da espécie humana, mas também em animais selvagens, sugerindo que o impacto da ação antrópica e os problemas ambientais a ela associados também contribuem de forma importante para o aumento na incidência de neoplasias.

O desenvolvimento tumoral tem como uma das principais características elevada taxa de proliferação celular. Esta característica está diretamente relacionada ao ilimitado poder replicativo das células neoplásicas, à auto-suficiência na produção de fatores de crescimento e à insensibilidade a estímulos que inibem a proliferação e ativam apoptose (Hanahan & Weinberg, 2000), sendo todas conseqüências de modificações ocorridas durante a transformação maligna. As mudanças ocorridas em uma célula normal que dá origem a uma célula neoplásica, frequentemente envolvem a superativação de rotas de crescimento/divisão, o aumento na expressão de oncogenes e a deleção/inativação de genes supressores de tumores (Aaronson, 1991). Além disto, as neoplasias também têm a habilidade de induzir a formação de novos vasos, para que haja aporte de nutrientes e oxigênio a toda a massa tumoral em expansão, bem como de invadir outros tecidos, alcançar a corrente sanguínea e fazer metástase em outros órgãos (figura 1).

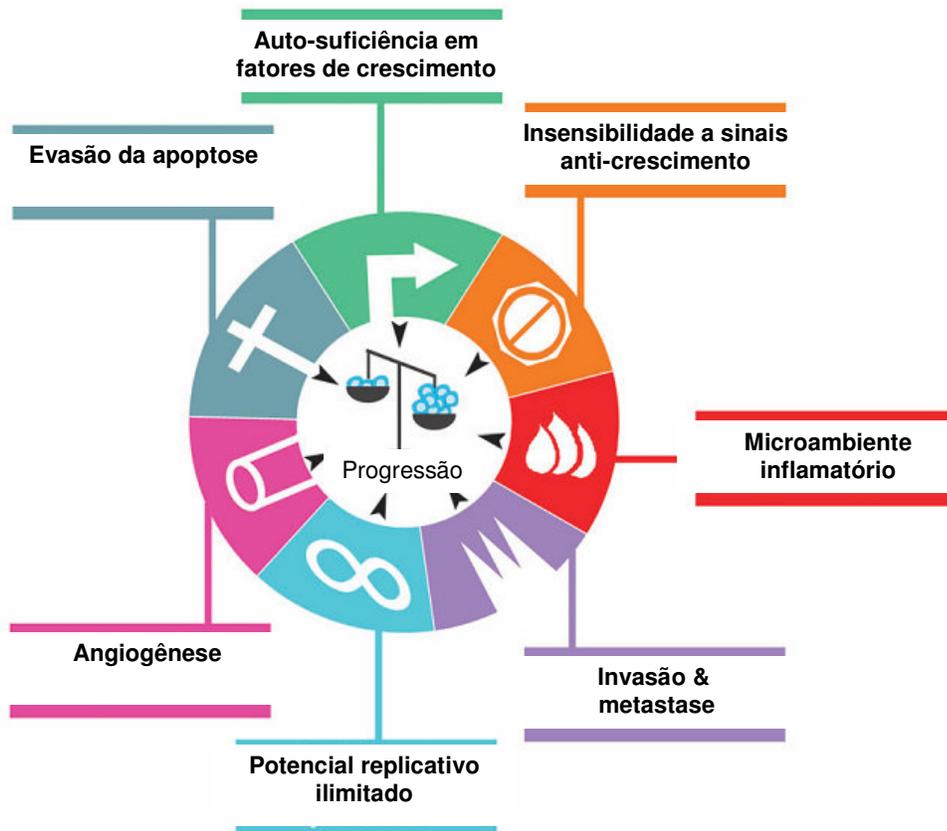


Figura 1: Esquema representativo dos sete eventos associados à tumorigênese (Adaptado de Colotta et al., 2009).

Além disto, alguns trabalhos mostram que o desenvolvimento tumoral inclui, não somente múltiplas alterações genéticas e epigenéticas nas células tumorais, mas também alterações no tecido ao seu redor. Estas modificações periféricas ao tumor possuem importantes conseqüências na indução, seleção e expansão das células neoplásicas (Ronnov-Jessen et al., 1996; Coussens et al., 2000). O estabelecimento de um microambiente inflamatório na região da neoplasia é, atualmente, considerado como uma das características associada ao desenvolvimento tumoral (Colotta et al., 2009), pois cria condições que possibilitem a sobrevivência e o crescimento das células malignas, angiogênese, aumento da permeabilidade vascular e evasão da resposta imune (Park et al., 2000; Mantovani et al., 2008; Mantovani, 2009).

1.1.1. Câncer: uma abordagem ecológica e evolutiva

Como veremos em maiores detalhes posteriormente, a massa tumoral é composta por inúmeros tipos celulares diferentes, bem como por diversas populações de células neoplásicas que convivem em um equilíbrio dinâmico, no qual algumas populações expandem e outras retraem respondendo as condições que encontram durante a progressão do tumor (Merlo et al., 2006). A grande instabilidade genômica característica das células tumorais é uma das responsáveis pela co-existência de inúmeras populações diferentes de células neoplásicas e é causada tanto por problemas na divisão celular (Bakhoun et la., 2009) quanto por modificações epigenéticas anormais (Campos et al., 2007).

Todas estas modificações fazem com que as divisões celulares não ocorram necessariamente de forma semi-conservativa, originando células filhas diferente e, conseqüentemente, aumentando a heterogeneidade entre as células tumorais. Diferentes populações convivendo em um equilíbrio dinâmico, lutando para obter alimento, buscando espaço para crescer e mostrando-se com um perfil mais ou menos vantajoso dependendo das pressões do meio onde se encontram é uma descrição bastante comum em se tratando de estudos evolutivos e/ou ecológicos, mas que se adequa perfeitamente ao contexto de um tumor.

Tendo em vista esta similaridade, alguns autores defendem que uma abordagem baseada em conceitos de ecologia e evolução permitiria uma melhor compreensão de como a progressão dos tumores ocorre e, dessa forma, auxiliaria no desenvolvimento de exames diagnósticos, estabelecimento de prognósticos, assim como abordagens terapêuticas mais efetivas.

De fato, Merlo e colaboradores (2006) revisaram a aplicação de conceitos e teorias ecológicas e de evolução na progressão tumoral, evidenciando inúmeras “interações ecológicas” que podemos observar no âmbito de um tumor. Uma das mais evidentes é, sem dúvidas, o parasitismo que é uma relação ecológica desarmônica onde o parasita (tumor) retira seus meios de vida do hospedeiro (paciente) prejudicando-o. A literatura especializada em câncer utiliza amplamente a palavra hospedeiro para se referir ao paciente com câncer. Além disto, observamos nitidamente uma relação de competição entre as diferentes populações de células tumorais em um ambiente onde espaço, aporte nutricional e de oxigênio são limitados. Ao mesmo tempo, os autores citam certo grau de mutualismo entre as diferentes populações de células no intuito de modificar o microambiente ao seu redor, estimular a formação de novos vasos bem como escapar da predação exercida por células do sistema imunológico do hospedeiro.

Neste contexto, fica claro que evolutivamente falando, aquelas populações que conseguirem vencer a competição por nutrientes, escaparem da predação do sistema imunológico e tiverem um fenótipo mais favorável a sua progressão terão claramente vantagens e entrarão em expansão. Para aquelas populações menos adaptadas a estas condições, resta a possibilidade de se manterem no ambiente de forma minoritária (isso se o seu fenótipo não for tão comprometedor a ponto de extinguí-las) ou se lançarem na tentativa de colonizar outras regiões e tentar explorar novos nichos, em um processo denominado metástase (Bernards & Weinberg, 2002; Merlo et al., 2006).

Por viverem em um equilíbrio dinâmico, o tamanho das populações é proporcional a aptidão que os indivíduos (células) possuem de se adaptarem às condições do meio onde se encontram e, dessa forma, semelhantemente ao que acontece na natureza, o aparecimento de uma nova pressão seletiva pode modificar drasticamente este equilíbrio. No caso de neoplasias, um exemplo disto é a exposição do hospedeiro a tratamentos quimioterápicos (Kobayashi et al., 2005; Gorre et al., 2001). Muitos dos fármacos utilizados no tratamento de pacientes com tumores interferem diretamente no ciclo celular, por exemplo; provocando a morte células com alto potencial proliferativo, mas negligenciando algumas populações, como as células tronco tumorais, cujo ritmo de proliferação é mais lento (Pardal et al., 2004). Neste caso, esta população que seria inicialmente minoritária, consegue permanecer viável e, apesar de pequena, é suficiente para a sobrevivência da neoplasia, uma vez que a presença de apenas algumas células tumorais viáveis permite que novas mutações ocorram e assim, novas populações se formem e se expandam, até que o tumor se re-estabeleça. Existe ainda outra teoria que defende que algumas populações celulares, dentre elas as células tronco tumorais, possuiriam mutações/modificações que lhes confeririam resistência e este tipo de pressão seletiva. Sendo assim, as células tronco tumorais parecem exercer um importante papel na resistência das células neoplásicas a tratamentos anti-tumor, não sendo resistentes apenas por seu menor ritmo proliferativo, mas também por possuírem alguns transportadores que lhes confere resistência a diferentes tipos de drogas (Donnenberg & Donnenberg, 2005) e por conseguirem ativar sistemas de reparo de DNA após exposição a radiações (Bao et al., 2006).

1.1.2. O microambiente tumoral

Embora a heterogeneidade entre as células tumorais seja fundamental no desenvolvimento e sobrevivência, o contexto dentro do qual a neoplasia está inserida também parece influenciar diretamente na sua progressão. De fato, muitos trabalhos evidenciam a importância da interface tumor-hospedeiro onde o hospedeiro participa diretamente na

indução, seleção e expansão das células neoplásicas. A contribuição do hospedeiro inclui a ativação tanto de elementos celulares quanto de matriz extra-celular e parece ser fundamental também no processo de metástase através da secreção de fatores que estimulam a transformação epitelial-mesenquimal (TEM) e a invasão. Especificamente no caso da invasão, já foi mostrado que a transição entre um carcinoma normal e um invasivo é precedida, ou pelo menos concomitante, a ativação local do estroma do hospedeiro (Tomakidi et al., 1999); e que grande parte das enzimas secretadas durante o processo de invasão tem origem de células do próprio hospedeiro que parecem trabalhar para o tumor.

Atualmente acredita-se que o microambiente tumoral possa exercer papel inibitório mesmo sobre as células tumorais mais agressivas; entretanto, durante a sua progressão, o tumor é capaz de vencer estes sinais inibitórios e passar a explorar este microambiente em seu favor (Joyce & Pollard, 2009). Em um trabalho clássico em 1975, Mintz & Illmensee demonstraram experimentalmente, pela primeira vez, a importância do microambiente tumoral no desenvolvimento tumores. Os autores inseriram células de teratocarcinomas em blastocistos e geraram uma prole de quimeras que se desenvolveram normalmente, sem interferência ou manifestação da neoplasia, sugerindo que a retirada das células tumorais do seu microambiente e introdução em um novo microambiente induz a perda da malignidade. Neste mesmo sentido, dois trabalhos da década de 90 mostram que componentes importantes da interface tumor-hospedeiro como fibroblastos e o próprio mesênquima do hospedeiro modulam diretamente a progressão tumoral (Hayashi et al., 1991; Olumi et al., 1999).

1.1.3. A luta por oxigênio e nutrientes

Com o crescimento de uma grande massa tumoral, é necessário garantir o aporte de nutrientes e oxigênio para todas estas células. Por isto, os tumores de forma geral, secretam fatores que estimulam a proliferação de células endoteliais e assim a formação de novos vasos. A primeira descrição de que os tumores sólidos poderiam estimular neovascularização para se nutrir foi feita por Folkman em 1971, mas permaneceu por 10 anos sem muita credibilidade. Neste período não se conhecia os mecanismos envolvidos na neovascularização, mas Folkman publicou a hipótese de que o crescimento tumoral está vinculado ao que se chamava de angiogênese (do grego “*aggeion*” = vaso e “*genesis*” = formação/origem). Em outras palavras, um tumor não poderia atingir tamanho superior a 1 ou 2 mm³ sem um contínuo recrutamento de novos capilares sanguíneos e que isso deveria acontecer através da secreção de alguns fatores difusíveis (revisado por Folkman, 2007a).

Atualmente, a formação de novos vasos é vista como oriunda de dois processos: da neovasclogênese, que ocorre pela formação *de novo* de células endoteliais (como na embriogênese); ou da angiogênese, que acontece pelo crescimento de novos vasos a partir de vasos pré-existente. O processo de angiogênese é o mais comum em tumores sólidos e a formação de novos vasos é finamente regulada pelo balanço entre fatores que estimulam ou inibem a neovascularização. Dentre os fatores que estimulam, a família de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), em especial por causa de uma subfamília, conhecida como fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), desempenha um importante papel. Esta subfamília atualmente é composta por 5 VEGFs chamados de VEGF A, B, C, D e E, e possuem diferente afinidade pelos 3 tipos de receptores para VEGF conhecidos (VEGFR1, 2 e 3). Enquanto que os VEGFs A e B estão mais relacionados com a formação de vasos sanguíneos, VEGF C e D estimulam a formação de vasos linfáticos, sendo que a ativação do VEGFR2 pelo ligante VEGF A é descrita como principal responsável pela proliferação e pela migração de células endoteliais em tumores. Além disto, a ativação do VEGFR2 também estimula a criação do lúmen dos vasos e a formação de fenestras que juntamente com a ativação de vias que promovem a liberação de óxido nítrico (um potente vasodilatador), aumentam a permeabilidade vascular (Karamysheva, 2008).

Por maior que seja a organização da massa tumoral e sua tentativa de manter alto o ritmo de formação de novos vasos, nem sempre é possível suprir a demanda, como acontece em tumores muito agressivos cujo ritmo proliferativo é muito grande. Estes tumores frequentemente apresentam zonas de necrose, especialmente nas partes mais centrais, causadas por um aporte de oxigênio insuficiente e em alguns casos até mesmo inexistente. No entanto, o artigo de Bottaro & Liotta (2003) sugere que o fato de estarem sem ar, não significa que estas tumorais estejam sem ação, ou seja, que estas zonas de necrose teriam papel em modular positivamente a agressividade dos tumores. De fato, trabalhos clínicos mostram que a presença de zonas necróticas em tumores sólidos está associada a um pior prognóstico dos pacientes (Hockel & Vaupel, 2001). Neste mesmo sentido, alguns trabalhos mostram que a falta de oxigenação promove a expressão de alguns fatores, conhecidos como HIFs (fatores induzidos pela hipóxia), na tentativa de sobreviver a este estresse. Os HIFs modificam o metabolismo das células, e também estão envolvidos na indução e secreção de fatores pró-angiogênicos, uma tentativa de re-estabelecer o aporte sanguíneo naquele tecido (Bottaro & Liotta, 2003). Tentando compreender os mecanismos que associam a hipóxia ao aumento da agressividade dos tumores, Koong e colaboradores (2000) utilizaram a estratégia de micro-arranjos para identificar genes relacionados com o fenótipo de hipóxia dos tumores, mas foi somente em 2003 que o primeiro mecanismo correlacionando aumento da

agressividade de tumores pela hipóxia foi elucidado. Pennacchietti e colaboradores (2003) mostraram que a hipóxia induz HIFs e estes promovem um aumento na expressão de *c-met*, uma proteína que normalmente está expressa em baixos níveis em regiões com normal aporte de nutrientes e oxigênio, e que está envolvida em modular positivamente motilidade celular, invasão, produção/secreção de proteases e proliferação celular, todos eventos diretamente associados com metástase, como veremos nos próximos itens.

Estas descobertas auxiliam a elucidar os motivos pelos quais, os inibidores de angiogênese, inicialmente tão promissores, apresentaram um inesperado insucesso quando foram testados na clínica (Hurwitz et al., 2006; Mayer et al., 2007; Kerbel, 2008). Além disto, trabalhos pré-clínicos utilizando terapias contra VEGF (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009), bem como a deleção desse gene em células mielóides (Stockmann et al., 2008) inesperadamente promoveram um agravamento da progressão tumoral. Neste mesmo sentido, Greenberg e colaboradores, também em 2008, publicaram um trabalho mostrando que o VEGF tem função de regulador negativo na maturação dos vasos sanguíneos neoformados, colocando oficialmente em xeque o papel deste fator de crescimento na progressão tumoral (Vecchiarelli-Federico et al., 2010)

1.1.4. Células do sistema imunológico na tumorigênese: mocinhas ou vilãs?

A presença de células do sistema imunológico (leucócitos) em tecidos neoplásicos foi observada em 1863 por Rudolf Virchow, estabelecendo, pela primeira vez, uma conexão entre inflamação e câncer (para revisão ver Balkwill & Mantovani, 2001). Atualmente já se conhece inúmeros tipos celulares de origem mielóide residentes nos tumores e existem muitos grupos investigando o papel que cada um deles desempenha durante a tumorigênese.

Quando se fala sobre imunologia dos tumores alguns termos, como: vigilância imunológica (*immunosurveillance*), imunoedição e escape imunológico são bastante utilizados. Na realidade compreender os mecanismos pelos quais o sistema imunológico combate (em muitos casos impedindo e em outros retardando) a progressão tumoral traz a tona outro desafio do sistema imune: ser capaz de reconhecer entre o próprio e o próprio transformado e não apenas entre o próprio e não próprio (Dunn et al., 2006).

A idéia de que o sistema imunológico protege o hospedeiro do desenvolvimento de tumores primários existe há mais de 100 anos, quando Ehrlich propôs pela primeira vez a utilização de imunoterapia para o tratamento de neoplasias. Praticamente cinco décadas depois, Burnet e Thomas (1957) estabeleceram o conceito de imuno-vigilância, que descreve o sistema imunológico como tendo ação protetora anti-tumores. O avanço nas ferramentas

experimentais e a possibilidade de se obter animais que possuam defeito em células da imunidade inata e/ou adaptativa permitiram comprovar experimentalmente que interferências deste tipo promovem um aumento no desenvolvimento de alguns tipos de tumores primários (como sarcomas), tanto espontâneos quanto induzidos por carcinógenos em modelos animais (Ostrand-Rosenberg, 2008).

No entanto, as novas abordagens experimentais possibilitaram também outras descobertas inesperadas, que trouxeram à tona um novo papel do sistema imune e agora não mais de proteção do hospedeiro. Muitos trabalhos começaram a descrever situações em que as células do sistema imunológico residentes no tumor pareciam trabalhar em prol da progressão deste tumor e não mais protegendo o hospedeiro (Joyce & Pollard, 2009). A descoberta desta função antagônica a tradicionalmente esperada, originou a terminologia imuno-edição, que engloba os dois papéis do sistema imunológico na tumorigenese (Dunn et al., 2006).

A imuno-edição está dividida em três fases: a eliminação, o equilíbrio e o escape. A fase de eliminação é exatamente a até então chamada imuno-vigilância, na qual o sistema imune combate as células tumorais e protege o hospedeiro utilizando tanto resposta imune inata quanto adaptativa. Quando a fase de eliminação é bem sucedida, ou seja, a eliminação das células tumorais é completa, não existe progressão para as demais fases. Quando isto não acontece, o tumor passa para um próximo estágio, que consiste da formação de um equilíbrio dinâmico entre o sistema imunológico e os clones que sobreviveram ao seu ataque. Este equilíbrio é mediado pela resposta imune adaptativa do hospedeiro e controla a progressão do tumor, mantendo a neoplasia oculta (Koebel et al. 2007). Durante este período, a pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico acaba esculpindo uma nova massa tumoral, agora composta por clones menos imunogênicos. Esta é, de forma geral, a fase mais longa da imuno-edição, podendo durar muitos anos em humanos, e ela somente acaba quando finalmente o tumor consegue se desvencilhar do controle do sistema imune e crescer utilizando próprio sistema imunológico a seu favor (Dunn et al., 2004). A fase de escape acontece quando os clones menos imunogênicos que sobreviveram à fase de eliminação e que eram controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro foram de tal forma esculpidos/modificados que conseguem driblar tanto o braço inato quanto adaptativo da resposta imune do hospedeiro, e crescer. É nesta fase que normalmente diagnosticamos a maioria das neoplasias (Dunn et al., 2004).

Um caso clínico foi relatado por MacKie e colaboradores (2003) descrevendo que dois pacientes que haviam recebido o rim de um mesmo doador, faleceram 1-2 anos após o transplante com melanoma disseminado. O doador dos órgãos teve melanoma 16 anos antes

do momento da doação, mas foi considerado livre-de-tumor. No entanto, o que provavelmente aconteceu foi que este indivíduo não eliminou completamente a neoplasia, mas sim estabeleceu um equilíbrio no qual o seu sistema imunológico conseguia conter o crescimento e progressão deste tumor. Contudo, este equilíbrio não foi mantido no paciente receptor, muito possivelmente por causa dos medicamentos imunossupressores administrados em casos de transplantes e, assim, o tumor progrediu para a fase de escape.

Muitos trabalhos têm focado nos mecanismos pelos quais os tumores conseguem evadir a resposta imune, embora, muito permanece não elucidado. Sabe-se que em algumas situações os tumores impedem direta ou indiretamente a resposta imune anti-tumoral tanto via humoral (secreção de algumas citocinas imunossupressoras como TGF β e IL-10) quanto via celular (com células que desempenham atividade supressora, como é o caso de algumas células T).

Além disto, os mecanismos de escape podem envolver modificações ao nível do tumor, como a perda da expressão de antígenos, diminuição na expressão de MHC de classe I, bem como desregulação do processamento, apresentação antigênica ou do reconhecimento do antígeno pelo linfócito T CD8⁺ (Nagaraj et al., 2007), insensibilidade ao IFN γ , além de mecanismos para escapar da destruição pelo sistema imunológico, como defeito nos receptores de morte, expressão de sinais anti-apoptóticos ou mesmo super-ativação de algumas vias que conferem resistência a apoptose (Catlett-Falcone et al., 1999; Rajasagi et al., 2009).

Da mesma forma, acredita-se que para que o escape ocorra é necessário uma grande modificação do ambiente pelo tumor, o que inclui a formação de um microambiente rico em fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e proteases. A presença destes elementos está muito relacionada, ou pelo menos é bastante comum, em condições inflamatórias. De fato, o processo inflamatório é visto atualmente como um cofator no desenvolvimento tumoral, sendo de aproximadamente 15% os tumores causados por agentes infecciosos que provocam processos inflamatórios (Parkin et al., 1999; Allavena et al., 2008). Além de fator de risco, a inflamação também é utilizada no prognóstico e diagnóstico de muitos tumores (Smith & Missailidis, 2004).

Embora alguns leucócitos realmente exerçam atividade antitumoral, como por exemplo, linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) e células NK, outras células parecem contribuir diretamente para a progressão tumoral, como por exemplo mastócitos, linfócitos B e células supressoras de origem mielóide (MDSC) (de Visser et al., 2005 e Mantovani et al., 2008). Além disto, os linfócitos T CD4⁺ parecem assumir duas funções antagônicas, dependendo do fenótipo da resposta envolvida. Atualmente acredita-se que em uma resposta Th1, os

linfócitos T CD4⁺ participam da eliminação do tumor, enquanto que em respostas Th2, Th17 ou mesmo em respostas mediadas por células T regulatórias (que também são linfócitos T CD4⁺) parecem exercer um papel pró-tumoral (Ostrand-Rosenberg, 2008). Neste mesmo sentido, o trabalho de DeNardo e colaboradores (2009) demonstrou que linfócitos T CD4⁺ são fundamentais para a formação de metástase pulmonar de carcinoma mamário e que este efeito é mediado através do aumento das propriedades pró-tumorais de macrófagos, sugerindo uma importante participação de células do sistema imunológico não somente no estabelecimento do tumor primário, mas também na progressão do tumor.

O papel dos macrófagos na tumorigênese também vem sendo muito estudado e o que se acredita é que, de forma semelhante aos linfócitos T CD4⁺, o perfil da resposta imune e da ativação destas células é que determina se eles terão um papel pró ou anti-tumoral. Uma das teorias atualmente aceitas é que os macrófagos podem ser ativados de duas formas: clássica (M1) ou alternativa (M2). Esta nomenclatura se relaciona diretamente às células T auxiliares que regulam a ativação destes macrófagos. Os macrófagos classicamente ativados são regulados por citocinas de resposta Th1, como IFN γ , TNF α , GM-CSF, que induzem o aumento da resposta citotóxica destes macrófagos. Por outro lado, os macrófagos alternativamente ativados, são aqueles expostos à citocinas de padrão de resposta Th2, como IL-4, IL-13 ou IL-10 e que passam a atuar de forma imunossupressora, pro-angiogênica e favorecendo o remodelamento tecidual. Estes macrófagos alterativamente ativados são comumente encontrados em tumores sólidos (Mantovani et al., 2009 e Leek et al., 2000).

A presença de infiltrado inflamatório na massa tumoral não define um prognóstico específico, embora algumas correlações já foram estabelecidas como no caso de tumores colo-retais e de cabeça e pescoço, onde a presença de células T CD8⁺ e células dendríticas maduras estão relacionadas com um bom prognóstico. O contrário acontece na grande maioria dos tumores (80%) com relação à presença de macrófagos, que está relacionada diretamente com aumento da agressividade do tumor e metástase, obviamente conferindo um pior prognóstico (Joyce & Pollard, 2009).

1.1.5. Desbravando novos nichos: o processo de metástase

O processo de metástase é o espalhamento das células neoplásicas do tumor primário, que passam a colonizar outros órgãos do hospedeiro e, por isso, é responsável por grande parte das mortes causadas por tumores (Fidler, 2002). A alta mortalidade de pacientes com tumores metastáticos (cerca de 90%) está diretamente relacionada à resistência das células tumorais metastáticas às terapias antitumorais convencionais, sendo que isso parece ser uma

conseqüência direta da grande heterogeneidade de fenótipos das células neoplásicas nestes tumores (Gupta & Massagué, 2007).

A busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de metástase tem mais de 100 anos e, embora muito ainda permaneça por ser elucidado, começamos a compreender alguns dos eventos que estão envolvidos no processo de metástase. Uma das teorias mais aceitas sobre o processo de metástase foi criada em 1889 por Paget e se chama “semente e solo” (em inglês: *seed and soil*). Nela, Paget hipotetiza que para a metástase acontecer, depende tanto das células tumorais (semente), quanto do microambiente existente no órgão secundário que estas células vão tentar colonizar (solo). No entanto, quarenta anos depois a teoria de Paget foi desafiada por Ewing, que defendia que a metástase era determinada pelos vasos que drenavam o tumor primário e este conceito perdurou por muitos anos, até que Fidler demonstrou que apesar das células tumorais chegarem aos vasos de todos os órgãos, existem alguns onde ocorrem metástase e outros não (Fidler & Kripke, 1977; Hart & Fidler, 1980; Fidler, 2002). Esta descoberta trouxe à tona novamente a teoria de semente e solo de Paget.

Atualmente, sabemos que é necessário para que as células tumorais estabeleçam metástase que ao menos algumas populações pioneiras consigam migrar, invadir a matriz extracelular e cair na circulação (seja ela sanguínea ou linfática). Uma vez na circulação, estas células tumorais precisam evadir a resposta imune do hospedeiro e se manter circulantes até a chegada ao órgão alvo. Quando chegam ao órgão alvo, elas precisam reconhecê-lo, serem margeadas e, de forma semelhante ao que acontece com os leucócitos, aderirem a parede do vaso, fazerem o rolamento até pararem, e passarem através das células do endotélio para chegar ao seu destino final (figura 2). Embora a chegada ao órgão alvo pareça em um primeiro momento o final de uma longa jornada, ela é apenas o começo, pois estas células pioneiras precisam efetivamente colonizar aquele novo nicho, modificando o seu microambiente para que possam proliferar e se desenvolver e, desta forma, se estabelecerem efetivamente como uma colônia secundária.

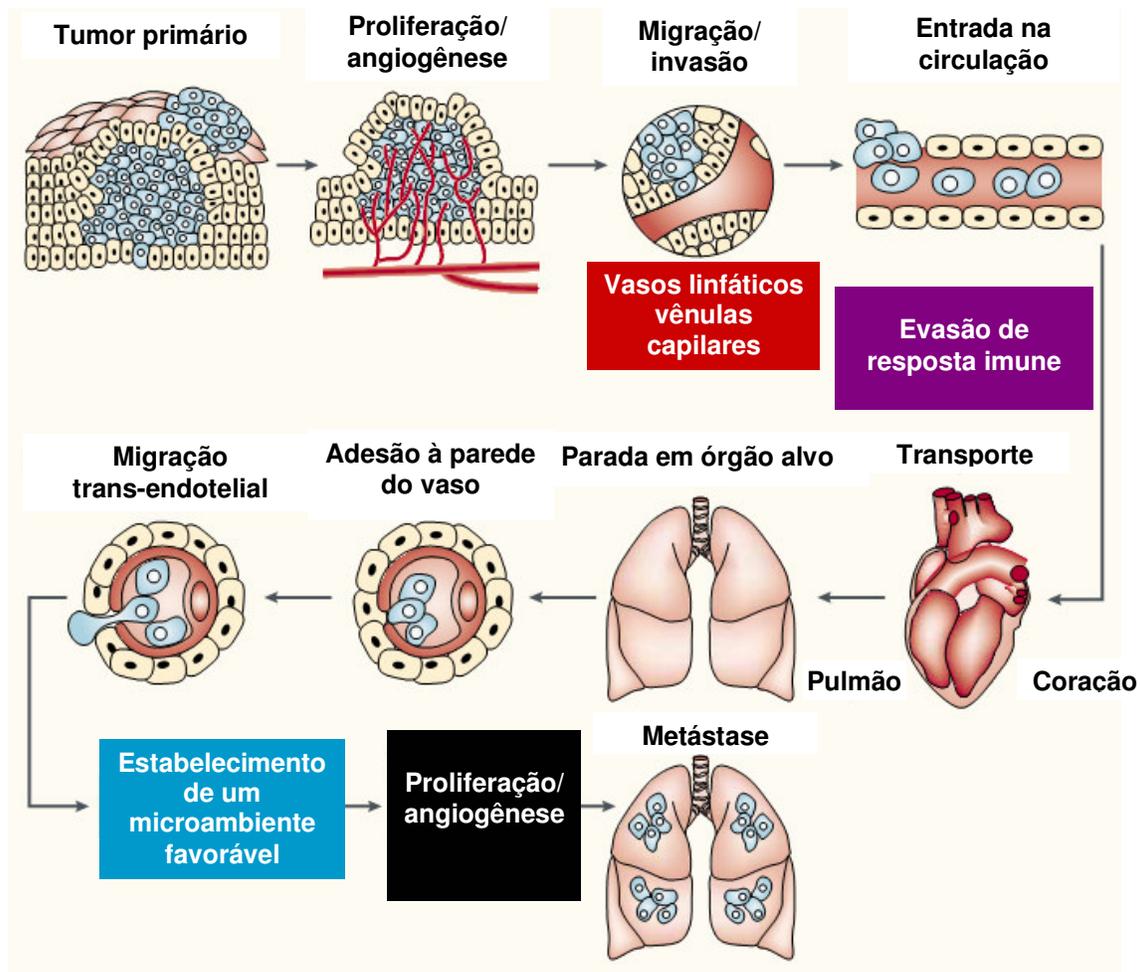


Figura 2: Esquema representativo dos processos envolvidos no processo de metástase (adaptado de Fidler 2002)

A velocidade, o sucesso e o número de metástases estabelecidas dependem de inúmeros fatores e por isso é tão variável entre os diferentes tipos de neoplasias e mesmo entre diferentes pacientes com o mesmo tipo de tumor. O grau de heterogeneidade das populações na massa tumoral primária, o tipo celular do qual este tumor teve origem, propriedades intrínsecas do tumor (neste caso bastante relacionado à capacidade desta neoplasia em transformar o microambiente onde se encontra e utilizá-lo a seu favor), o tipo de tecido onde se estabeleceu a colônia primária e a forma como a circulação ocorre são fatores que participam não apenas na determinação de qual órgão será colonizado, mas também têm efeito determinante sobre a severidade e o curso de tempo em que a metástase vai ocorrer (Nguyen et al., 2009).

1.1.5.1. Migração e invasão

O processo de metástase começa quando algumas células do tumor primário que tenham adquirido capacidade de migração e invasão consigam alcançar um vaso sanguíneo ou linfático e caíam na circulação. Os processos de migração celular e invasão ocorrem fisiologicamente, como em casos de cicatrização, de crescimento de neuritos e de neovascularização. Em todos estes exemplos, o movimento das células é direcionado por um gradiente de fatores tróficos que, assim que o problema for resolvido, é retirado do local, dando fim à migração/invasão. A principal diferença da migração/invasão fisiológica para o que acontece em neoplasias é que no último caso os estímulos tróficos nunca são retirados e, desta forma, a migração/invasão das células tumorais persiste (Liotta & Kohn, 2001).

A transição de um carcinoma normal (primário) para um carcinoma invasivo é precedida pela ativação local do estroma do hospedeiro, passando a secretar fatores que auxiliam tanto na motilidade (fatores tróficos) e na invasão (proteases que degradam matrix extra-celular), quanto na transformação destas células neoplásicas em células de maior motilidade, através da secreção de citocinas como, por exemplo, o TGF β (Giampieri et al., 2009). A presença de TGF β induz uma das mudanças consideradas essenciais para a progressão tumoral ao qual denominamos Transformação Epitelial-Mesenquimal (TEM). A TEM é um processo que ocorre fisiologicamente e um exemplo disto é a formação do sistema nervoso a partir de células da crista neural durante a embriogênese. No entanto, as neoplasias parecem utilizar esta transformação para adquirirem uma condição de maior agressividade, onde as células tumorais que possuíam um fenótipo epitelioide, ou seja, células que expressavam moléculas de superfície que lhes permitiam estabelecer junções com outras células ou mesmo com a matriz extra-celular, que tinham morfologia cubóide e que eram polarizadas como são as células epiteliais, passam a assumir uma morfologia mais semelhante a uma célula mesenquimal (como um fibroblasto) e, assim, acabam tanto perdendo a polarização, quanto deixando de expressar algumas proteínas como a E-caderina, importantes para o estabelecimento de junções de adesão (Chen & Obrink, 1991; Chen et al., 1997). A consequência direta desta TEM é que células que até então pouco migravam se transformam em células que não estão mais ligadas/aderidas a outras células ou a matriz e, por isso, têm uma motilidade muito maior (Gavert & Bem-Ze'ev, 2008).

As vias de sinalização intracelular que regulam motilidade celular são muitas, mas dentre elas duas pequenas proteínas G, denominadas Rho e Rac vêm ganhando atenção. Além de modularem a polimerização e despolimerização de microfilamentos de actina (regulando assim diretamente o movimento celular) (Hall, 1998; Ridley et al., 1992), estas proteínas

também participam no estabelecimento de junções célula-célula dependentes de caderinas (Braga et al., 1997). De fato, o trabalho de Sanz-Moreno e colaboradores (2008) mostrou que a ativação de ambas as proteínas promove migração, mas de formas distintas.

Atualmente são descritas duas estratégias de migração/invasão: a mesenquimal e a amebóide. Na primeira, a célula tumoral apresenta uma morfologia mais alongada (mesenquimal) e o movimento é bastante dependente da secreção de proteases extracelulares para auxiliar na degradação da matriz. Na segunda, as células apresentam uma morfologia mais arredondada (como uma ameba) e por isso são menores e mais ágeis, exigindo assim menor dependência de degradação de matriz extra-celular para moverem-se, o que as torna mais independente da secreção de proteases. Contudo, células com estratégia amebóide necessitam de altos níveis de ativação da via de Rho para conseguirem manter os altos níveis de contractilidade dos filamentos de actina e miosina que promovem a movimentação destas células (Sahai & Marshall, 2003). Por outro lado, a ativação da via da Rac está diretamente relacionada com a movimentação do tipo mesenquimal, pois está associada a uma menor contractilidade dos filamentos de citoesqueleto (Sanz-Moreno et al., 2008). A escolha por um tipo de movimento ou outro é bastante dinâmica, podendo ser adaptado conforme a necessidade da célula tumoral. Sanz-Moreno e colaboradores (2008) sugerem que o mecanismo de interconvertibilidade é mediado pela ativação e inativação da via da Rac.

1.1.5.2. Entrada no vaso e a passagem pela circulação

O próximo passo fundamental no processo de metastase é a entrada das células tumorais na circulação. Este processo é de certa forma, facilitado não apenas pelo fenótipo de maior motilidade das células tumorais, mas também pelo próprio microambiente de um tumor sólido que é rico em vasos recém formados. Como é de se esperar, um vaso recém formado é normalmente de pequeno calibre e em muitos casos ainda não está completamente estruturado, ou seja, as junções entre as células endoteliais ainda não estão tão estruturadas como em um vaso já bem estabelecido, assim como outros tipos celulares que auxiliam na estruturação do vaso ainda não estão presentes (pericitos e células da musculatura lisa). Todo este contexto torna os neovasos mais permeáveis, o que facilita a entrada das células tumorais na circulação (Karamysheva, 2008).

Além disto, Gavard & Gutkind (2006) mostraram que o próprio VEGF (que normalmente está aumentado em neoplasias, para estimular angiogênese) induz a endocitose de uma das moléculas fundamentais na manutenção das junções entre as células endoteliais, a VE-caderina, contribuindo diretamente para o aumento da permeabilidade vascular. Outra

possibilidade é a entrada das células tumorais pela via linfática, que é um caminho também facilitado, considerando que as células endoteliais que compõem os vasos linfáticos não fazem junções de oclusão (o que os torna mais permeáveis) (Rui-Cheng, 2008). Este é, provavelmente, um dos motivos pelo qual tantos tumores provocam metástase nos linfonodos drenantes da região do tumor primário antes de efetivamente colonizarem outros órgãos (Gupta & Massagué, 2006).

Neste mesmo sentido, acredita-se que existam mecanismos facilitadores deixados pelas células pioneiras para as demais células do tumor conseguirem atingir a corrente sanguínea. Estes mecanismos não foram ainda elucidados, mas acredita-se que envolvam: a presença de quimiocinas e citocinas que formariam um gradiente ao longo do trajeto a ser percorrido; ausência de necessidade de degradar a matriz extra-celular; assim como a facilitação da passagem das outras células tumorais pela barreira de células endoteliais.

A chegada das células tumorais na circulação é um ponto crucial para o processo de metástase, no entanto, apenas 0,01% das células que efetivamente entram na corrente sanguínea conseguem estabelecer metástase (Joyce & Pollard, 2009). Neste mesmo trabalho, os autores citam que até 10.000 células tumorais podem entrar na circulação por dia, o que nos faz questionar: o que acontece com estas células? Porque a grande maioria não consegue chegar ao seu destino final?

Na verdade, a entrada na corrente sanguínea representa mais um grande desafio que contribui para a baixa eficiência do processo de metástase (Weiss, 1990; Sugarbaker, 1993). Uma vez na circulação, muitas das células tumorais morrem pelo próprio estresse mecânico exercido pelo fluxo sanguíneo, outras são reconhecidas e atacadas por células do sistema imunológico. Desta maneira, poucas são aquelas que conseguem efetivamente atingir a próxima etapa: a adesão no endotélio do órgão alvo.

1.1.5.3. A decisão pelo órgão alvo

O que leva uma célula tumoral a estabelecer metástase preferencialmente em um órgão e não em outro? Esta pergunta ainda não tem uma resposta definitiva e nem conclusiva, no entanto, acredita-se que dependa do contexto tanto das células tumorais quanto dos possíveis órgãos alvos. A referência a possíveis órgãos alvos é feita, pois apesar da teoria “semente e solo”, a localização do tumor primário, a rede vascular (ou seja, o sentido da circulação) e a localização dos possíveis sítios secundários (neste caso, a ordem pelo qual a circulação atinge os diferentes órgãos passíveis de serem colonizados pelas células tumorais) modulam diretamente a probabilidade de metástase. Em outras palavras, dentre os órgãos que

se comportem como “um solo fértil”, aqueles que estiverem mais próximos ao tumor primário ou que serão primeiro irrigados com o sangue onde se encontram as células tumorais, terão maior probabilidade de serem “semeado”.

Alguns dos mecanismos moleculares descritos utilizados na parada das células tumorais no órgão secundário envolvem interações de adesão mediadas por receptores de superfície, semelhantemente ao processo de parada de leucócitos no endotélio (Semple & Freedman, 2010). De fato, acredita-se que a parada das células endoteliais e sua passagem pela barreira endotelial para entrar no órgão alvo utilize mecanismos bastante similares aos utilizados pelas células do sistema imunológico para chegarem aos locais de dano ou infecção. Neste caso, incluiria o margeamento das células tumorais, ou seja, a saída delas do fluxo sanguíneo para a margem do vaso; o rolamento e finalmente a adesão ao endotélio (Abbas & Lichtman, 2005).

Contudo, algumas questões ainda não são bem compreendidas, como por exemplo a escolha do endotélio. Ainda traçando um paralelo com o sistema imunológico, a adesão de leucócitos é antecedida por algum evento capaz de ativar o endotélio na região onde a presença dos leucócitos se faz necessária e, assim, moléculas de adesão passam a ser expressas em grande densidade, possibilitando o rolamento e adesão destas células. No caso da metástase, até onde se sabe, não existe nenhum evento prévio que ative o endotélio para a adesão das células tumorais, embora alguns trabalhos cite a importância de mediadores inflamatórios neste processo, como por exemplo, as células de câncer de mama que parecem precisar de CXCR4 para colonizar tecidos ricos em CXCL12, como os pulmões (Orimo et al., 2005).

Estratégias de análise de larga escala, como microarranjos, vêm sendo utilizados para tentar identificar a expressão diferencial de genes entre populações de células tumorais que colonizam preferencialmente um órgão ou outro. O trabalho pioneiro utilizando esta estratégia foi desenvolvido por Minn e colaboradores (2005) e se baseou na realização de inúmeros ciclos de seleção de células tumorais *in vivo*, para obtenção de clones que tivessem grande tropismo por colonizar pulmões. Estes clones tiveram seu transcriptoma decifrado e comparado com o de células não selecionadas para colonizar pulmões e assim alguns genes candidatos foram identificados e testados para esta função, elucidando mecanismos importantes para a metástase pulmonar de carcinoma mamário.

1.1.5.4. Migração trans-endotelial

Uma vez aderida ao endotélio do órgão alvo, a célula tumoral precisa passar pelo endotélio para chegar efetivamente ao órgão. Este processo é chamado de migração trans-endotelial ou extravasamento. Esta é mais uma etapa fundamental no processo de metástase, mas cujos mecanismos ainda são pouco compreendidos.

Uma hipótese bastante aceita é que neste ponto também deve existir um mecanismo facilitador para que várias células, e não apenas alguns clones isolados, entrem no novo sítio e, assim, aumente a probabilidade de sucesso na colonização. Neste contexto, acredita-se que após a adesão da(s) primeira(s) célula(s) tumoral(ais), esta(s) permaneça(m) ancorada(s) ao endotélio, induzindo a ativação destas células endoteliais e, conseqüentemente, fazendo com que novas moléculas de adesão sejam expressas. Assim sendo, o rolamento e adesão de outras células tumorais neste endotélio ativado passa a ser mais provável. Além disto, as células tumorais aderidas ao endotélio parecem ter capacidade replicativa (Al-Mehdi et al., 2000), aumentando a sua densidade e assim facilitando a modificação do endotélio. Aqui vale a pena salientar que a aderência de um número maior de células tumorais pode facilitar a entrada das células neoplásicas por gerar algum tipo de lesão no vaso (Gupta & Massagué, 2006), ou mesmo pela modulação da sua permeabilidade através da secreção de fatores como VEGF (Weis & Cheresh, 2005; Gavard & Gutkind, 2006)

1.1.5.5. Colonização do novo nicho – modificações no microambiente

Uma vez dentro do sítio secundário, o processo todo reinicia. Tudo que foi descrito nos itens anteriores é válido. Estas células precisam: se diferenciar, dando origem a diferentes populações de células tumorais; modificar o microambiente ao seu redor; evadir resposta imune; estimular a formação de vasos para então se estabelecer e progredir. Este processo pode ser longo e, assim, muitos tumores permanecem dormentes ou latentes por longos períodos antes de efetivamente progredirem no sítio secundário (Naumov et al., 2002).

1.2. Melanoma

O melanoma maligno é um dos tipos de tumores mais agressivos e, desta forma, é o principal responsável pelas mortes causadas por tumores de pele, muito embora seja também um dos menos frequentes. A incidência de melanomas tem aumentado significativamente nos últimos anos e, normalmente, manifesta-se de forma cutânea (90% dos casos), embora existam casos de aparecimento de lesões primárias em mucosa, uvea/ocular e leptomeningeal (Fecher et al., 2007). Por estar diretamente associado à maior exposição à radiação ultravioleta, o aumento na incidência de melanoma ocorre de forma semelhante em ambos os sexos e em países ricos ou pobres. O prognóstico de pacientes com melanoma está diretamente relacionado com o estágio em que se encontra a doença quando o diagnóstico é feito, uma vez que pacientes em estágios iniciais podem retirar cirurgicamente a lesão maligna e por isso possuem alta probabilidade de cura completa (Ryu et al., 2007). Exatamente o contrário ocorre em casos de diagnóstico tardio, onde quase 100% dos casos são letais e apenas 54% dos pacientes onde foram identificados nódulos nos linfonodos drenantes e 6% dos pacientes que possuíam melanoma disseminado chegam a sobreviver por mais de 5 anos; sendo que a expectativa de vida média neste último caso é de apenas 7,5 meses (Barth et al., 1995; Balch et al., 2001 e Kasper et al., 2007).

Existem diferentes tipos de câncer de pele, mas são considerados melanomas apenas aqueles que se originam de melanócitos, que são as células responsáveis pela produção de melanina (o pigmento escuro) presentes na camada mais superficial da pele, a epiderme (figura 3). A homeostasia de uma pele normal é mantida através da interação entre melanócitos e seu microambiente, que inclui queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e do sistema imune, bem como com a matrix extra-celular. No caso dos melanócitos, sabemos que eles interagem com fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune apenas através da secreção de fatores solúveis e que se encontram aderidos à queratinócitos. Esta proximidade física entre estes dois tipos celulares permite aos queratinócitos exercerem controle sobre o fenótipo e crescimento dos melanócitos. (Bogenrieder & Herlyn, 2002).

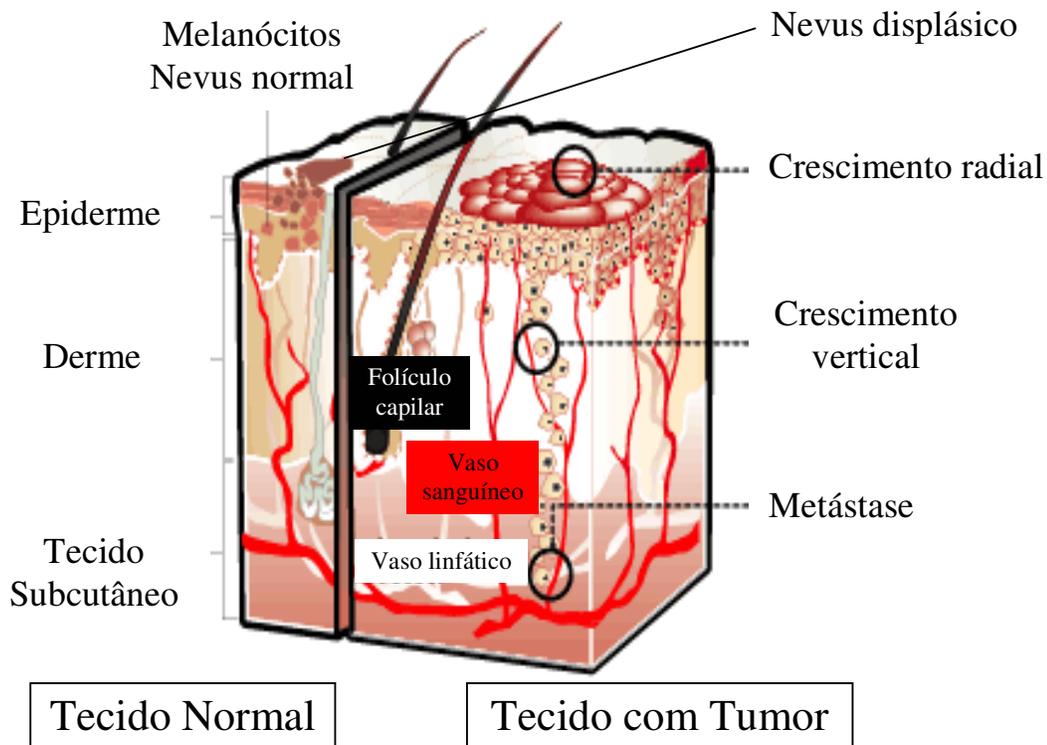


Figura 3: Esquema representativo das fases de crescimento do melanoma humano. Do lado esquerdo vemos um tecido normal, contendo: tecido subcutâneo, derme e mais superficialmente a epiderme, onde se encontram os melanócitos e nevos normais. Do lado direito observamos o tecido com tumor, onde podemos ver claramente as fases da progressão tumoral: primeiro a transição de um nevo normal para displásico, depois a fase de crescimento radial, em seguida a fase de invasão da derme e sub-cutâneo com o crescimento vertical e por fim a fase metastática que é quando as células de melanoma atingem os vasos sanguíneos e/ou linfáticos (adaptado de www.microvet.arizona.edu/courses/VSC519/Secure/CaseMelanoma/CaseMelanoma.htm).

A adesão entre queratinócitos e melanócitos acontece através do contato entre moléculas de superfície da família das caderinas, expressas em ambas as células, neste caso especificamente, a E-caderina. As caderinas são glicoproteínas de membrana que realizam contato célula-célula através de sua ligação direta a outra caderina e que possuem uma única região transmembranar, uma grande região extracelular, responsável pela interação com outras caderinas, e uma pequena porção carboxi-terminal intracelular, que ancora a proteína ao citoesqueleto de actina; de fato, o ancoramento de caderinas aos filamentos de actina não ocorre diretamente, sendo mediado por algumas proteínas citoplasmáticas, dentre elas a β -

catenina, particularmente importante no ancoramento da E-caderina (Meigs et al., 2002). A E-caderina está diretamente relacionada a tumores, uma vez que a perda de sua expressão é fundamental para a transformação epitelial-mesenquimal, onde as células tumorais perdem polaridade e adesão e passam a ter um fenótipo mais agressivo (Polyak & Weingberg, 2009). No caso dos melanócitos não é diferente, a diminuição ou perda completa de expressão de E-caderina está diretamente associada à perda do controle feito pelos queratinócitos e tem como consequência a formação de um nevus (Hsu et al., 1996), que é um aglomerado de melanócitos ainda considerado benigno, mas que pode progredir para um *nevus* displásico, considerado melanoma de grau I ou mesmo para um melanoma de grau II que é quando a lesão primária começa a apresentar crescimento radial (figura 3) (Bogenrieder & Herlyn, 2002).

Além da diminuição da expressão de E-caderina, a transformação maligna que ocorre de um melanócito para melanoma está também associada ao aumento da expressão de N-caderina, outro membro da família das caderinas, mas que, ao contrário da E-caderina, está associada a aumento da motilidade e invasão de alguns tumores, dentre eles, células de câncer de mama (Nieman et al., 1999). Desta forma, o melanoma passa a ser capaz de migrar e invadir camadas mais profundas da pele, o que é chamado de fase de crescimento vertical – melanoma de grau III - até que consiga então atingir vasos linfáticos e/ou sanguíneos estabelecendo o grau mais avançado da doença, o melanoma de grau IV – metastático (figura 3) (Bogenrieder & Herlyn, 2002). A importância da expressão de E-caderina para que os melanócitos se mantenham sob controle dos queratinócitos foi confirmada por Hsu e colaboradores (2000), ao demonstrarem que a indução da expressão de E-caderina em células de melanoma re-estabelece o controle de crescimento mediado por queratinócitos e induz a diminuição da expressão de moléculas de adesão relacionadas com invasão.

Acredita-se que o maior número de modificações genéticas na progressão tumoral de melanomas esteja associado à mudança de um padrão de crescimento radial, para que as células possam adquirir um fenótipo mais agressivo e que lhes permita maior mobilidade e habilidade de invadir e assim crescer verticalmente. As mudanças que ocorrem na transformação de um melanoma de grau II (radial) para um tumor de grau III (vertical) são muitas. As células de melanoma de grau III já são capazes de fazer metástase e são bem menos dependentes de fatores de crescimento exógenos (normalmente fornecidos pelo micro-ambiente tumoral). Além disto, elas apresentam grande instabilidade genômica, crescimento independente de ancoragem e, uma vez em cultura, não necessitam adição de fatores de crescimento para sua sobrevivência (Kath et al., 1991).

Segundo Kasper e colaboradores (2007) a forma de se tratar casos de melanoma de grau III ou IV na clínica ainda é alvo de muita discussão, não existindo um protocolo padrão bem estabelecido. Desta forma, pacientes são tratados de forma diferente em diferentes instituições de saúde, mas estão entre as estratégias utilizadas: a quimioterapia, adjuvantes do sistema imune, vacinas específicas para tumores, algumas citocinas, anticorpos monoclonais e alguns imunostimuladores específicos. Infelizmente nenhum destes tratamentos é efetivo para a cura de pacientes com melanoma disseminado, eles apenas buscam melhorar a qualidade de vida dos pacientes e tentar prolongar um pouco a sua sobrevivência, mas na maioria dos casos, são efetivos apenas no começo do tratamento (Eigentler et al., 2003). Embora não faça parte dos protocolos mais utilizados, a radioterapia também pode ser utilizada no combate ao melanoma, especialmente aqueles no estágio IV da doença, como sugerem Stevens & McKay (2006).

A falta de protocolos terapêuticos efetivos leva a uma contínua busca por novos alvos para intervenções farmacológicas e para tanto é necessário compreender detalhadamente a biologia dos melanomas. Neste sentido, buscamos quais são as alterações genéticas mais frequentes e quais as moléculas necessárias para a progressão de melanomas, uma vez que estas informações poderiam servir não somente como alvos terapêuticos, mas também como marcadores para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da doença.

Mutações nos genes que codificam as proteínas CDKN2A, PTEN, P53, RAS e MYC foram relacionadas com a progressão de melanoma. No entanto, estas mutações ainda não foram correlacionadas especificamente a subtipos ou fases específicas dos melanomas e nem validados para serem utilizados com marcadores para prognóstico (Fecher et al., 2007). Contudo, Dai e colaboradores (2005) demonstraram em um estudo clínico envolvendo 292 pacientes que a expressão do oncogene Akt/PKB; envolvido na progressão do ciclo celular, crescimento celular e inibição da apoptose; tem sua expressão aumentada com a progressão do melanoma para fases mais agressivas e de invasão e que, por isso, o aumento da sua expressão está inversamente relacionado a sobrevivência dos pacientes.

Embora a ativação de MAPK seja característica de melanomas, a RAS, um oncogene frequentemente mutado em tumores e que promove fosforilação/ativação da via das MAPKs encontra-se mutado em apenas 15% dos melanomas cutâneos, sugerindo que possivelmente existem outras vias de sinalização alteradas que podem ser mais importantes para a superativação das MAPK. Uma das proteínas candidatas é a BRAF (homólogo B1 do oncogene viral do sarcoma V-raf murino), uma proteína quinase que também fosforila/ativa a via das MAPKs e que encontra-se mutada em 66% dos melanomas malignos. 100% das mutações em BRAF acontecem no seu domínio quinase e cerca de 80% são frutos de apenas uma única

substituição que confere 10,7 vezes maior atividade quinase do que comparada com a selvagem (Davies et al., 2002). Pollock e colaboradores (2003) demonstraram que mutações em BRAF são bastante frequentes em *Nevi* benignos e, desta forma, sugere que a ativação da via de MAPK é importante para o desenvolvimento de melanoma, no entanto, sozinha não é suficiente para a transformação maligna.

Também já foram descritas, em melanoma, mutações em genes que codificam proteínas do ciclo celular diretamente, tais como a p16INK4a que é fundamental no ponto de checagem da fase G1 para a fase S, pois em caso de necessidade, liga-se ao complexo ciclina D/CDK4 inibindo-o e assim impedindo a progressão do ciclo celular. No entanto, mutações em p16INK4a parecem ser uma causa de susceptibilidade genética a melanomas em famílias, uma vez que em casos de famílias com alta incidência da doença, cerca de 10-40% apresentam mutações nesta proteína e estas mutações são bastante raras em casos esporádicos (Eliason et al., 2006). Marini e colaboradores (2006) mostraram que em 75% dos casos de melanoma p16INK4a é silenciado por hipermetilação da região promotora.

Outro alvo de frequentes mutações em tumores é o gene que codifica a proteína p53, um supressor de tumor, mas que parece ser um componente importante apenas de melanomas associados a danos causados no DNA, seja por agentes mutagênicos ou por grande exposição à radiação UV, pois fora destes casos, p53 é raramente encontrado mutado em melanomas (entre 0 e 25%) (Lubbe et al., 1994).

Novos alvos continuam sendo investigados e neste sentido, estudos de larga escala, como análise de microarranjos, podem contribuir muito. Bittner e colaboradores (2000), utilizando amostras de paciente e Ryu e colaboradores (2007) utilizando linhagens celulares de melanomas humanos em diferentes estágios, realizaram uma análise transcriptômica e identificaram alguns genes modulados diferencialmente que conseguem determinar tumores mais agressivos. No trabalho de 2007, os autores ainda dividiram estes genes em 3 classes: 1) genes que sofriam modulação positiva cuja função está relacionada a ativação do ciclo celular, replicação do DNA e mecanismo de reparo, 2) genes cuja expressão foi perdida e tinham função de adesão celular ou na diferenciação de melanócitos e 3) genes modulados positivamente e com função de resistência a apoptose; abrindo um leque bastante grande de novos alvos a serem estudados. Lembrando que novos alvos significam a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos ou estratégias terapêuticas.

1.3. O sistema calicreínas-cininas

1.3.1. Um breve histórico do sistema

A história do sistema calicreínas-cininas começa em 1909, quando Abelous & Bardier relatam uma queda transiente da pressão sanguínea de humanos que receberam injeção intravenosa de frações de urina humana (revisado por Prado et al., 2002). Alguns anos mais tarde, em 1930, Werle & Frey descrevem uma enzima pancreática a qual chamaram de calicreína (do grego: *kallikreas*, que quer dizer pâncreas). Em 1937, Werle descreve pela primeira vez um dos peptídeos ativos do sistema ao qual chamou de DK e que atualmente é conhecido como calidina (KD), ao perceber que quando trabalhava com calicreínas e soro sanguíneo formava-se uma nova substância de menor peso molecular e que possuía ações semelhantes a da calicreína. No final da década de 40, Rocha-e-Silva e colaboradores descrevem aqui na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, utilizando veneno de serpentes, a bradicinina (BK) (Rocha-e-Silva et al., 1949).

A seqüência de aminoácidos do nonapeptídeo BK somente foi elucidada na década de 60 e foi descrita concomitantemente por dois grupos (Boissonnas et al., 1960; Elliott et al. 1960; Elliott et al., 1961). Um ano mais tarde, Werle e colaboradores (1961) descreveram a seqüência de aminoácidos da KD (Figura 4).

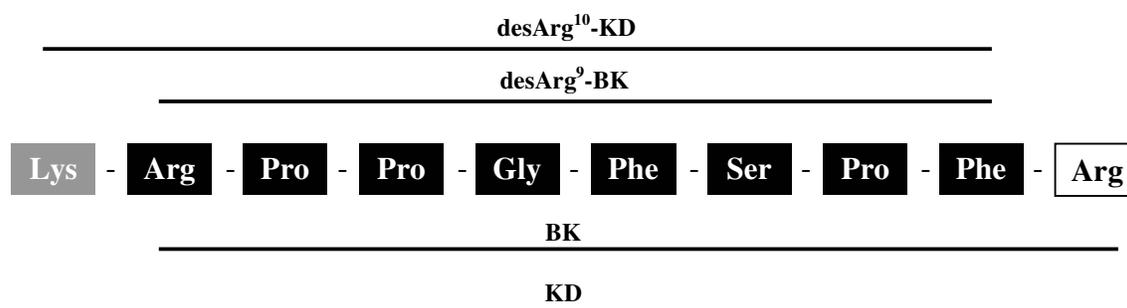


Figura 4: Sequência de aminoácidos dos peptídeos ativos do SCC. Preto – resíduos de aminoácido comuns a todos os peptídeos; Cinza – resíduo de lisina presente na KD e desArg¹⁰-KD; Branco – resíduo de arginina ausente nos peptídeos desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD; BK – bradicinina; KD – calidina.

A identificação dos receptores do sistema somente aconteceu na década de 70, quando Regoli e colaboradores descreveram a existência de dois receptores - B1 e B2 – e começaram

as suas caracterizações moleculares, demonstrando diferentes perfis farmacológicos e de expressão (Regoli et al., 1977; Regoli et al., 1978; Drouin et al., 1979; para revisão ver Regoli & Barabé, 1980 e Leeb-Lundberg et al., 2005). Embora descobertos apenas no final dos anos 70, no começo da década de 90 os receptores B1 e B2 já haviam sido clonados (McEachern et al., 1991; Menke et al., 1994) e poucos anos depois animais com os receptores deletados já estavam disponíveis para estudos (Borkowski et al., 1995; Pesquero et al., 2000).

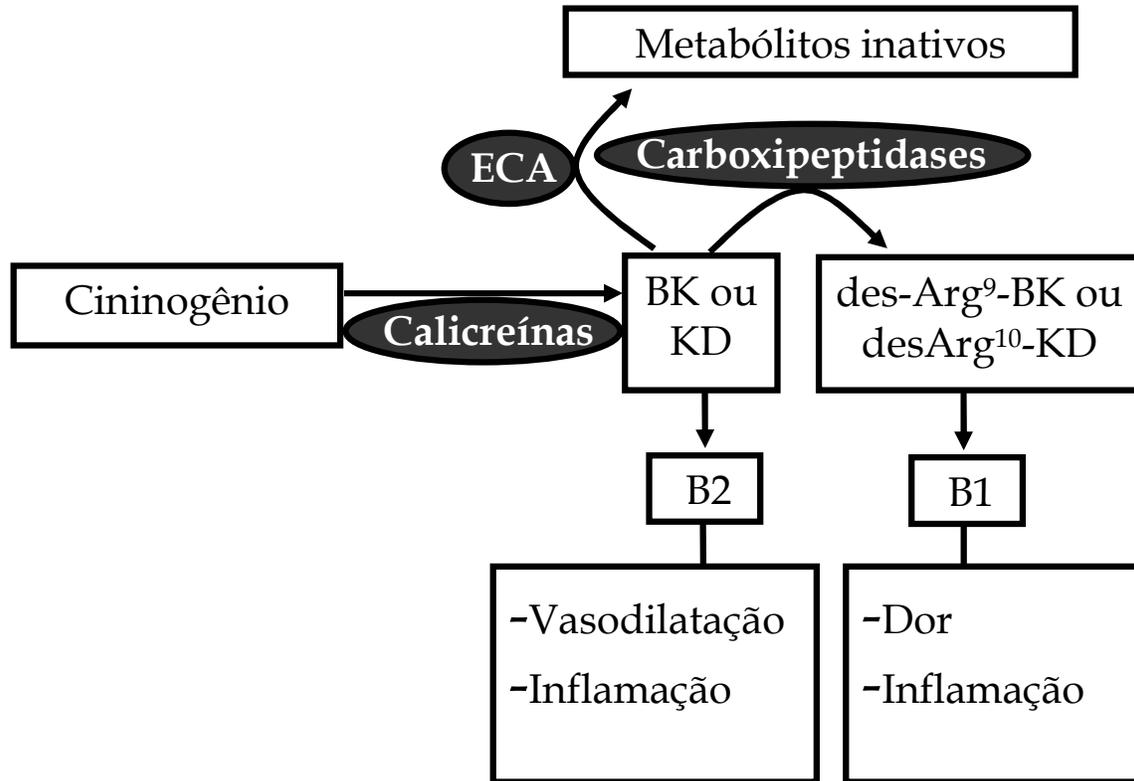


Figura 5: Representação esquemática do sistema caliceínas-cininas, evidenciando os componentes deste sistema bem como funções clássicas mediadas pelos seus receptores, no qual o cininogênio é clivado por caliceínas formando BK ou KD, que podem tanto ativar o receptor B2 e neste caso mediar respostas de inflamação e vasodilatação, quanto serem clivadas pela ECA (que gera peptídeos inativos) ou por carboxipeptidases, formando a desArg⁹-BK ou desArg¹⁰-KD, que ativam o receptor B1 e assim medeiam dor e inflamação. BK – bradicinina, KD – calidina, ECA – enzima conversora de angiotensina-I.

Em termos gerais, sabemos que o sistema caliceínas-cininas atua de forma sistêmica modulando a pressão arterial (Duka et al., 2006), bem como participando de respostas inflamatórias e de dor (Calixto et al, 2004). Contudo, a expressão local de componentes

destes sistemas é descrita na literatura em muitos tecidos e órgãos, demonstrando que podem estar envolvidos em outras funções que não as classicamente conhecidas (para revisão ver Costa-Neto et al., 2008). Na figura 5, observamos uma representação esquemática e geral do sistema calicreínas-cininas. Cada uma das partes deste esquema será detalhadamente abordada nos próximos itens.

1.3.2. Formação da bradicinina e da calidina

Os peptídeos BK e KD são originados a partir de um precursor comum, o cininogênio, - proteína circulante que possui estes peptídeos na sua seqüência de aminoácidos, e que é produzido de forma sistêmica pelo fígado. São conhecidos dois cininogênios, o de alto peso molecular (88-120 kDa) e o de baixo peso molecular (50-68 kDa). Acredita-se que o primeiro seja restrito ao plasma sanguíneo por causa do seu tamanho e que o segundo, de menor tamanho, consiga extravasar e por isso esteja presente tanto no plasma sanguíneo quanto nos tecidos. Ambos são oriundos de um mesmo gene de 11 exons que sofre processamento alternativo, localizado no cromossomo 3 humano (3q27) (Takagaki et al., 1985). Os cininogênios são glicoproteínas formadas por múltiplos domínios que possuem uma cadeia pesada na porção C-terminal e uma cadeia leve na região N-terminal. Entre a cadeia pesada (que compreende os domínios de 1 a 3) e a cadeia leve (formada pelos domínios 5 e 6) está o domínio 4, que é a BK (Nawa et al., 1983).

Para ser biologicamente ativa, a BK e/ou KD precisam ser clivadas do cininogênio e isso é feito por enzimas específicas denominadas calicreínas. As calicreínas são serino-endopeptidases que clivam especificamente o cininogênio (tanto de alto como de baixo peso molecular) e estão divididas em dois tipos: a plasmática e as teciduais (anteriormente conhecidas como glandulares).

A calicreína plasmática é sintetizada no fígado, a partir de um único gene localizado no cromossomo humano 4 (4q35), na forma de uma pré-enzima inativa, a pré-calicreína. A ativação desta calicreína ocorre no plasma e é regulada por inúmeros fatores, dentre eles: o fator de Hageman (fator XII de coagulação), endotoxina, proteases microbianas, entre outros. Uma vez ativa, a calicreína plasmática cliva o cininogênio de alto peso molecular - presente no plasma sanguíneo – liberando o nonapeptídeo BK. Tanto a calicreína plasmática ativa, quanto o fator de coagulação XIIa, que é capaz de ativá-la, são finamente regulados e, na maioria das vezes, rapidamente inativados pelo inibidor C1 do sistema complemento (de Agostini et al., 1984; Davis, 2004).

As calicreínas teciduais são uma família de enzimas (KLK) que semelhantemente a calicreína plasmática agem como serino-endopeptidases, no entanto, são expressas em diferentes níveis, em uma grande variedade de tecidos. As diferentes KLK são oriundas de diferentes genes, sendo a maioria deles localizados no braço longo do cromossomo 19 e uma vez expressas na forma de uma pró-enzima, possuem um peptídeo sinal que as conduzem ao retículo endoplasmático e finalmente à secreção. Sua ativação acontece nos tecidos pela clivagem do pró-segmento que promove uma mudança conformacional re-estabelecendo o sítio catalítico. Ao contrário da calicreína plasmática, as teciduais formam principalmente KD e, embora sejam capazes de clivar cininogênio de alto e baixo peso molecular, as calicreínas teciduais utilizam principalmente o de baixo peso molecular como substrato por sua maior disponibilidade nos tecidos. Além disto, estas enzimas estão relacionadas com outras funções que não apenas a clivagem de cininogênio, podendo também clivar/ativar os receptores ativados por proteases (PARs), outras calicreínas, alguns fatores de crescimento como fator de necrose tumoral β (TGF β) e indiretamente os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) (pela clivagem de proteínas ligadoras de IGF – IGFBP - que inibem estes IGFs), degradar matriz extracelular pela clivagem direta de seus componentes (laminina, gelatina, fibrinogênio bem como diferentes tipos de colágenos e fibronectinas) ou pelo aumento na atividade de proteases como metaloproteases (MMPs) e/ou ativação do zimogênio do plasminogênio-tipo-uroquinase (uPA) e inativação do inibidor do ativador de plasminogênio I (PAI-I) – principal inibidor de uPA – e que no aumento da proteólise mediada por uPA e ligação de uPA ao seu receptor uPAR, que converte plasminogênio em plasmina (para revisão ver Pampalakis & Sotiropoulou, 2007 e Lundwall & Brattsand, 2008).

1.3.3. Formação da desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD por cininases do tipo I

A BK e a KD formadas podem exercer seus efeitos diretamente através do receptor B2 ou podem servir de substrato para as cininases do tipo I que retiram o resíduo de Arg da porção carboxi-terminal destes peptídeos, dando origem à desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD, respectivamente, que são ligantes preferenciais do receptor B1. São consideradas cininases do tipo I as carboxipeptidases M (CPM) e N (CPN) e recentemente a B (CPB) e a D (CPD), sendo todas metalo-carboxi-peptidases dependentes de zinco (Vendrell et al., 2000).

A primeira carboxipeptidase descrita por ter atividade de cininase do tipo I foi a CPN por Erdos & Sloane (1962). Neste período ainda não se conhecia o receptor B1 e por isso ela foi descrita como uma enzima plasmática capaz de degradar a BK. A CPN é sintetizada apenas pelo fígado e imediatamente secretada na circulação sanguínea, onde sua

concentração é alta, em torno de 30 µg/ml (10^{-7} M). Ela cliva apenas resíduos de Arg ou Lys carboxi-terminais de peptídeos ou proteínas, no entanto, quando se trata de degradação de BK, sua atividade é de menor importância fisiológica do que a ECA (enzima conversora de angiotensina I/cininase II). Contudo, a CPN em pacientes que tomam medicamentos que inibem a ECA, torna-se peça fundamental para o controle dos níveis de BK circulantes, uma vez que altas concentrações circulantes deste peptídeo podem ser danosas (para revisão ver Skidgel & Erdos, 2007).

A CPM foi descoberta como uma proteína que está presa a membrana por uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) e que tem atividade de carboxi-peptidase, retirando especificamente resíduos de Arg e Lys carboxi-terminais. Atualmente esta enzima tem sua seqüência de cDNA (Tan et al., 1989) e estrutura genômica (Li et al., 2002) conhecidas, bem como sua estrutura tridimensional elucidada por cristalografia de raio-X (Reverter et al., 2004). Zhang e colaboradores (2008a) demonstraram a existência de uma relação direta da CPM com a ativação de vias de sinalização celular do receptor B1. Os autores demonstraram que a CPM interage fisicamente com o receptor B1 e que esta interação acontece em regiões ricas em caveolina e colesterol conhecidas como balsas lipídicas (*lipid rafts*) e é fundamental para a sinalização via receptor B1, ou seja, indicando que a CPM em direta associação ao receptor B1 seria uma forma de priorizar a sinalização via este receptor em detrimento ao receptor B2.

Nos últimos anos foram descritas como tendo atividade de cininase I outras duas enzimas: a CPD, que assim como a CPM, também é uma proteína de membrana e que foi caracterizada por Timblin e colaboradores (2002) e a CPB, identificada por sua atividade formadora de desArg⁹-BK no perfusato do leito arterial mesentérico de ratos (Oliveira et al., 2007).

1.3.4. Degradação da bradicinina e calidina por cininases do tipo II

De forma lógica, a segunda classe de enzimas descobertas capazes de clivar BK foi chamada de cininases do tipo II. Ao contrário das cininases do tipo I que retiram apenas um resíduo de aminoácido, as cininases do tipo II são peptidilpeptídeo hidrolases e removem o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ da porção carboxi-terminal da BK. No começo da década de 70 se mostrou que esta cininase do tipo II de membrana encontrada era idêntica à enzima conversora de angiotensina-I (ECA) descoberta por Skeggs em 1956 (Skeggs et al., 1956), sugerindo de forma bastante inovadora para a época que uma mesma enzima poderia desempenhar duas funções distintas (Yang et al., 1970 e Yang et al., 1971).

Em 1984, Skidgel e colaboradores demonstraram que uma outra endopeptidase conhecida por NEP (endopeptidase neutra) era capaz de clivar de forma semelhante os mesmos substratos utilizados pela ECA. A NEP foi descoberta nos rins por Kerr & Kenny (1974) e no cérebro por Malfroy e colaboradores (1978) e possui atividade de cininase tipo II, mas não de ECA, pois cliva a angiotensina I em um hepta e um tripeptídeo além de clivar também o próprio octapeptídeo angiotensina II.

Tanto a NEP quanto a ECA são metalopeptidases de membrana que utilizam o íon Zn^{2+} como cofator, no entanto, a NEP é uma enzima de membrana do tipo II presa na membrana plasmática por um peptídeo sinal não clivado na região amino-terminal, possui um único sítio catalítico e consegue clivar peptídeos maiores do que consegue a ECA. Por sua vez a ECA é uma enzima de membrana do tipo I e por isso está presa à membrana por uma âncora na sua extremidade carboxi-terminal e possui dois sítios catalíticos independentes localizados em domínios extracelulares diferentes da proteína (para revisão ver Skidgel & Erdos, 2004).

1.3.5. Os receptores do SCC

Conforme descrito anteriormente, os componentes ativos do SCC são gerados a partir da clivagem do cininogênio pelas enzimas calicreínas, gerando os peptídeos BK e KD e esses peptídeos se ligam com alta afinidade ao receptor B2. Além disto, a BK e a KD podem servir de substrato para as cininases do tipo I formando os peptídeos desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD, respectivamente, e estes peptídeos são ligantes preferenciais do receptor B1 (Figura 5).

Os receptores B1 e B2 são parte da subfamília de receptores semelhantes à rodopsina que possuem sete alças transmembranares (7TM) e são acoplados à proteína G (GPCR) na região intracelular, mas diferem bastante entre si quanto ao padrão de expressão e à forma de sinalização. Enquanto o receptor B1 tem expressão muito baixa ou ausente na maioria dos tecidos, sendo induzido rapidamente em situações de lesão ou inflamação e não sofrendo fosforilação quando ativado (pois não tem resíduos de serina e treonina na cauda carboxi-terminal) nem internalização/desensibilização; o receptor B2 é constitutivamente expresso e uma vez ativado é fosforilado e conseqüentemente internalizado/desensibilizado (Fausner et al., 1998; Blaukat et al., 1999). Existem relatos de que o receptor B2 poderia também ser ativado diretamente pela ação de calicreínas e algumas outras proteases, classificando-os potencialmente em um grupo de receptores-ativados por serino-proteases (Hecquet et al., 2000 e Biyashev et al., 2006).

Uma vez ativados, estes receptores desencadeiam vias de sinalização celular muitas vezes similares. No entanto, já foi mostrado que o padrão de ativação das vias nem sempre é o mesmo. Em termos gerais, parece que esta variação do padrão de sinalização de um receptor para o outro está diretamente relacionado com a duração desta sinalização, sendo normalmente a ativação mediada pelo receptor B2 transiente e a mediada por B1 mais prolongada (Mathis et al., 1996 e Dixon et al., 2002).

O receptor B1, assim como o B2 sinalizam via proteína $G\alpha_q$ e conseqüentemente ativam fosfolipase C, que cliva fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) da membrana em diacilglicerol (DAG) e inositol-3-fosfato (IP3), que em última instância elevam os níveis de cálcio intracelular. Embora a via de sinalização seja a mesma, Mathis e colaboradores (1996) observaram que quando estimulavam células em cultura de musculatura lisa da artéria mesentérica superior de coelhos com BK havia um aumento rápido e transiente da concentração de cálcio intracelular, enquanto que quando estimulavam com o ligante do receptor B1, desArg⁹-BK, havia uma resposta bifásica e sustentada. Além disto, ambos receptores também podem sinalizar via proteína $G\alpha_i$, o que promove uma regulação negativa da adenilato ciclase e estimula a via das MAPKs. A ativação de MAPKs promove a translocação do fator de transcrição AP1 para o núcleo (Naraba et al., 1998), bem como está relacionada a ativação do também fator de transcrição NF κ B e aumento na expressão de COX2 quando induzida pelo receptor B2 (Chen et al., 2004). A ativação do receptor B2 não regula a formação de eicosanóides apenas pela modulação da expressão de COX2, mas também ativa diretamente a primeira enzima da cascata de formação destes mediadores lipídicos, a fosfolipase A2 (Burch et al., 1987). Além disto outros relatos também mostram que a ativação de NF κ B pelo receptor B2 envolve a via da PI3K como descreveu Pan e colaboradores em 1999 e pode induzir a expressão de citocinas como IL1 β (Pan et al., 1996).

O receptor B1, por sua vez, também ativa o fator de transcrição NF κ B levando a sua translocação para núcleo, mas em células da musculatura lisa de humanos este processo parece envolver a ativação de PKC (Moreau et al., 2006). Além disto, por ser indutível, o receptor B1 pode entrar em um processo de retro-alimentação positiva, uma vez que sua ativação leva a translocação de NF κ B para o núcleo e o gene que codifica para o receptor B1 tem regiões de ligação para NF κ B na sua região promotora, conseqüentemente a ativação do NF κ B induz a sua própria expressão (Schanstra et al., 1998). Esta retro-alimentação positiva não acontece somente via NF κ B, mas também por outras vias de sinalização, como PLC/PKC, PI3K/AKT e MAPKs, desde que induzam a translocação para o núcleo de um dos três fatores de transcrição que se ligam a região promotora do gene do receptor B1: CREB, AP1 e NF κ B (figura 6). Se observarmos que o receptor B2 também induz translocação de

NFκB e AP1 para o núcleo, vemos que a ativação do receptor B2 também contribui diretamente para a indução da expressão do receptor B1. Neste contexto observamos que em

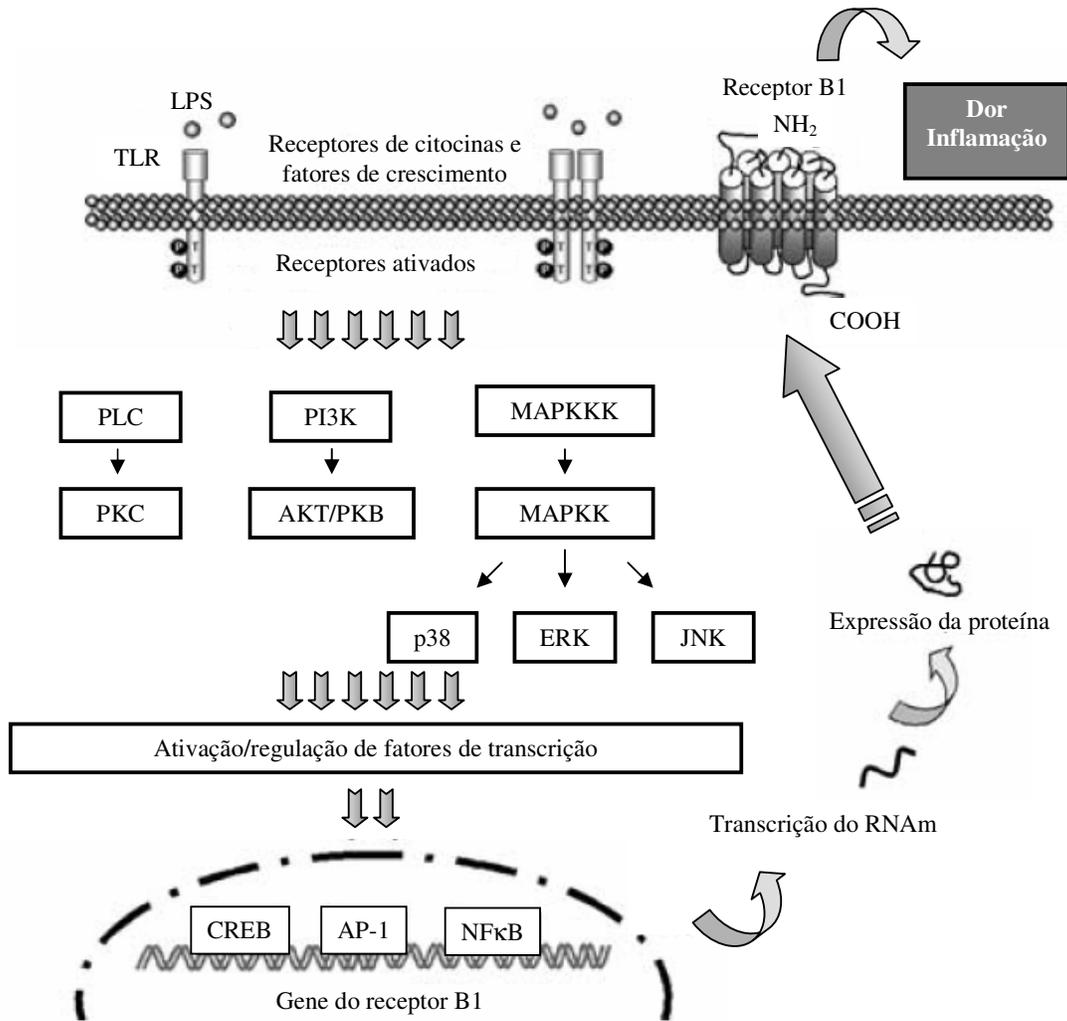


Figura 6: Representação dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do receptor B1. Ativação de receptores de citocinas, receptores do tipo Toll ou mesmo dos próprios receptores B2 e B1 do SCC conseguem ativar muitas vias de sinalização, incluindo PKC, PI3K e MAPK que regulam a ativação e translocação para o núcleo dos fatores de transcrição CREB, AP-1 e NFκB que se ligam a região promotora do gene do receptor B1 induzindo sua expressão. AP-1, proteína ativadora 1; AKT/PKB, proteína quinase B; CREB, elemento ligador responsivo a AMPcíclico; ERK, quinase regulada por sinais extra-celulares; JNK, quinase c-jun NH₂-terminal; MAPKKK, proteína quinase da quinase quinase ativada por mitógenos ; MAPKK, proteína quinase da quinase regulada por mitógenos; NFκB, fator nuclear κB; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinase; PLC, fosfolipase C; PKC, proteína quinase C; TLR, receptor do tipo Toll (Adaptado de Calixto et al., 2004).

um grande número de situações o receptor B2 medeia a resposta inicial, mas logo sofre dessensibilização e é substituído pelo receptor B1 que é quem faz uma resposta tardia, mas mais duradoura.

Uma vez ativado o receptor B1 participa da resposta inflamatória através da indução da expressão de citocinas, liberação de óxido nítrico e ativação de vias que levam a produção de mediadores inflamatórios lipídicos como prostaglandinas, bem como sensibilização e ativação de receptores de dor (Davis et al., 1996, Dray & Perkins, 1993, McLean et al., 2000aeb). Além disto, já foi mostrado que o receptor B1, calicreínas e cininogênio são encontrados na superfície de neutrófilos sinoviais e circulantes, representando uma forma de manter a sinalização por cininas no local da inflamação, além de formar um gradiente quimioatrativo de cininas que recruta mais leucócitos para o local da inflamação (Bockmann & Paegelow, 2000, Bhoola et al., 2001), induzir a quimiotaxia de neutrófilos humanos (Ehrenfeld et al., 2006) e também rolamento, adesão e migração de leucócitos (McLean et al., 2000aeb). Da mesma forma, Pesquero e colaboradores (2000) demonstraram que animais sem o receptor B1 possuem hipoalgesia e resposta inflamatória alterada, evidenciando a importância deste receptor no processo inflamatório (para revisão ver Bhoola et al., 2001, Couture et al., 2001 e Calixto et al., 2004).

1.4. O sistema calicreínas-cininas e o câncer

A relação entre o SCC e câncer ainda é pouco descrita na literatura, mas foi recentemente revista pelo nosso grupo (Costa-Neto et al., 2008 – Anexo). As primeiras conexões entre o sistema e câncer de próstata datam da década de 80, quando uma calicreína então denominada antígeno-específico de próstata (PSA) começou a ser utilizada na clínica como marcador biológico para este tipo de tumor, facilitando o diagnóstico em estágios mais precoces da doença. Atualmente, outras calicreínas vêm sendo utilizadas como marcadores biológicos (Paliouras et al., 2007), muitas ainda relacionadas a tumores de próstata (Veveris-Lowe et al., 2005; Stephan et al., 2006; Gao et al., 2007; Lilja et al., 2007), mas também existem alguns estudos com tumores de ovário (Borgoño et al., 2006; Prezas et al., 2006a; Shan et al., 2007), mama (Yu et al., 1998; Yousef et al., 2000a; Yousef et al., 2000b; Dhar et al., 2001), pulmão (Chee et al., 2008) e tumores intracraniais (Prezas et al., 2006b). Alguns mecanismos pelos quais as calicreínas poderiam agir na tumorigênese começam a ser elucidados e acredita-se que elas possam mediar a proteólise da matriz extracelular e,

conseqüentemente, influenciar os processos de crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase (Borgoño & Diamandis, 2004). Além disto, Veveris-Lowe e colaboradores (2005) mostraram a relação do PSA e da calicreína 4 com a diminuição de E-caderina e a TEM; e Gao e colaboradores (2007) descreveram a participação da calicreína 4 como mediador da interação entre células tumorais e osteoblastos em tumores de próstata metastáticos.

A modulação na expressão de calicreínas em diferentes tipos de tumores e a direta relação do sistema calicreínas-cininas com inflamação, componente fundamental da progressão tumoral (Schwartzburd, 2003; de Marzo et al., 2007; Allavena et al., 2008 e Collota et al., 2009), sugerem que este sistema possa também ter participação na tumorigênese. De fato, alguns trabalhos descrevem a presença dos receptores B1 e B2 de cininas em diferentes tipos de tumores e linhagens tumorais imortalizadas (Hermann et al., 1999; Wu et al., 2002 e Chee et al., 2008), bem como um aumento na expressão desses receptores em células do infiltrado inflamatório de carcinoma de esôfago (Dlamini & Bhoola, 2005).

Existem poucos trabalhos publicados sobre o papel dos receptores do SCC na tumorigênese e a grande maioria deles são estudos com o receptor B2, que parece exercer um importante papel pró-tumoral, uma vez que aumenta a migração de células de tumor de bexiga (Baba & Yamaguchi, 2001). Neste mesmo sentido, trabalhos utilizando animais deficientes na produção do cininogênio, e que por isso não produzem BK endógena, (Ikeda et al., 2004), ou tratados com o antagonista de B2 (Hoe-140) (Ishihara et al., 2001), ou mesmo que receberam antagonista para o receptor B2 como adjuvante na quimioterapia (Stewart et al., 2005) apresentaram significativa redução do número de vasos e do tamanho do tumor. Corroborando estes dados, em um estudo *in vitro* também utilizando antagonista do receptor B2, Chan e colaboradores (2002) mostraram inibição do crescimento de células de tumor de pulmão e, as doses utilizadas não tinham efeito sobre células pulmonares normais. Além disto, Greco e colaboradores (2004) mostraram que a BK, via receptor B2, ativa vias mitogênicas em tumores de mama e um ano mais tarde mostraram que efetivamente o estímulo com BK induz proliferação em cultura primária de tumores de mama humanos (Greco et al., 2005).

Com relação ao papel das cininas na próstata, onde primeiro se descobriu a relação entre SCC e câncer, sabe-se que o estímulo do tecido normal com BK induz proliferação via ativação de ERK 1/2 (Srinivasan et al., 2004), no entanto, quando trata-se de células neoplásicas, a conversa cruzada entre os receptores B1 e B2 parece ser fundamental para a sua proliferação (Barki-Harrington et al., 2003). Além disto, Taub e colaboradores (2003) mostraram que enquanto o receptor B2 é expresso constitutivamente em tecidos neoplásicos e

normais, o receptor B1 é expresso somente em lesões malignas e que uma vez estimulado, o receptor B1 induz crescimento celular, migração e invasão de células PC3, que são de tumores de próstata independente de andrógeno. Corroborando os achados de Taub e colaboradores em 2003, Molina e colaboradores (2009) também mostraram que a ativação do receptor B1 contribui para o desenvolvimento tumoral em células de câncer de mama dependentes de estrógeno, uma vez que estimulam a proliferação destas células via ativação da via de sinalização celular que culmina na fosforilação de ERK 1/2.

Apesar do aparente efeito pró-tumoral do receptor B2, existem alguns estudos já em fase clínica utilizando agonistas sintéticos de B2 como adjuvantes na quimioterapia. Estes estudos se baseiam nas propriedades vasodilatadoras do receptor B2 e no aumento da expressão deste receptor em células endoteliais dos vasos que irrigam os tumores, assim sendo a co-administração de um quimio-terápico e do agonista do receptor B2 auxiliariam na chegada preferencial da droga anti-neoplásica nas regiões tumorais (pela maior vasodilatação) do que em tecidos normais (onde há menor expressão do receptor B2) (Liu et al., 2008; Li-Juan et al., 2009 e Wang et al., 2009). Muitos destes estudos são feitos em tumores cerebrais onde a barreira-hemato-encefálica impõe uma importante dificuldade para os tratamentos quimio-terápicos e muitos tumores não são sensíveis à radioterapia (Matsukado et al., 1998; Easton et al., 2002 ; Prados et al., 2003 ; Packer et al., 2005; Warren et al., 2006).

Com respeito a melanomas, não existe até o momento nenhum estudo mostrando se o desenvolvimento desta patologia conta com a participação de componentes do SCC, embora alguns estudos utilizem modelos de melanoma murino para investigar se o SCC exerce influência sobre a secreção e expressão de endotelina-1 (Andoh et al., 2009) e para estudar o papel dos receptores B1 e B2 na dor causada pelo câncer (Fujita et al., 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a participação do sistema caliceínas-cininas no processo de desenvolvimento e progressão tumoral utilizando modelo de melanoma murino.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o modelo celular de estudo quanto ao padrão de expressão de componentes do SCC relevantes no estudo;
- Padronizar o modelo de melanoma *in vivo* no laboratório;
- Investigar a expressão do receptor B1 em diferentes estágios da progressão tumoral;
- Averiguar se a estimulação do receptor B1 altera a agressividade e propriedades tumorigênicas das células de melanoma;
- Avaliar possíveis mecanismos moleculares que auxiliem a compreender de que forma a ativação de B1 altera a agressividade das células de melanoma;
- Investigar se a estimulação do receptor B1 influencia na habilidade das células de melanoma em fazer metástase, bem como investigar se a estimulação do receptor B1 se faz importante em alguns pontos cruciais para o estabelecimento da metástase, tais como: migração celular e invasão.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

O agonista do receptor B1, a DABK, foi comprado da Sigma e o antagonista do receptor B1, a DLBK foi sintetizado utilizando a estratégia FMOC (Chan & White, 2003), purificada em HPLC utilizando uma coluna C-18 e uma pequena alíquota sofreu hidrólise ácida (Liu & Boykins, 1989) para que tivesse seu conteúdo de aminoácidos avaliado em analisador de aminoácidos automático (Spackman et al., 1958). Posteriormente o peptídeo foi validado em modelo experimental de contração de aorta de coelho (Regoli et al., 1977). A síntese do peptídeo, a purificação e análise da sequência de aminoácidos foram feitas em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) com o auxílio do mestre Felipe Roberti Teixeira. A validação do antagonista foi realizada em colaboração com o laboratório da Prof. Dr. Maria Cristina de Oliveira Salgado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP).

Todos os experimentos realizados utilizando animais foram previamente aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (protocolo CEUA 025-2007).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de células

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizadas as linhagens B16/F10, Melan-A (Ma) e Tm5, sendo as últimas duas gentilmente cedidas pela Prof. Dr. Miriam Jasiulionis da UNIFESP. As características e forma de cultivo das mesmas estão descritas nos itens abaixo:

3.2.1.1. Linhagem Melan-a

A linhagem não tumorigênica de melanócito murino Melan-a (*American type culture collection* - ATCC) foi cultivada em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com: 1,5 g/l de NaHCO₃, 4,5 g/l de glicose, 2,38 g/l de HEPES, SFB 5%, 10 µg/mL de gentamicina e 200 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Quando confluentes, as células eram lavadas com PBS e descoladas da garrafa com uma solução de PBS/EDTA de 10 mM. A suspensão celular era centrifugada a 400 g e o precipitado ressuspensionado em meio de cultura. Dez por cento das células eram então

recolocadas em cultura para manutenção da linhagem e o restante utilizado em experimentos ou descartado. Cada vez que as células eram descoladas, consideramos uma passagem. Para os experimentos, foram utilizadas células entre as passagens 15 e 40.

3.2.1.2. Linhagem Tm5

Esta linhagem foi desenvolvida pela Prof. Miriam Jasiulionis a partir da linhagem Melan-a, através de ciclos sequenciais de cultivo em condições que inviabilizam a adesão das células (placas recobertas por lâmina de agarose 1%). Desta forma foi possível selecionar clones viáveis, resistentes a “anoikis” (que sobrevivem à morte celular induzida pela falta de adesão) e com características tumorigênicas (Oba-Shinjo et al., 2006). A linhagem Tm5 foi mantida nas mesmas condições que a Melan-a, mas sem adição de PMA no meio de cultura.

3.2.1.3. Linhagem B16/F10

A linhagem de melanoma murino B16/F10 (ATCC) foi cultivada da mesma forma descrita no item 3.2.1.1., mas no meio de cultura HAM/F10 (Gibco) suplementado com: 1,2 g/l de bicarbonato de sódio, SFB 10% e 10 µg/mL de gentamicina.

3.2.3. Análise da expressão de RNA mensageiro por PCR

3.2.3.1. Extração de RNA por Trizol

A extração do RNA total foi realizada seguindo o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen), que consiste em adicionar 1 ml de Trizol por amostra e homogenizar bem para que o reagente consiga atingir toda a sua superfície. Este protocolo foi utilizado para extrair RNA de dois tipos de amostras, o primeiro de células em cultura, onde o meio de cultura foi completamente removido e o Trizol foi adicionado diretamente sobre a placa de cultura. O segundo de amostras de tecidos (tumores retirados dos animais). Os tumores foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido após excisão e previamente a adição do Trizol, foi realizado um passo de pulverização destes tecidos para permitir que o Trizol atinja homogeneamente toda a amostra, aumentando a eficiência da extração. Esta etapa de pulverização foi a retirada do tecido do nitrogênio líquido e imediatamente, com auxílio de um martelo protegido com papel alumínio tratado com RNase away (Invitrogen), pulverizá-

lo por pressão. Com auxílio de uma espátula, alguns fragmentos do tecido pulverizado foram transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi adicionado 1 ml do reagente Trizol.

Seguindo o protocolo do fabricante, foram adicionados 200 µL de clorofórmio por tubo, seguido de vigorosa agitação. As amostras foram então submetidas à centrifugação de 12.000 g por 15 min (4°C) e a fase aquosa (onde está o RNA total) foi isolada em novos tubos. A esta fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. Os tubos foram incubados 10 min a temperatura ambiente e foi feita uma nova centrifugação a 12.000 g por 10 min (4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com uma solução de etanol 75%. Uma nova centrifugação foi realizada, mas agora a 7.500 g por 5 min (4°C), e o precipitado, foi deixado à temperatura ambiente até que estivesse completamente seco, para então ser ressuspensão em água mili-Q tratada com Dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) autoclavada e incubado 10 min a 55°C. Todas as amostras de RNA foram mantidas à -80°C.

3.2.3.2. Tratamento das amostras com DNase

As amostras de RNA total a serem utilizadas para síntese de DNA complementar (cDNA) foram submetidas ao tratamento com DNase para degradar qualquer possível contaminação com DNA genômico.

Para a realização da reação de degradação de DNA foram colocados em um tubo de centrífuga de 1,5 mL: 1 µL de solução contendo 1 µg de RNA total, 1 µL de tampão DNase I (10x), 1 µL da enzima DNase I Amplification Grade 0,1 U/µL (Invitrogen) e água milli-Q /DEPC (0,1%) para o volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após incubação, cada amostra recebeu 1 µL de EDTA (25 mM) e subsequente incubação por 10 min a 65°C para inativar a enzima.

Antes de utilizar estas amostras para a síntese de cDNA, um controle da eficácia de degradação do DNA genômico foi feito, através da realização de um reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos para um gene de controle endógeno (ciclofilina B, tabela 1). Neste caso, somente haverá amplificação dos fragmentos se a etapa de degradação do DNA genômico não foi bem sucedida. Como controle da reação de PCR, um cDNA previamente testado foi utilizado. Todas as amostras que não apresentaram amplificação foram consideradas aptas à realização da transcrição reversa e aquelas que apresentaram amplificação foram descartadas e novo tratamento com DNase foi realizado para estas amostras.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de anelamento (Tm) dos *primers* utilizados nas reações de PCR semi-quantitativo para os genes analisados. CPM – carboxipeptidase M.

Gene	Fragmento (pb)	Tm (°C)	Direto (5'-3')	Reverso (5'-3')
Ciclofilina B	300	55	AAA GAC TTC ATG ATC CAG GG	TGA CAT CCT TCA GTG GCT TG
B₁	291	55	CAC GAA GCT TGG CAC TTT GT	GTC TGT GAG CTC CTT CCA GAA
B₂	341	56	GCA CTG TGG CCG AGA TCT A	GCT GTA TTC CCT CAT GGT CCT
AT₁	191	55	AAC AAC TGC CTG AAC CCT CT	TCA GAA CAA GAC GCA GGC T
AT₂	341	55	TCT GTC TCA AAG AAG GAA TCC C	CCA ACA CAA CAG CAG CTG C
CPM	141	55	AAA CAT TTG TCC TCT CTG CGA	TGT AGG CCA GGT GTT GGA AA

3.2.3.3. Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima Improm II (Promega) segundo o protocolo do fabricante, que consiste em adicionar ao mesmo tubo onde foi feita a reação de degradação do DNA genômico, 1 µL de Oligo-dT (0,5 µg/µL), incubá-las por 5 min a 70°C para que o Oligo-dT pareie com a cauda poli-A dos RNAs mensageiros e desta forma sirva como *primer* para a enzima transcriptase reversa. Cada tubo recebeu 4 µL de tampão (5X), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL da mistura de dNTP em água DEPC (10 mM) e 1 µL de enzima (1 U/µL). A reação foi incubada por 5 min a temperatura ambiente e depois por 60 min a 42°C, que é a temperatura ótima de funcionamento da enzima, permitindo que ela sintetizasse a fita de DNA complementar ao molde do RNA. Depois de transcorrida a incubação a 42°C, os tubos contendo os cDNA foram colocados a 70°C para inativação da enzima e guardados a -20°C.

3.2.3.4. Desenho e padronização dos *primers* específicos para PCR

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sempre optando por sequências de até 20 pb para que amplificassem uma região de até 500 pb para PCR semi-quantitativo e de até 350 pb para PCR quantitativo. Depois de obtidas as sequências, os *primers* foram alinhados contra todo o genoma murino para testar a sua especificidade. Aquelas sequências que se mostraram específicas apenas para o gene de interesse e que estivessem localizadas em *exons* diferentes

foram escolhidas. Todos os *primers* foram sintetizados pela Prodimol e mantidos a -20°C em soluções de $100\ \mu\text{M}$ até o momento da utilização.

Antes de começar as análises, os *primers* passaram por um processo de validação e otimização das condições a serem utilizadas. Para o PCR semi-quantitativo, uma reação inicial a 55°C com 40 ciclos foi realizada e aqueles pares *primers* cujas reações de amplificação resultaram em apenas uma banda do tamanho esperado passaram para a segunda etapa de definição do número de ciclos a serem utilizados. Os que foram reprovados nesta etapa pela presença de bandas de amplificação inespecíficas foram novamente testados com temperaturas de anelamento superiores (entre $58-60^{\circ}\text{C}$). Os *primers* que foram reprovados por ausência de amplificação foram descartados e novas sequências desenhadas. Na segunda etapa de padronização, o número de ciclos a serem utilizados foi selecionado para que se obtivesse produtos de PCR na sua fase exponencial de amplificação e, desta forma fosse possível observar diferenças de expressão entre as amostras. Para isto, uma reação de PCR em um volume final de $50\ \mu\text{l}$ foi feita e a reação foi parada nos ciclos 28, 30, 32, 35, 38 e 40 para a retirada de uma alíquota de $7\ \mu\text{l}$ do produto de PCR em cada um dos ciclos. Os produtos de PCR da mesma reação nas diferentes ciclagens foram aplicados lado a lado em um mesmo gel de agarose 1% para que a intensidade das bandas pudesse ser comparada diretamente e assim nos permitisse escolher o número de ciclos necessários para que trabalhássemos na fase exponencial da reação.

Para as análises de PCR quantitativo, a primeira reação de PCR foi feita acrescentando concentrações conhecidas de uma mesma amostra, normalmente as diluições de 1/5, 1/50 e 1/500 foram utilizadas. O CT (*cycle threshold*) obtido em cada uma das diluições foi plotado em uma regressão linear que permitisse observar a existência de correlação entre a quantidade de amostra colocada e o CT obtido. Em outras palavras, para determinar se éramos capazes de identificar que quando reduzíamos a quantidade de amostra à metade, o CT aumentaria em 1. Foram aceitas apenas regressões com $r \geq 0,98$. Além disto, a eficiência de reação destes *primers* foi avaliada a partir da equação da reta ($y = ax + b$) obtida do mesmo gráfico de regressão linear, mais especificamente a partir do valor de **a** (coeficiente de x) que indica a inclinação desta reta. Foram aceitos primers que obtiveram valores de **a** entre -3,32 e -4, que representam entre 100 e 78% de eficiência de reação, segundo o manual da *Applied Biosystems*. Esta etapa de validação dos *primers* que permite selecionar sequências de nucleotídeos que sejam capazes de gerar reações de amplificação em uma faixa semelhante de eficiência é pré-requisito para analisar os dados de PCR em tempo real pelo método de $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.2.3.5. PCR semi-quantitativo

Foi utilizado o protocolo da enzima Platinum Taq polimerase (Invitrogen) em um volume total de 25 μL . Cada reação recebeu: 2,5 μL de tampão para PCR (10X), 0,75 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de dNTP (10 μM), 0,5 μL do oligonucleotídeo senso e 0,5 μL do anti-senso e 0,25 μL da enzima Platinum Taq Polimerase (5 U/ μL). Uma vez pronta a reação, os tubos foram colocados no termociclador, onde foram submetidos por 2 min a 94°C, o que permite a desnaturação das fitas de DNA. Depois de separadas as fitas, o termociclador submete as amostras a ciclos subsequentes de amplificação. Estes ciclos consistem em 3 etapas de 1 min, a primeira a 94°C para a separação das fitas, a segunda de 55°C (ou mais, conforme estabelecido na etapa de padronização), para que os primers pareiem com a região da fita ao qual possuem complementaridade, e a terceira de 72°C que é a temperatura ótima de funcionamento da polimerase, que vai estender a fita de DNA. O número de ciclos realizados depende do gene de interesse e foi padronizado conforme descrito no item anterior. As temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados utilizados para cada um dos genes de interesse estão mostrados na tabela 1.

3.2.3.6. PCR em tempo real

Para as análises de PCR em tempo real, foram utilizados: os *primers* descritos na tabela 2, o reagente Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG com ROX (Invitrogen) e o equipamento *ABI Prism 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems). Para as reações cujos primers apresentavam eficiência de reação dentro da faixa aceita no *software* da Applied Biosystems, as análises relativas ao controle endógeno (ciclofilina B) foram feitas pelo método do $2(-\Delta\Delta\text{C(T)})$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para os oligonucleotídeos cuja eficiência de reação não fosse aceita, mas que apresentassem uma regressão satisfatória e que atendessem a premissa de $(a \text{ do gene alvo}) / (a \text{ do controle endógeno}) < 0,1$, onde a é o coeficiente de X na equação: $y = aX + b$; foram aplicadas correções matemáticas ao método de Livak & Schmittgen (2001) feitas por Zhu e colaboradores (2003).

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado (pb) e temperatura de anelamento (T_m) dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real para os genes analisados. VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial; TGF β - Fator de crescimento transformador beta; IFN γ - Interferon gamma.

Gene	Fragmento (pb)	T_m ($^{\circ}C$)	Direto (5'-3')	Reverso (5'-3')
Ciclofilina B	300	55	AAA GAC TTC ATG ATC CAG GG	TGA CAT CCT TCA GTG GCT TG
B₁	72	55	CCA GGG TTT GTC ATC ACT GTC TG	GCA AAA GGA AGA AGG ACA GGA CTA A
E-caderina	117	56	GCC AAT CCT GAT GAA ATT GGA A	CAG AAC CAC TGC CCT CGT AAT C
VEGF	77	55	ACT GGA CCC TGG CTT TAC TG	TCT GCT CTC CTT CTG TCG TG
TGFβ	94	55	GCA ACA TGT GGA ACT CTA CCA G	CAG CCA CTC AGG CGT ATC A
IFNγ	179	55	CAG CAA CAG AAG GCG AAA AAG G	AAT CTC TTC CCC ACC CCG AAT CA

3.2.4. Ensaio de mobilização de cálcio intracelular

O íon cálcio é um importante mensageiro e por isso os seus níveis intracelulares são fortemente regulados. A sinalização através do cálcio acontece através da elevação rápida e localizada da concentração deste íon em compartimentos citoplasmáticos da célula e conseqüente ligação e modulação da atividade de muitas proteínas. A sonda fluorescente Fluo3/AM é um quelante do íon cálcio que possui um fluoróforo. Uma vez excitado com laser de argônio a 488 nm, emite fluorescência no comprimento de onda de 526 nm, mas isso só ocorre quando o quelante está ligado ao íon Ca^{+2} .

A sonda Fluo3 sozinha não consegue passar a membrana das células, por isso é feita a ligação de um grupo penta-acetoxi-metil (AM), que é pequeno e lipossolúvel e por isso permite a passagem da sonda pela membrana plasmática das células (Kao et al., 1989). Uma vez dentro das células os grupos acetoxi-metil são clivados por esterases endógenas, liberando assim a forma ligante de cálcio.

O ensaio é realizado em microscópio confocal, que permite a captação da fluorescência emitida pela sonda e identificação e quantificação da variação da emissão de fluorescência pela sonda na célula e assim é possível obter um monitoramento contínuo das alterações no nível de cálcio citoplasmático.

Para a realização dos experimentos, 3×10^5 células foram semeadas em lamínulas de vidro de 42 mm de diâmetro, previamente tratadas com poli-L-lisina e permaneceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}C$ por 24-48h. Transcorrido o período para

adesão, as células foram carregadas com Fluo-3/AM (1 μ M) durante 30 min, a 37°C. Posteriormente, as lamínulas foram montadas em uma câmara onde adicionamos 1 ml de solução tampão (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 1 mM, glicose 2 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7.2). As células foram focalizadas no microscópio confocal com aumento de 63X e a fluorescência emitida foi monitorada.

Depois de detectada fluorescência constante, adicionamos DABK e/ou DLBK em uma concentração final de 1 e 10 μ M, respectivamente. A variação da fluorescência foi observada e assim, o aumento da intensidade de fluorescência indicou aumento na concentração citoplasmática de Ca⁺².

3.2.5. Western Blotting

Para a realização dos ensaios de *western blotting*, 3x10⁵ células Tm5 foram semeadas em placas de 6 poços em meio RPMI, onde permaneceram por 24 h para adesão. Transcorrido este período, o meio foi trocado e adicionou-se meio RPMI suplementado com SFB 0,5% por 24 h. No momento do experimento, as células receberam meio sem SFB para o estímulo. O ensaio foi realizado a 37°C e a concentração final de DABK foi de 1 μ M.

Depois da incubação com o agonista do receptor B1, as placas foram imediatamente colocadas em gelo, o meio de cultura foi retirado e 100 μ L de solução contendo a proporção de 5:1 de tampão de lise e tampão de amostra gelado foi acrescentado. O tampão de lise utilizado foi feito com Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1% (v/v), Nonidet P-40 1% (v/v) e o tampão de amostra continha 100 mM Tris, pH 6,8; SDS 4% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 20% (v/v) e 200 mM DTT. O lisado celular foi recuperado, fervido por 10 min e centrifugado por 15 min, a 4°C a 20.000 g. 30 μ L da solução de proteínas totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e esta foi bloqueada por 1 h com uma solução de TTBS (0,05 M Tris-HCl, pH7,4; 0,5 M NaCl e Tween 20 0,1%) contendo albumina bovina 0,1% (p/v) (BSA). Depois de bloqueadas, as membranas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente com os anticorpos contra ERK total – tERK (Santa Cruz) ou ERK fosforilada - pERK (Santa Cruz), ambos diluídos 1:1000, e por mais 1 h a temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase anti-coelho (para ERKt) e anti-camundongo (para pERK), ambos diluídos 1:2500. As bandas foram reveladas utilizando o kit ECL (Santa Cruz), e o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. Os

valores densitométricos correspondentes às bandas da pERK foram normalizados pela tERK e plotados utilizando-se o programa Graph-Pad Prism 4 (Graph-Pad Prism).

3.2.6. Ensaio de viabilidade celular – MTT

Utilizamos o ensaio de MTT (Sigma) como medida de viabilidade celular. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) é um sal que na sua forma oxidada possui coloração amarelada. Quando colocado em contato com células que possuam mitocôndrias competentes, este sal é reduzido e passa a ter uma coloração violeta. A intensidade da coloração violeta permite inferir a proporção de mitocôndrias competentes das células e este valor, por sua vez, é proporcional ao número de células viáveis (Figura 7).

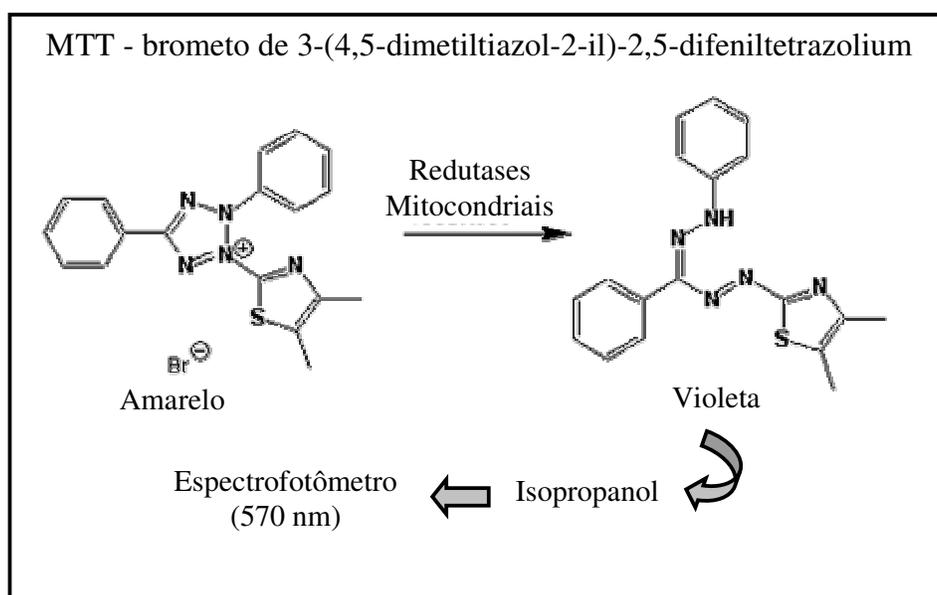


Figura 7: Esquema do funcionamento da técnica de MTT para detectar viabilidade celular.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado apenas com a linhagem tumoral Tm5 e o protocolo consistiu em semear em placa de 48 poços, 5×10^3 células por poço em um volume de 500 μL de meio. Estas placas foram mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 24 h para que as células aderissem na superfície da placa. Transcorrido este período, o meio foi trocado e os diferentes tratamentos foram administrados. As células foram incubadas por 24 ou 48 h e depois receberam 50 μL de uma solução de 5 mg/mL de MTT em PBS 1X por poço. O MTT permaneceu em contato com as células por 3 h na incubadora e depois o meio foi removido de forma cuidadosa para que as células não se soltassem. Foram adicionados 200 μL de isopropanol e então as placas foram incubadas a temperatura ambiente

e sob leve agitação por 15 min ou até que a coloração fosse completamente solubilizada/homogenizada, para posterior leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

3.2.7. Modelo de melanoma *in vivo*

Camundongos C57/BL6 pesando aproximadamente 25 g receberam injeção subcutânea na região dorsal próxima a cabeça de 2×10^5 células de melanoma das linhagens Tm5 e B16/F10 em 100 μ l de PBS (figura 8). Os animais foram monitorados diariamente até o dia do sacrifício para a medida do peso e detecção do primeiro nódulo palpável. A partir da detecção deste primeiro nódulo, o tumor foi mensurado diariamente com o auxílio de um paquímetro e o volume da massa tumoral foi calculado de acordo com a fórmula $V=(D \times d^2)/2$; onde V é o volume do tumor, D é o diâmetro maior do tumor e d o diâmetro menor do tumor (Jasiulionis et al., 2006). Animais cujo tumor atingisse tamanho igual ou superior a 3000 mm^3 sofreram eutanásia.

A eutanásia foi feita com os animais anestesiados (quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg) por decaptação e imediatamente após a morte dos animais as amostras de tumor foram retiradas e congeladas à -80°C para análises moleculares ou fixadas em formol 37% tamponado para análises histopatológicas.

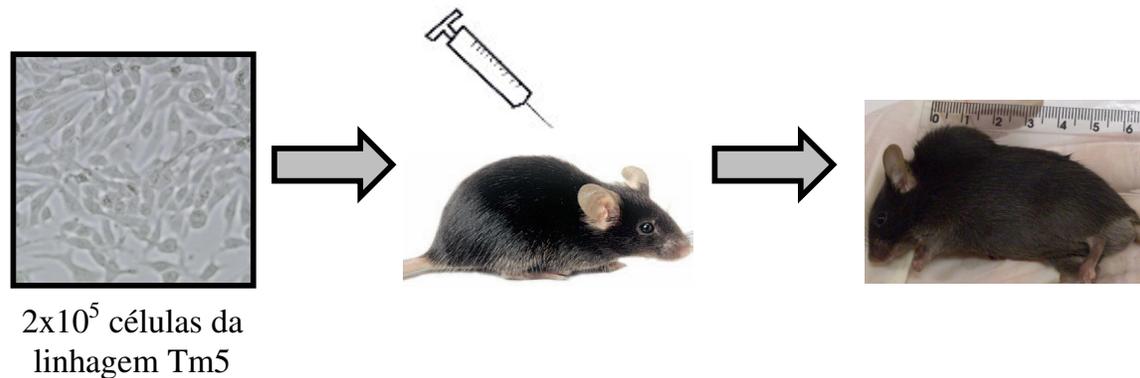


Figura 8: Representação esquemática da indução de melanoma em camundongos C57/BL6 a partir da injeção subcutânea de células tumorais no dorso destes animais.

3.2.8. Delineamento experimental de pré-estímulo das células tumorais *in vitro* e subsequente inóculo das células *in vivo*

Conforme observamos na figura 9, as células tumorais foram semeadas em placas de cultura de 100 mm² e deixadas por 24-48h até que atingissem uma confluência de 80%, quando eram então lavadas uma vez com PBS e estimuladas com DABK 1 µM em meio sem soro por 24 h. Transcorrido o período de 24 h em contato com o agonista do receptor B1, tanto as células controle (sem estímulo) quanto as células “re-programadas” após ativação do receptor B1 foram lavadas com PBS, descoladas da placa com PBS/EDTA e as soluções de inóculo foram preparadas contendo 2x10⁵ células em 100 µl. Os animais foram inoculados e monitorados diariamente com pesagem e avaliação dos tumores por 20 – 30 dias, quando sofreram eutanásia e as amostras tumorais foram coletadas. Quando necessário, amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca com os animais anestesiados.

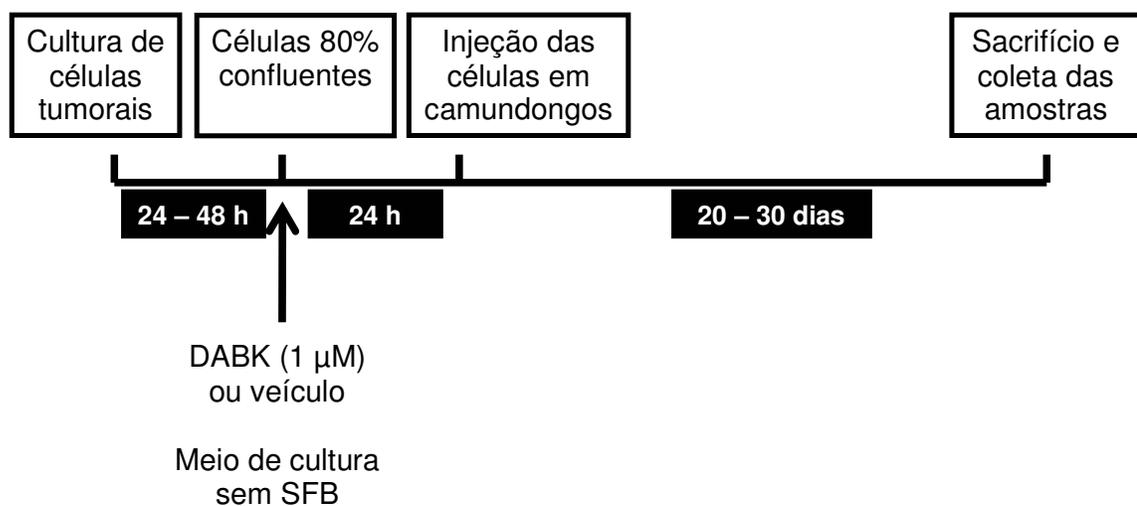


Figura 9: Representação esquemática do desenho experimental de pré-estímulo das células Tm5. DABK – desArg⁹-bradicinina; SFB – soro fetal bovino.

3.2.9. Histologia

As análises histopatológicas foram feitas em colaboração com o laboratório da Prof. Dra. Simone Gusmão Ramos do Departamento de Patologia da FMRP-USP, a partir de amostras de tumor que foram coletadas preservando todo o microambiente ao seu redor. Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em formol tamponado por 24-48 h

antes de dar início ao processamento histológico. As amostras foram em um primeiro momento desidratadas seguindo a seguinte bateria de incubações:

1. Álcool 80% por 30min;
2. Álcool 95% por 30min;
3. Álcool 100% por 30min;
4. Álcool 100% por 40min;
5. Álcool 100% por 40min;
6. Álcool 100% por 30min;
7. Xilol I por 30min;
8. Xilol II por 30min;
9. Xilol III por 20min.

Após a terceira passagem em xilol, as amostras foram deixadas em repouso para a eliminação do xilol restante e logo passaram por vários passos para a inclusão em parafina:

1. Parafina I: 20min;
2. Parafina II: 20min;
3. Parafina III: 20min.

Os blocos de parafina foram deixados em repouso a -20°C por 24 h, para assegurar sua solidificação. Transcorrido este período, os mesmos foram cortados em micrótomo de Minot e os cortes foram fixados em laminas de vidro.

Para coloração dos cortes foi utilizado o protocolo de Hematoxilina-Eosina (HE) desidratadas seguindo outra bateria de incubações:

1. Xilol I por 15min;
2. Xilol II por 15min;
3. Xilol III por 10min;
4. Álcool 100% somente uma lavagem;
5. Álcool 95% somente uma lavagem;
6. Álcool 80% somente uma lavagem;
7. Água corrente somente uma lavagem;
8. Hematoxilina filtrada por 3-5min;
9. Álcool ácido de 1-3 lavagens;
10. Solução de Scott por 3min;
11. Álcool 80% 3 lavagens;
12. Álcool 95% somente uma lavagem;

13. Eosina por 30 - 60 segundos;
14. Álcool 80% somente uma lavagem;
15. Álcool 85% somente uma lavagem;
16. Álcool 100% I somente uma lavagem;
17. Álcool 100% II somente uma lavagem;
18. Álcool 100% III somente uma lavagem;
19. Álcool/xilol somente uma lavagem;
20. Xilol I somente uma lavagem;
21. Xilol II somente uma lavagem;
22. Xilol III somente uma lavagem;
23. Montagem das lâminas acrescentando-se Bálsamo do Canadá para fixação das lamínulas.

Depois de secas, as lâminas foram avaliadas pela patologista para identificação dos diferentes tecidos e componentes celulares do microambiente tumoral. Para as análises quantitativas de células em mitose e vasos, 10 campos diferentes de grande aumento ($A=10\times 40$) de cada amostra foram avaliados e uma média entre os valores obtidos entre os campos foi feita. Nos casos onde o tamanho do tumor era muito reduzido e não haviam 10 campos diferentes disponíveis para contagem, foram contados tantos campos quanto possíveis e a média foi feita entre o número de campos disponíveis. Para as análises quantitativas do infiltrado inflamatório peri-tumoral, foram escolhidos e contados 10 campos diferentes da região peri-tumoral também em grande aumento ($A= 10\times 40$), baseado na morfologia de cada um dos tipos celulares, o número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos de cada um dos campos. As células em divisão e os vasos também foram quantificados de forma semelhante, mas foram selecionados 10 campos de grande aumento localizados na massa tumoral. O dado de infiltrado inflamatório total foi obtido pela plotagem conjunta dos macrófagos, neutrófilos e linfócitos por campo de grande aumento ($A=10\times 40$).

3.2.10. Ensaio de colonização pulmonar por injeção de células tumorais na veia caudal de camundogos

O ensaio de metástase pulmonar foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Luiz de Lucca. Para realização do ensaio pulmonar a partir da injeção de células tumorais pela veia caudal foi utilizado um desenho experimental bastante semelhante ao mostrado na figura 9, no qual foram semeadas células da linhagem Tm5 em placas de 100 mm^2 . As células permaneceram em cultura por 24-48 h até que atingissem confluência de

80%. Ao atingirem a confluência correta, as células foram lavadas uma vez com PBS e receberam estímulo com DABK 1 μ M em meio sem SFB no grupo tratado ou meio sem SFB no grupo controle. As células permaneceram com o estímulo por 24 h, quando foram então lavadas uma vez com PBS e descoladas com PBS/EDTA para preparação do inóculo. Cerca de 10^5 células Tm5 (em 100 μ l de PBS) foram inoculadas na veia caudal de camundongos C57/BL6 de aproximadamente 25 g. Os animais foram pesados diariamente e sofreram eutanásia 10 dias após a injeção. Os pulmões foram retirados e analisados com auxílio de uma lupa para detecção e contagem do número de colônias de coloração marrom, típicas de metástase pulmonar.

3.2.11. Ensaio de migração celular

Para o ensaio de migração celular, foram semeadas 3×10^5 células da linhagem B16/F10 por poço em placa de 12 poços. As células permaneceram em cultura por 48 h até formarem uma monocamada 100% confluenta. As células foram privadas de soro por 24 h e então, utilizando uma ponteira de 10 μ l, foi feita uma lesão na monocamada em forma de cruz (\oplus). Após fazer a lesão, os poços foram lavados de 2-3 vezes com PBS, para completa remoção das células que se soltaram, receberam novamente meio de cultura sem soro e foram fotografados em microscópio invertido de contraste de fase (este foi considerado o tempo zero). Foram retiradas 5 fotos por poço de acordo com o esquema mostrado na figura 10. Depois de fotografadas, as células voltaram para incubadora à 37°C e atmosfera de 5% CO₂ por 24 h, quando foram novamente fotografadas nos mesmos campos.

Todas as fotos foram quantificadas para se estabelecer a porcentagem de fechamento (cicatrização) da lesão e para saber o número de “free migrating cells”, ou seja, aquelas células que perdem a adesão e migram sozinhas para a zona da lesão, independentemente da chamada de frente de migração, que são as células da borda da lesão que começam a migrar conjuntamente para re-estabelecer a monocamada (Meigs et al., 2002).



Figura 10: Esquema das fotos retiradas sempre nos mesmos campos nos tempos: 0 e 24h após a lesão, para quantificação da migração celular.

3.2.12. Ensaio de ELISA para detecção de citocinas

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL da solução de anticorpo monoclonal diluído em PBS na concentração final indicada pelo fabricante para cada uma das citocinas avaliadas. Após incubação por 14-16 h a 4°C as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/TWEEN 0,05% (pH 7,2), bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%) e incubadas por 1-2 h a temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, foram depositados 100 µL de cada uma das amostras seguido de uma incubação de 16-24 h a 4°C. As placas foram lavadas novamente e foi adicionado o anticorpo secundário na concentração recomendada pelo fabricante para cada citocina, seguido de 2 h de incubação a temperatura ambiente. O conjugado avidina - biotina-peroxidase diluído 200 vezes foi adicionado após o ciclo de lavagem e foi incubado por 30 min a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato TMB (Tetrametilbenzidine) após procedimento de lavagem. A reação foi finalizada pela adição de 50 µl de ácido sulfúrico 2 N por poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa (*Molecular Devices VersaMax microplate reader*) em 450 e 570 nm. A determinação das concentrações das citocinas foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos nas amostras em relação aos da curva padrão. Todos os reagentes utilizados foram comprados da R&D Systems e utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.13. Ensaio de zimografia para avaliar a atividade das gelatinases MMP2 e 9

O sobrenadante de uma cultura que partiu de 10^5 células Tm5 por poço, estimulada com DABK 1 µM e/ou DLBK 10 µM por 24 h foi coletado, centrifugado a 400 g por 10 min para retirar células e fragmentos celulares e o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C. As amostras foram utilizadas menos de 7 dias após a coleta.

No primeiro dia da zimografia, a solução de gelatina de 1mg/ml em água milli-Q autoclavada foi preparada e levemente aquecida para que fosse obtida uma solução líquida e homogênea. Quando a gelatina ficou pronta, foi mantida aquecida e até a preparação do gel de poliácridamida 10%, que consistiu em acrescentar:

- 2,9 ml água milli-Q
- 3,75 ml Tris-HCl 1M pH 8,8
- 3,32 ml Acrilamida/Bisacrilamida 30%
- 50 µl SDS 20% (v/v)
- 30 µl APS 10% (v/v)
- 100 µl gelatina 1 mg/ml – líquida e homogênea
- 10 µl TEMED

Depois de preparada a solução, essa foi colocada no suporte de montagem do gel (BioRad) e deixada à temperatura ambiente para que polimerizasse por 2-3 h. Depois de polimerizado o gel de separação, iniciou-se a preparação do gel de entrada de 4%, adicionando-se:

- 3,1 ml água milli-Q
- 1,25 ml Tris-HCl 1M pH 6,8
- 650 µl Acrilamida/Bisacrilamida 30%
- 25 µl SDS 20% (v/v)
- 20 µl APS 10% (v/v)
- 15 µl TEMED

O gel de entrada foi colocado sobre o de separação e foi deixado também à temperatura ambiente por 1 h para que polimerizasse. Depois de pronto, o gel foi colocado na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida. A cuba, contendo o gel e o tampão de corrida, foi colocada em um isopor com gelo e foi dado início à preparação das amostras, fazendo 2 soluções a partir de cada amostra: a primeira contendo 20µl da própria amostra mais 4 µl do tampão de amostra sem a presença de nenhum agente redutor (125 mM de Tris-HCl pH 6,8; SDS 6% (v/v); glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (v/v) e água milli-Q suficiente para completar 50 ml; a segunda igual a primeira, mas contendo também 2 µl de uma solução de EDTA 50 mM.

Depois de prontas, as amostras foram aplicadas no gel, de forma que todas as amostras sem EDTA fiquem em um gel juntas e as com EDTA em outro. É fundamental que ambos os géis sejam manipulados ao mesmo tempo e com os mesmos reagentes. A migração

foi feita a 70 V por 3 h sempre com a cuba de eletroforese envolta por gelo para evitar qualquer possível degradação inespecífica da gelatina ao longo da migração.

Quando a migração chegou ao fim, os géis foram lavados rapidamente em água destilada e iniciou-se a etapa de renaturação, com a incubação dos géis em solução de Triton X100 2,5% (v/v) por 1,5 h; sendo que a solução de Triton foi trocada a cada 30 min, para que o SDS, que é um detergente iônico, fosse completamente substituído pelo Triton que é também um detergente, mas não iônico e por isso permite a renaturação das proteínas (esta etapa de renaturação somente é possível porque as pontes dissulfeto das proteínas foram preservadas durante a preparação das amostras e, assim, auxiliam o redobramento correto das proteínas).

Depois de renaturadas as proteínas, o gel foi transferido para uma solução contendo Tris HCl 0,06 M pH 8,0 e CaCl₂ 0,2 M a 37°C por 18-20 h. Esta etapa inclui todas as condições de pH, temperatura e co-fatores necessários a atividade das gelatinases e, portanto, é o momento em que deve ocorrer a degradação específica da gelatina pelas metaloproteases 2 e/ou 9. Para confirmar se a atividade encontrada é mesmo específica, o gel onde as amostras foram preparadas já na presença de EDTA foi incubado com a mesma solução de atividade, mas acrescentamos a ela 2 mM de EDTA. O EDTA é um quelante de íons bivalentes e por isto quela o cálcio do tampão de atividade e, sem ele, as metaloproteases não tem atividade, ou seja, qualquer degradação encontrada no gel incubado com EDTA é inespecífica e não deve ser considerada como atividade de gelatinase.

Transcorrido o período de incubação, o gel foi corado com azul de Commassie (0,5 g de azul de Commassie R250; 100 ml metanol e 100 ml água destilada) sob leve agitação por 30 min e em seguida foi descorado com a solução descorante preparada com 500 ml de metanol, 100 ml de ácido acético e 400 ml de água destilada. Os géis foram mantidos em solução descorante até que as bandas claras (da degradação da gelatina) pudessem ser visualizadas e então as imagens do gel foram capturadas utilizando um aparelho de *scanner*.

3.2.14. Análise da expressão de CD44 por citometria de fluxo

Células da linhagem Tm5, estimuladas ou não com DABK 1 µM por 48 h foram lavadas 1 vez com PBS e descoladas da placa com PBS/EDTA 10 mM. A suspensão de célula foi centrifugada a 400 g por 10 min e imediatamente fixada com paraformaldeído 4% por 10 min. Depois da fixação, outras duas lavagens com PBS foram feitas e as amostras foram conservadas à 4°C até o momento da marcação utilizando anticorpos específicos pra CD44.

Para a marcação, a suspensão de células foi centrifugada a 400 g por 10 min, e o precipitado ressuspense em 100 µl de solução contendo 1:1 (v:v) de meio RPMI e soro para bloquear os sítios onde os anticorpos poderiam ligar-se às células pela sua porção Fc. As células foram deixadas em contato com a solução de bloqueio por 30 min a 4°C e, então, adicionou-se o anticorpo específico para CD44 conjugado ao fluoróforo PE-Cy5 (BD - Bioscience) na diluição de 1:100 feita na própria solução de bloqueio e incubou-se por mais 30 min a 4°C, mas agora protegido da luz. Em um dos tubos foi adicionado o isotipo controle do PE-Cy5 na mesma diluição de 1:100 ao invés do anticorpo contra CD44. Transcorrido o período de incubação, os tubos foram centrifugados mais uma vez a 400 g por 10 min, lavados 1x com PBS/SFB 10% e as células marcadas ressuspendidas em 200 µl de PBS/formol 1% para realizar a aquisição de 5000 – 10000 eventos por amostra no aparelho de FACSCanto. Após a aquisição, os dados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Tree Star Inc, EUA).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização da linhagem Tm5 quanto à expressão de componentes dos sistemas calicreínas-cininas e renina-angiotensina

Na primeira etapa deste trabalho, as linhagens Tm5 (melanoma) e Melan-a (melanócito) foram caracterizadas quanto à expressão dos receptores clássicos, tanto do sistema renina-angiotensina – AT₁ e AT₂ - quanto do sistema calicreínas-cininas – B1 e B2 –, tendo como objetivo observar a possível existência de alguma modulação na expressão destes receptores entre células normais e tumorais. Nesta análise, observou-se que apenas o receptor B1 dos quatro receptores avaliados é expresso nas linhagens e que células tumorais apresentam um discreto aumento na expressão do RNA mensageiro deste receptor quando comparado às normais (figura 11A-D).

A presença apenas do receptor B1 nestas células, levantou a questão a respeito da expressão de enzimas responsáveis pela síntese do agonista do receptor B1, e se esta expressão seria modulada diferentemente entre células normais e tumorais. Para isto, foi realizado RT-PCR para a enzima carboxipeptidase M, uma das enzimas responsáveis por retirar a arginina C-terminal da BK e KD, originando os ligantes preferenciais do receptor B1: desArg⁹-BK e desArg¹⁰-KD, respectivamente. Conforme se observa na figura 11E, existe a expressão de CPM tanto em Ma quanto em Tm5, mas a enzima é mais expressa na linhagem tumoral.

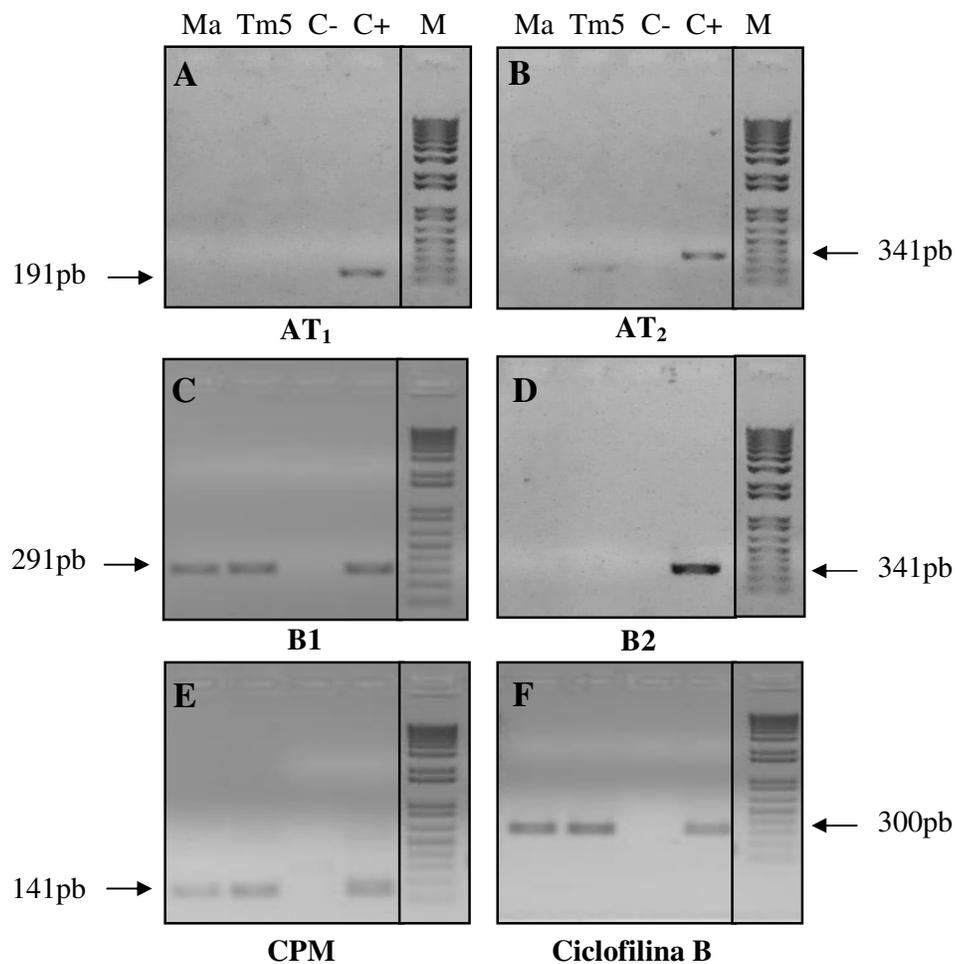


Figura 11: Análise da expressão do RNA mensageiro por RT-PCR dos receptores do sistema renina-angiotensina AT₁ (A) e AT₂ (B), dos receptores do sistema calicreínas-cininas B1 (C) e B2 (D) e da enzima Carboxipeptidase M (CPM), responsável pela formação do agonista do receptor B1 (E) nas linhagens celulares Melan-a e Tm5. Como controle endógeno da qualidade das amostras foi utilizado a ciclofilina B (F). Ma – Melan-a; C- - controle negativo; C+ - amostras de cDNA de coração; M – Marcador de peso molecular (*Ikb plus* - GIBCO); CPM – carbobipeptidase M.

4.2. Análise da presença e funcionalidade do receptor B1 na linhagem de melanoma Tm5

Uma vez detectada a expressão do RNA mensageiro do receptor B1, o próximo passo foi verificar se esse receptor era expresso a nível protéico e de forma funcional na membrana das células tumorais. Para isto, foram avaliadas duas vias de sinalização celular classicamente mobilizadas após ativação de GPCRs: mobilização de cálcio intracelular (figura 12) e ativação da via das quinases-ativadas por mitógenos (MAPK) (figura 13).

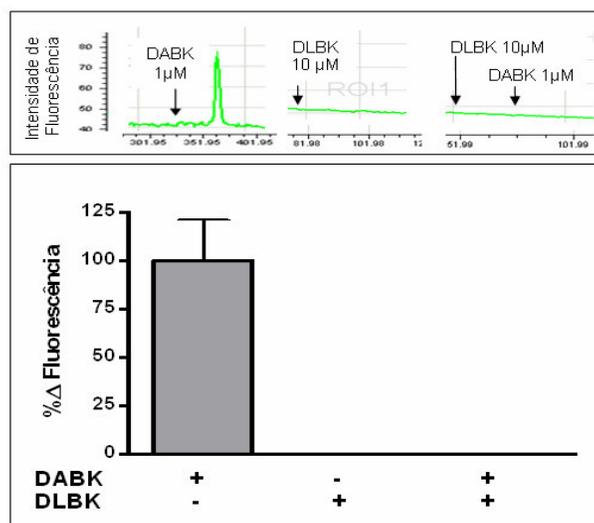


Figura 12: Avaliação da mobilização de cálcio intracelular em células da linhagem Tm5 através da sonda FLUO3/AM após estímulo com o agonista do receptor B1 (DABK – 1 μ M) e/ou antagonista (DLBK – 10 μ M). No painel superior vemos uma imagem representativa da intensidade de fluorescência após o(s) estímulo(s) e no painel inferior a quantificação das intensidades de fluorescência dos diferentes experimentos. n=7 DABK e DLBK. n=5 DABK+DLBK. DABK – desArg⁹-bradicinina; DLBK – desArg⁹[Leu⁸]-bradicinina.

Conforme se observa na figura 12, o estímulo de células da linhagem Tm5 com o agonista específico do receptor B1 – DABK – promoveu um aumento rápido e transitório da concentração de cálcio intracelular. O mesmo não acontece quando as células recebem o antagonista DLBK e nem quando as células foram pré-tratadas com o antagonista e depois estimuladas com o agonista, sugerindo que o receptor B1 é expresso de forma funcional nestas células.

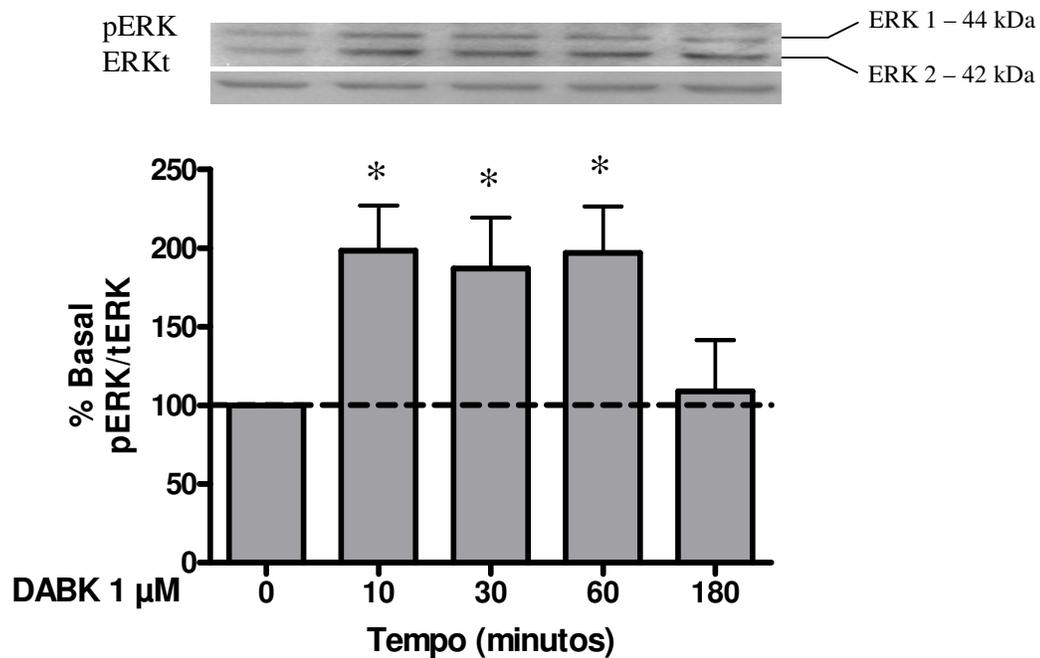


Figura 13: Avaliação temporal da fosforilação/ativação da a quinase-ativada-por-mitógeno ERK após estímulo com o agonista do receptor B1 – DABK (1 μ M). Painel superior: imagens representativas do *western blotting* de ERK fosforilada (pERK) e ERK total (ERKt). No painel inferior, quantificação de *western blotting* de cinco experimentos independentes. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls.* $p < 0,05$. $n = 5$. DABK – desArg⁹-bradicinina; ERK - quinase regulada por sinal extracelular.

Corroborando os dados da figura 12, observou-se na figura 13 que o agonista específico do receptor B1 – DABK – foi capaz de aumentar em duas vezes a fosforilação/ativação de ERK e esta ativação foi sustentada por até 60 min, retornando aos níveis do controle somente após 180 min.

Juntos, os dados mostrados nas figuras 12 e 13 dão evidências funcionais da presença do receptor B1 na linhagem Tm5 e, com isso, suporte para utilizar a linhagem de melanoma Tm5 como um modelo de estudo da participação do receptor B1 na progressão desta patologia. Além disto, é importante salientar que conforme mostrado na figura 11, esta linhagem celular não expressa os receptores B2, AT₁ nem AT₂ e, desta forma, trata-se de um sistema limpo para se estudar o papel do receptor B1.

4.3. Avaliação do papel exercido pelo receptor B1 na migração celular

Uma das características diretamente associadas à malignidade e a habilidade dos tumores em colonizarem órgãos secundários (metástase) é a motilidade celular. Por isto, para avaliar a influência da ativação do receptor B1 sobre a migração das células tumorais, o ensaio de cicatrização foi realizado. Conforme se observa na figura 14A e B, após 24 h de migração as células do grupo controle fecham em média 50% do espaço aberto com a pipeta, enquanto que o grupo tratado com DABK fecha em média apenas 25%. Quando as células foram tratadas com DLBK, observa-se que existe uma maior migração dessas células para a região livre (em média 65%) quando comparado ao grupo controle. Quando as células foram pré-tratadas com DLBK e depois estimuladas com DABK, se observa uma reversão parcial do efeito observado com o estímulo somente com DABK, apresentando em média 40% de fechamento.

Além dos dados de fechamento da área da lesão, observava-se no grupo controle a existência de um número grande de células que se desprendiam das demais e migravam de forma livre para a região central da fissura e isso acontecia com menor frequência nas células tratadas com DABK. Frente a esta observação e com suporte no trabalho de Meigs e colaboradores (2002), o número de células em migração livre em cada um dos campos fotografados foi quantificado e o que se observou foi uma diminuição de 50% no número destas células no centro da fissura no grupo tratado com DABK após 24 h de migração (figura 14C).

Embora o ensaio de migração celular tenha sido realizado em meio sem SFB, o que diminui o ritmo proliferativo das células, um ensaio de viabilidade celular foi realizado para verificar se o número de células viáveis era o mesmo após os tratamentos com DABK e DLBK e assim descartar um possível efeito tóxico ou mesmo proliferativo dos tratamentos. Conforme se observa na figura 14D, o número de células viáveis mantém-se o mesmo 24 e 48 h após o estímulo.

Depois de confirmado o efeito inibitório sobre a migração celular da linhagem Tm5 (figura 14), o mesmo ensaio foi realizado em outra linhagem de melanoma murino – B16/F10 - para verificar se este efeito sobre a migração seria restrito a linhagem Tm5. Observou-se que o tratamento com DABK também diminuiu, em média, 50% da migração das células da linhagem B16/F10 após 24 h (figura 15A e B).

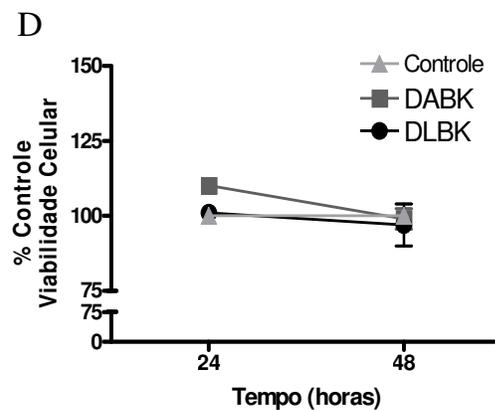
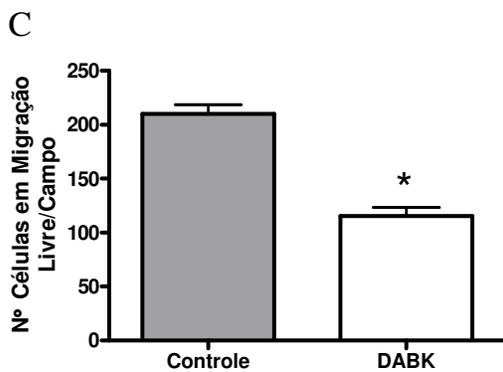
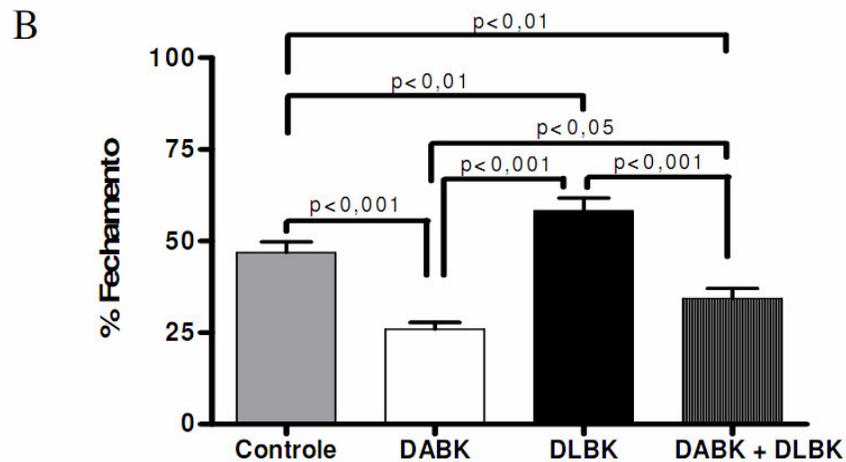
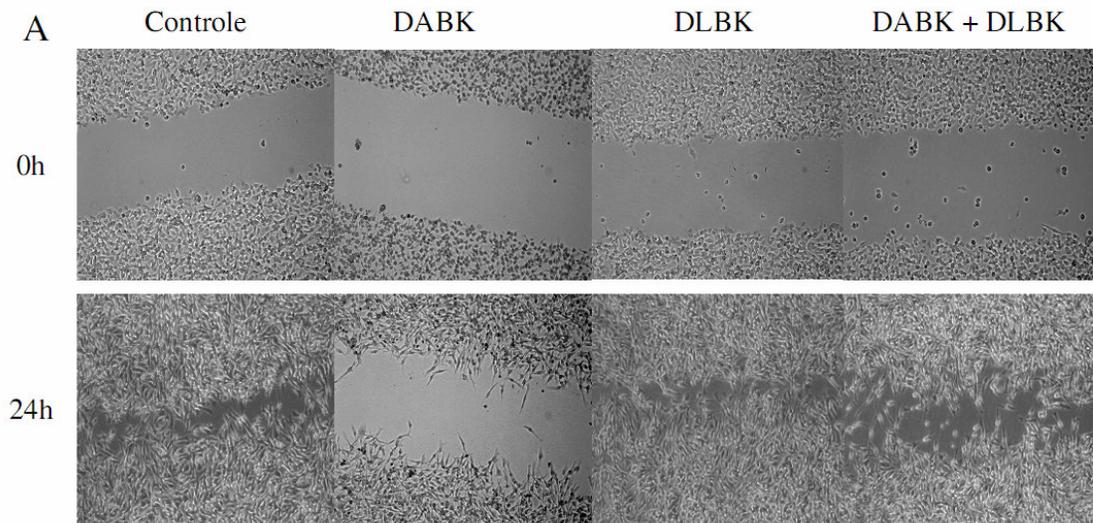


Figura 14: Efeito da ativação do receptor B1 na migração celular da linhagem Tm5. A) Imagens representativas das células no tempo 0h e após 24 h de migração sob diferentes tratamentos (A=10x10). B) Quantificação da porcentagem de fechamento das imagens de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. C) Quantificação do número de células em migração livre por campo de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. D) Análise da viabilidade celular após tratamento com DABK (1 μ M) e DLBK (10

μM) - dados referentes a três experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls (B e D) e teste t (C). DABK – desArg⁹-bradicinina; DLBK – desArg⁹[Leu⁸]-bradicinina; A – aumento.

Além disto, o cálculo do número de células B16/F10 em migração livre neste ensaio mostrou uma queda ainda mais acentuada do que na linhagem Tm5, chegando a 80% menos células na região central da fissura no grupo tratado com DABK (figura 15C), enquanto que nas células Tm5 esta redução é de aproximadamente 50% (figura 14C).

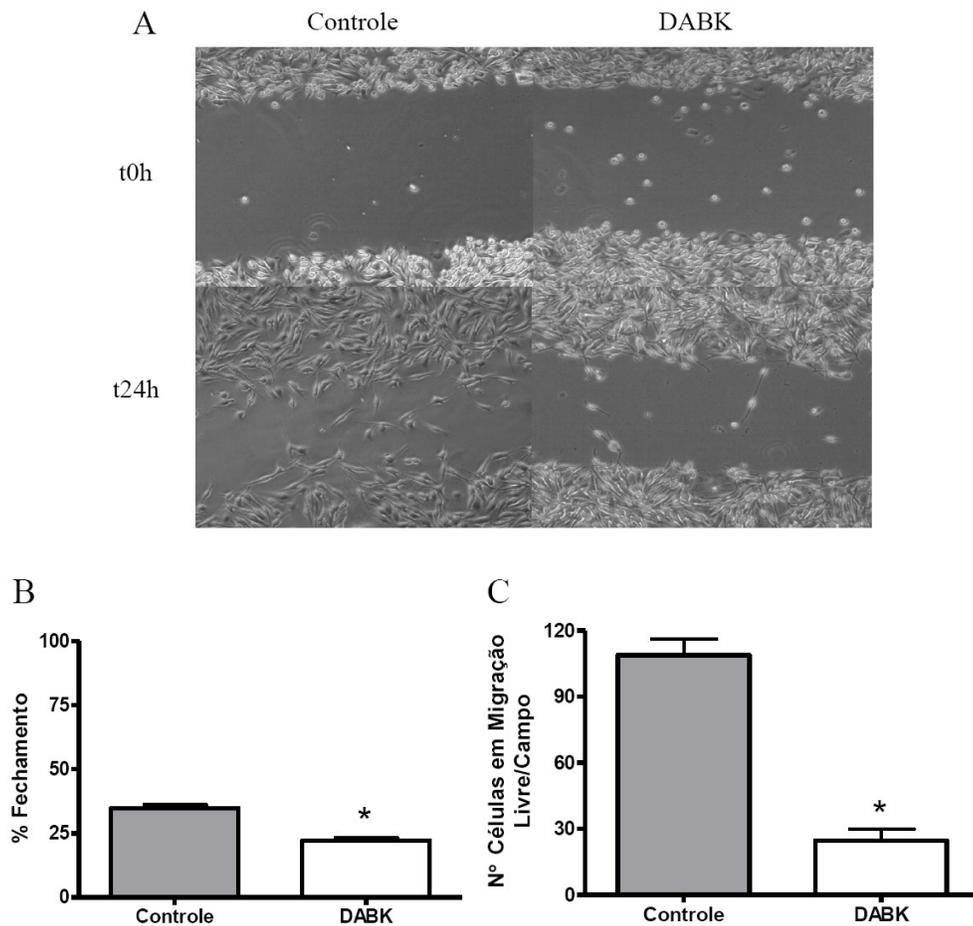


Figura 15: Efeito da ativação do receptor B1 na migração celular da linhagem B16/F10. A) Imagens representativas das células no tempo 0h e após 24 h de migração o estímulo ou não com DABK (1 μM) (A=10x10). B) Quantificação da porcentagem de fechamento das imagens de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. C) Quantificação do número de células em migração livre por campo de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística utilizada: teste t . Consideramos estatisticamente significativo $p < 0,05$. DABK – desArg⁹-bradicinina; A – aumento.

4.4. Avaliação da expressão de CD44 após estímulo com o agonista do receptor B1 em células da linhagem Tm5

No intuito de elucidar um possível mecanismo para o efeito inibitório da DABK sobre a migração celular, avaliou-se a capacidade da DABK de modular a expressão e disponibilidade na membrana da molécula de adesão CD44. Para isto, realizamos análise em citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos para CD44. Conforme se observa na figura 16A e B, o estímulo das células da linhagem Tm5 com DABK não modula a quantidade de CD44.

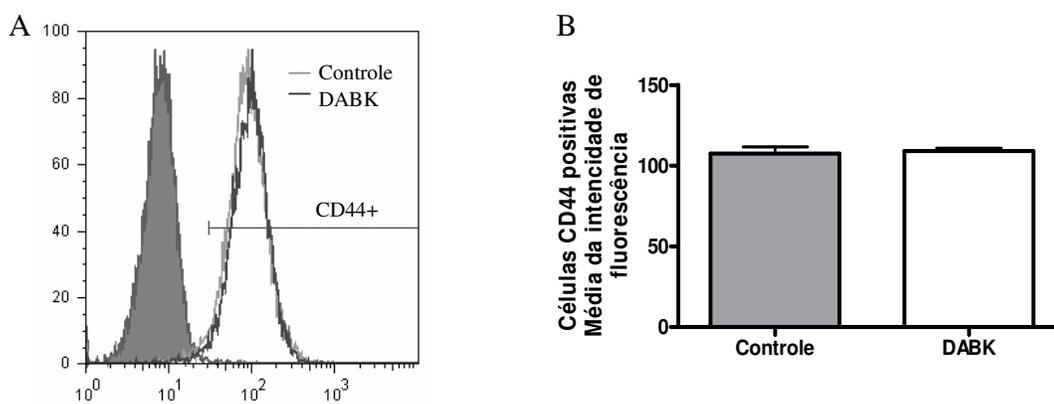


Figura 16: Análise da expressão de CD44 em células da linhagem Tm5 48 h após estímulo com DABK. A) Histograma representativo das células CD44 positivas estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h. B) Quantificação do experimento realizado em triplicata. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.5. Avaliação da atividade das gelatinases MMP 2 e 9 secretadas pelas células Tm5 estimuladas com o agonista do receptor B1

A partir do significativo efeito inibitório da DABK sobre a migração das células de melanoma, levantou-se a possibilidade de que a ativação do receptor B1 poderia ter efeito sobre outra etapa também importante na progressão tumoral: a invasão. Sabendo que a secreção de metaloproteases é parte fundamental para a invasão de muitos tipos de tumores, foram feitas análises, através da técnica de zimografia, para averiguar se o tratamento das células Tm5 com DABK modula a atividade de gelatinases, no caso MMP2 e MMP9.

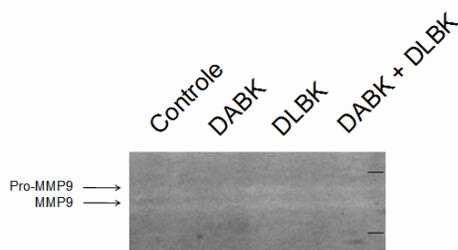


Figura 17: Análise da atividade das metaloproteases dos tipos 2 e 9 por zimografia após tratamento das células Tm5 com DABK (1 μ M) e/ou DLBK (10 μ M) por 24 h. Imagem representativa de quatro experimentos independentes. MMP9 – 92 kDa; DABK – desArg⁹-bradicinina; DLBK – desArg⁹[Leu⁸]-bradicinina.

Conforme observa-se na figura 17, o estímulo com DABK (1 μ M) por 24 h não modula a atividade da MMP9. Da mesma forma, o tratamento com DLBK (10 μ M) ou o co-tratamento DABK e DLBK também não apresentam efeito sobre a atividade da MMP9. Quanto a MMP2, não houve degradação do substrato em 72 kDa, indicando que a MMP2 não possui atividade ou não está presente em quantidade suficiente para que possamos detectar sua atividade através desta metodologia.

4.6. Padronização do modelo *in vivo*

Paralelamente aos ensaios *in vitro*, iniciou-se o estabelecimento da metodologia de indução tumoral em camundongos no laboratório com a injeção subcutânea de células tumorais no dorso de camundongos C57/BL6 de aproximadamente 25 g. Inicialmente os tumores foram avaliados nos tempos de 7, 10, 14 e 21 dias, no entanto, observou-se que os animais que deveriam ser sacrificados com 21 dias frequentemente precisavam sofrer eutanásia antes do final do experimento, pois os tumores atingiam os limites pré-estabelecidos no protocolo experimental e aprovados pelo Comitê de Ética. Também observou-se que quase não havia diferença entre os tumores de 7 e 10 dias. Além disto, analisando a curva de crescimento tumoral (figura 18), percebeu-se a existência de duas fases no desenvolvimento destes tumores: uma inicial - de latência - e outra exponencial - de crescimento. Desta forma, foram coletadas amostras de tumores da fase de latência (de 8-11 dias) e da fase exponencial (de 14-18 dias).

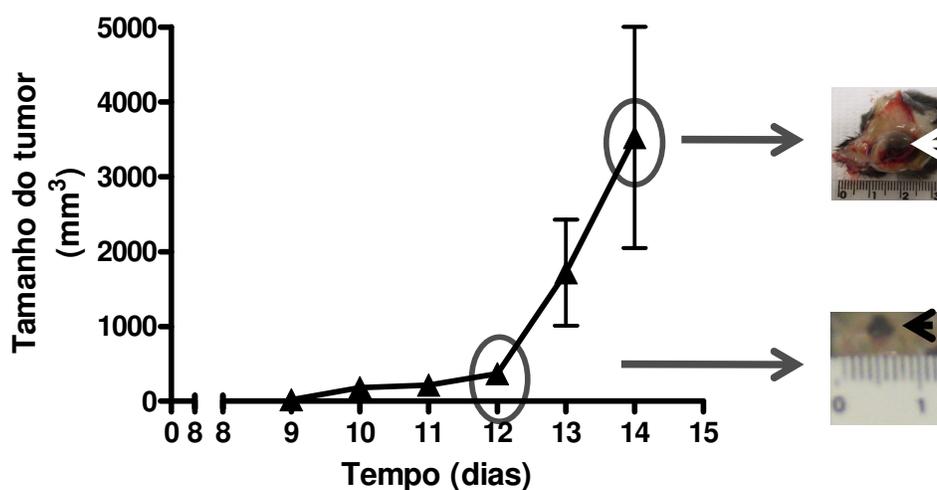


Figura 18: Curva de progressão tumoral dos camundongos C57/BL6 que receberam injeção subcutânea de células de melanoma da linhagem Tm5. A direita vemos fotos representativas dos tumores nos diferentes estágios: de latência (inferior) e exponencial (superior). n=7.

4.7. Avaliação da expressão do receptor B1 ao longo da progressão tumoral

O próximo passo foi avaliar a expressão do receptor B1 ao final das duas fases da progressão tumoral que foram identificados na figura 18: de latência e exponencial. Nesta análise quantitativa, a estratégia de PCR em tempo real foi aplicada, utilizando amostras de tumor do final de ambas as fases. Na figura 19 observa-se a expressão relativa do receptor B1/Ciclofilina B calculada através do método de $\Delta\Delta CT$ das médias dos CT de cada grupo (Livak & Schmittgen, 2001). Conforme se pode observar, o receptor B1 tem sua expressão aumentada em 4,5 vezes na fase exponencial, quando comparada à fase de latência.

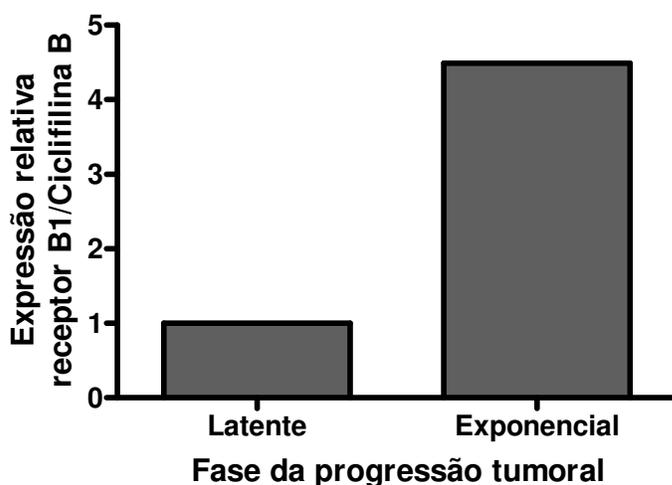


Figura 19: Expressão relativa do receptor B1 nas fases latente (inicial) e exponencial (final) da progressão tumoral avaliados por PCR em tempo real. Os valores foram calculados pelo do método de $\Delta\Delta CT$ das médias dos CT de cada grupo.

4.8. Efeito do tratamento das células tumorais da linhagem Tm5 com o agonista do receptor B1 sobre: a incidência de tumores quando inoculadas em camundongos, sobre o tamanho desses tumores e sobre a sobrevivência dos animais

4.8.1. Avaliação da viabilidade celular após estímulo com o agonista do receptor B1

Antes de injetar células tratadas ou não com DABK nos animais, a viabilidade destas células em cultura foi avaliada logo após o estímulo com o agonista do receptor B1 por 24 h e também a cada 3 dias após o estímulo, durante todo o período de um experimento *in vivo*. Como se observa na figura 20, o número de células viáveis se manteve o mesmo no controle e no tratado durante todo o período do experimento.

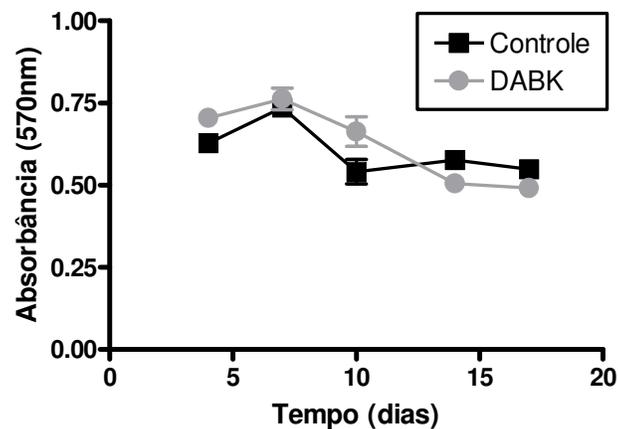


Figura 20: Avaliação da viabilidade celular dos grupos controles após estímulo ou não com DABK. Células da linhagem Tm5 foram estimuladas com DABK (1 μ M) ou não no tempo zero e mantidas em cultura por até 18 dias. A cada passagem (3-4 dias) 10% das células eram semeadas novamente para manutenção da cultura e outros 6 poços, também com 10% do total das células semeados para análise da viabilidade celular. Os dados mostrados são referentes a dois experimentos independentes e as análises de viabilidade (MTT) foram feitas em 6 replicatas. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.8.2. Avaliação da incidência de tumores, do tamanho desses tumores e da sobrevida dos animais que foram inoculados com células de melanoma Tm5 pré-tratadas por 24h com o agonista do receptor B1

Confirmado que a viabilidade celular não se altera após o estímulo com DABK, os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro recebeu células não estimuladas, que apenas sofreram privação de SFB por 24 h. O segundo grupo recebeu as células que foram estimuladas com DABK (1 μ M) em meio sem SFB por 24 h. Conforme se observa na figura 21, a incidência de tumores foi significativamente menor no grupo de animais que recebeu as células previamente tratadas com DABK. Na figura 22 vê-se a curva de progressão tumoral de todos os animais que receberam as células (tratadas ou não) (A) e a média do tamanho dos tumores de todos estes indivíduos (B). Na figura 23 pode-se observar o peso de alguns destes tumores ao final do experimento, enquanto que na figura 24 vê-se uma curva de sobrevivência. Os animais que permaneceram vivos 150 dias após o inóculo com as células tumorais são todos do grupo que recebeu as células tratadas com DABK e estes animais permaneceram vivos até o momento da redação desta tese (180 dias) e livres de tumores palpáveis. Desta forma, as figuras 21-24 sugerem fortemente que as células expostas ao agonista do receptor B1 perdem agressividade.

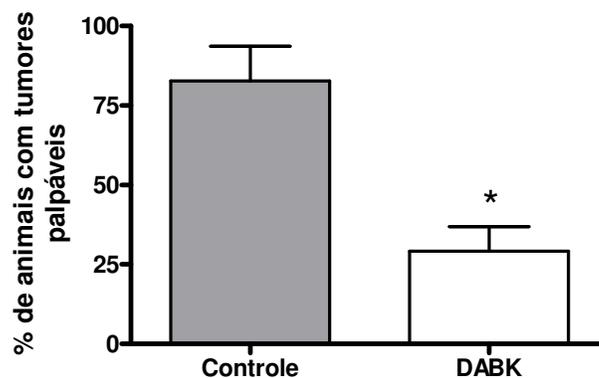


Figura 21: Análise da incidência de animais com tumores palpáveis após injeção de células estimuladas ou não com DABK (1 μ M). Os dados são referentes a 21 animais por grupo, divididos em três experimentos independentes. Análise estatística: teste *t*. * $p < 0,05$. DABK – desArg⁹-bradicinina.

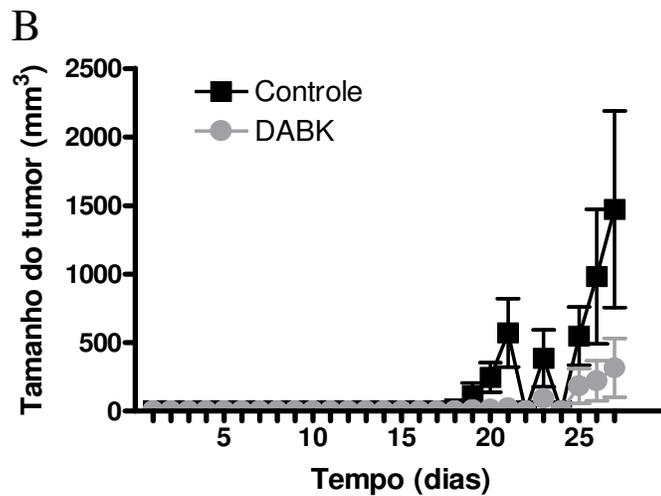
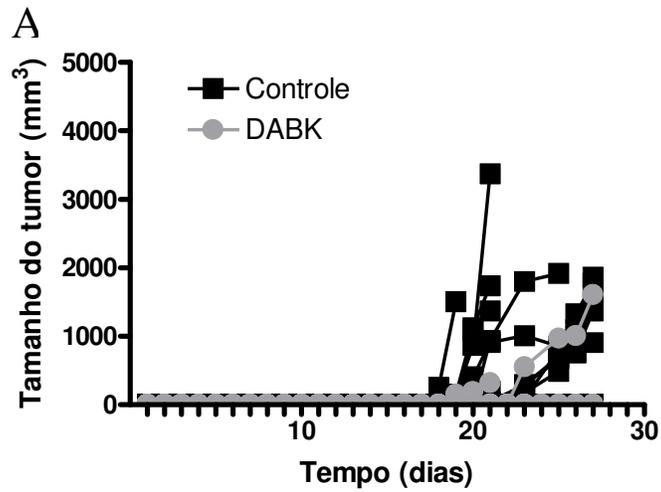


Figura 22: Análise da progressão tumoral dos animais injetados com células estimuladas ou não com DABK ($1 \mu\text{M}$). Os dados são referentes a 16 animais por grupo divididos em dois experimentos independentes. A) Tamanho do tumor de cada animal estudado. B) Curva de progressão tumoral média dos grupos controle e DABK. DABK – desArg⁹-bradicinina.

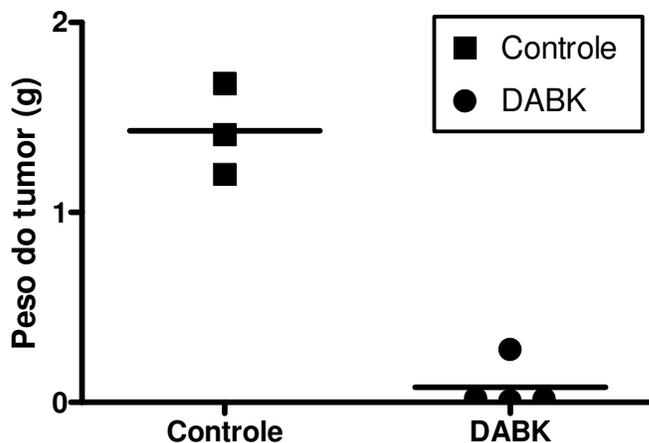


Figura 23: Avaliação do peso dos tumores dos animais injetados com células Tm5 estimuladas ou não com DABK (1 μ M). No dia do sacrifício, amostras de tumor foram retiradas dos animais, dissecadas para retirada dos tecidos adjacentes ao tumor e a massa tumoral foi pesada. Como esta análise não preserva o microambiente tumoral e o resultado é bastante homogêneo, utilizamos 3 animais do grupo controle e 4 animais que receberam células pré-tratadas com DABK (1 μ M). DABK – desArg⁹-bradicinina.

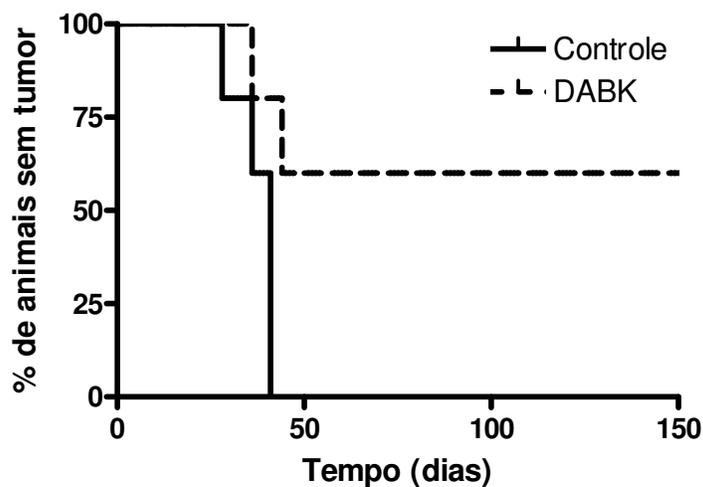


Figura 24: Curva de sobrevivência dos animais após receberem inóculo de células da linhagem Tm5 expostas a DABK (1 μ M) por 24 h ou não (controle). Os animais sofreram eutanásia quando o tumor atingia volume superior a 3000 mm³. Os animais do grupo que recebeu células tratadas com DABK que permaneceram vivos até 150 dias após o inóculo, n=5. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.8.3. Análise histológica das amostras de tumor dos animais injetados com células controle ou tratadas com o agonista do receptor B1

Para melhor caracterizar o fenômeno de diminuição da agressividade dos tumores que foram tratados com DABK, análises histológicas destas amostras foram realizadas utilizando a coloração HE. Conforme se pode observar na figura 25, os tumores do grupo controle, além de terem um tamanho muito superior aos do grupo que recebeu as células tratadas com DABK, também causam uma maior modificação no microambiente onde se encontram, apresentando maior reação estromal (figura 25A), maior infiltrado inflamatório peri-tumoral (figura 25A) e apresentando áreas de invasão sobre outros tecidos, neste caso, tecido muscular (figura 25B). Quanto aos tumores previamente tratados com DABK, se pode observar que apresentam sempre menor tamanho e presença de bordas bem definidas (figura 25A e B), causam pouca ou nenhuma reação estromal (figura 25A), apresentam pouco infiltrado inflamatório peri-tumoral (figura 25A), além de não invadirem outros tecidos (figura 25B).

Com os mesmos cortes, a agressividade destes tumores foi avaliada pela quantificação do número de células em mitose e vasos por campo de grande aumento, como se pode ver na figura 26. Para cada indivíduo foram quantificados 10 campos no aumento 10x40 sempre que o tamanho do tumor permitisse. Nos casos onde os tumores eram muito pequenos, foram quantificados tantos campos distintos quantos possíveis e a média foi feita sobre o número de campos avaliados. Nesta análise observou-se que os tumores formados a partir das células tumorais que foram estimuladas *in vitro* com DABK são menos agressivos, apresentando um número menor de células em mitose (figura 26A e B) e um menor número de vasos quando comparado com os tumores do grupo controle (figura 26A e C).

Da mesma forma, o infiltrado inflamatório presente na região peri-tumoral (figura 27) dos dois grupos foi caracterizado e o que observou-se foi uma menor quantidade de células inflamatórias infiltradas na região peri-tumoral nos tumores formados a partir de células estimuladas com DABK do que nos tumores do grupo controle (figura 27A e B). Quando se avaliou estas células cuidadosamente e quantificou-se o número de macrófagos (figura 27C), de neutrófilos (figura 27D) e de linfócitos (figura 27E) percebeu-se uma nítida redução de cada uma destas células infiltradas na região peri-tumoral dos tumores formados a partir de células estimuladas com DABK comparado aos tumores do grupo controle.

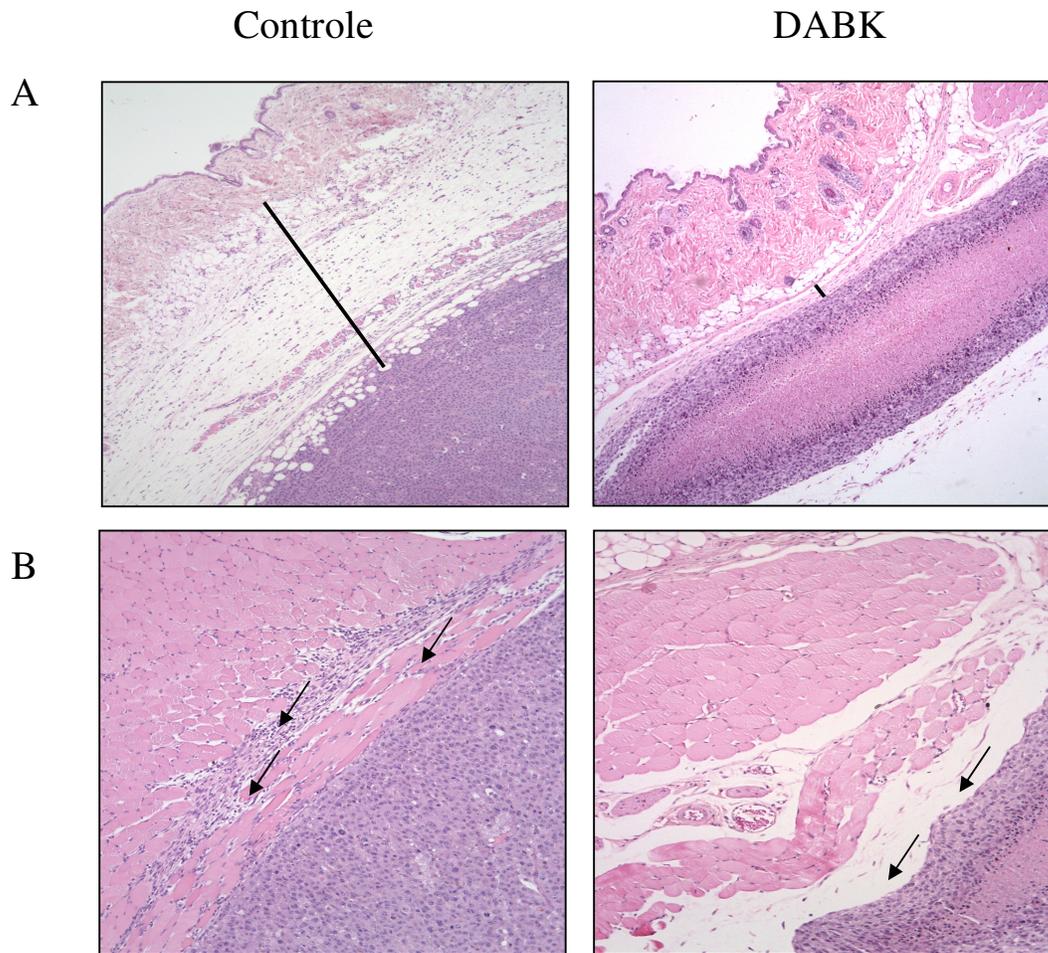


Figura 25: Análise histológica dos tumores obtidos de animais que foram inoculados com células Tm5 controle ou tratadas com DABK (1 μ M) por 24 h. A) Microambiente tumoral dos grupos controle e DABK. No grupo controle se observa grande reação estromal e infiltrado inflamatório (região que compreende o traçado preto), bem como borda do tumor pouco definida (região abaixo do traço), enquanto que no grupo que recebeu células tratadas com DABK se observa muito pouca reação estromal, pouco infiltrado inflamatório (região do pequeno traçado preto) e o tumor apresenta bordas bem definidas (região abaixo do traço) (A=4x10). B) Invasão da massa tumoral sobre tecido muscular. No grupo controle as setas indicam zonas de invasão e conseqüentemente de regiões do tumor que não apresentam borda definida. No grupo DABK a seta indica a borda bem definida do tumor e não se observa células tumorais no tecido muscular (A=10x10). DABK – desArg⁹-bradicinina; A - aumento.

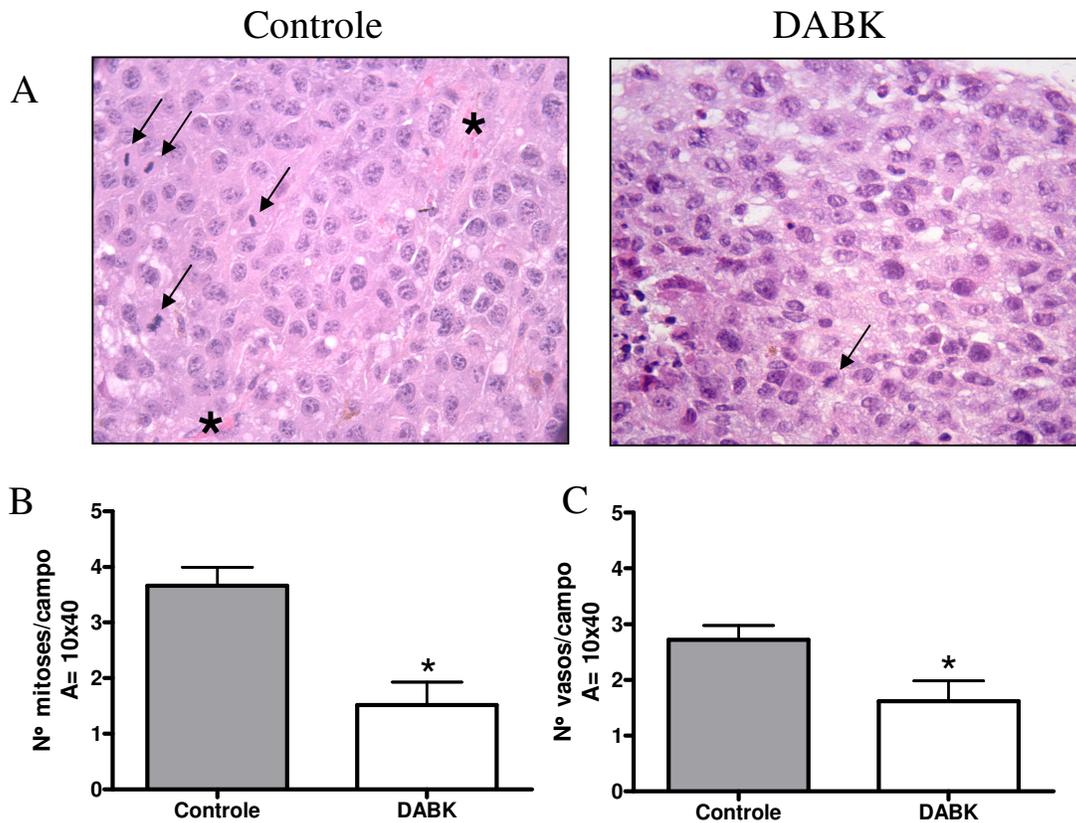


Figura 26: Análise quantitativa do número de vasos e células em mitose dos tumores dos animais que receberam células controle ou estimuladas com DABK (1 μ M) por 24 h. A) Imagens representativas dos tumores (A=10x40). B) Quantificação do número de células em mitose em 10 campos diferentes de cada indivíduo em A=10x40. C) Quantificação do número de vasos em 10 campos diferentes de cada indivíduo em A=10x40. n=5. * vasos, \rightarrow células em mitose. Análise estatística: teste *t*. * $p < 0,05$. DABK – desArg⁹-bradicinina; A – aumento.

4.9. Avaliação da secreção de TNF α , IL-6 e IL-10 após estímulo das células da linhagem Tm5 com o agonista do receptor B1 *in vitro*

Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na perda de agressividade das células tumorais ao serem estimuladas com o agonista do receptor B1, a secreção de duas citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α) e uma citocina anti-inflamatória (IL-10) foram avaliadas pelo método de ELISA, após 24 h do estímulo com agonista do receptor B1 *in vitro*. Conforme se observa na figura 28A as células Tm5 não secretam níveis detectáveis de IL6, assim como não o fazem quando tratadas com o antagonista DLBK (10 μ M) por 24 h . Uma vez estimuladas com DABK (1 μ M) por 24 h passam a secretar IL-6 e este efeito é completamente revertido pelo co-tratamento com DLBK.

No entanto, quando se observa os níveis de IL-10 (figura 28B) e TNF α (figura 28C) nota-se que não há secreção de nenhum dos dois fatores nos controles e nem sob nenhum dos estímulos feitos.

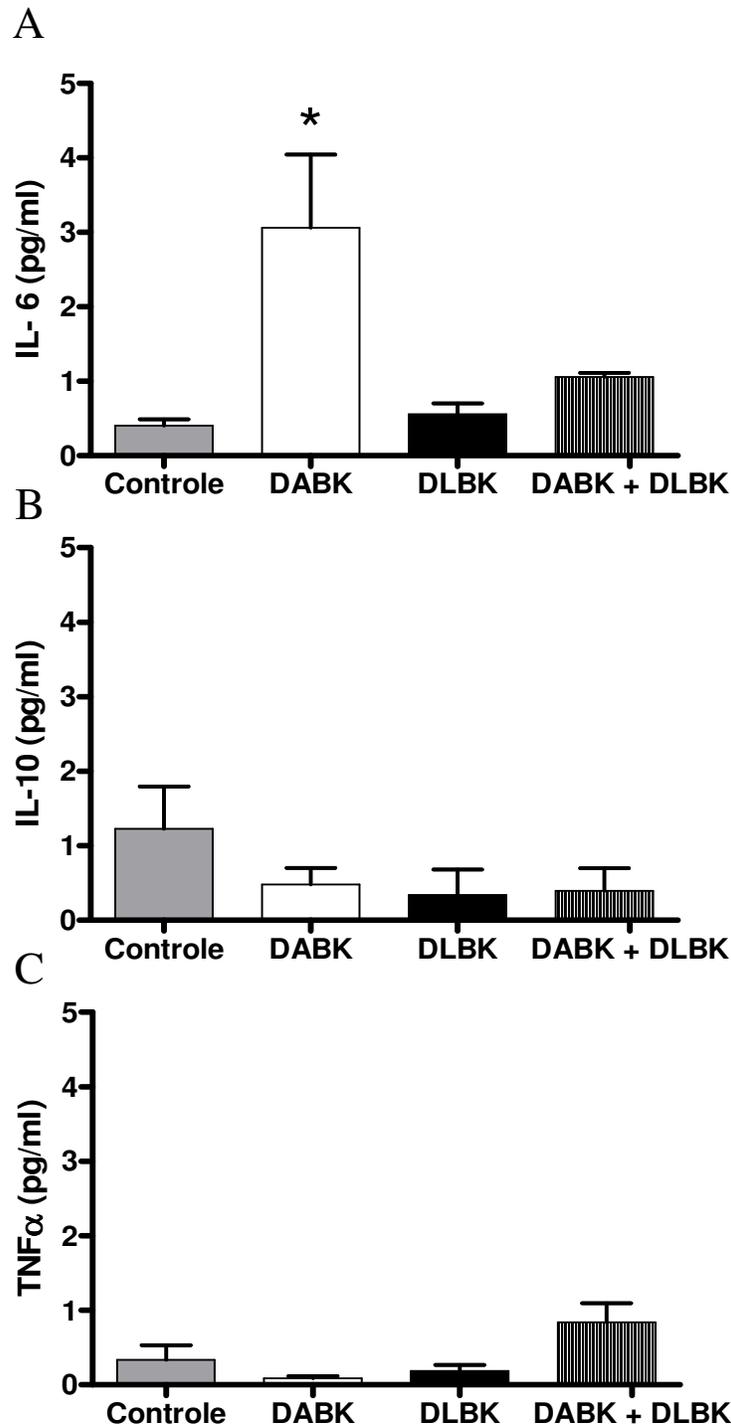


Figura 28: Avaliação por ELISA da secreção de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) nas células da linhagem Tm5, após 24 h de estímulo com DABK (1 μ M) e/ou DLBK (10 μ M) *in vitro*. Dados referentes a 4 experimentos independentes em triplicata. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido de Newman-Keuls. * $p < 0,05$. DABK – desArg⁹-bradicinina; DLBK – desArg⁹[Leu⁸]-bradicinina; IL – interleucina; TNF α - fator de necrose tumoral alfa.

4.10. Avaliação dos níveis séricos de TNF α , IL-6 e IL-10 dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1

Da mesma forma, a concentração das citocinas IL-6 e IL-10 e de TNF α circulantes foi avaliada no plasma dos animais saudáveis, com tumor (grupo controle) e com tumor cujas células foram estimuladas com DABK (1 μ M) por 24 h antes de serem inoculadas nos animais. Conforme se observa na figura 29, as duas interleucinas e o TNF α , quando presentes, estão em baixas concentrações no plasma dos animais e não sofrem modulação em nenhum dos grupos.

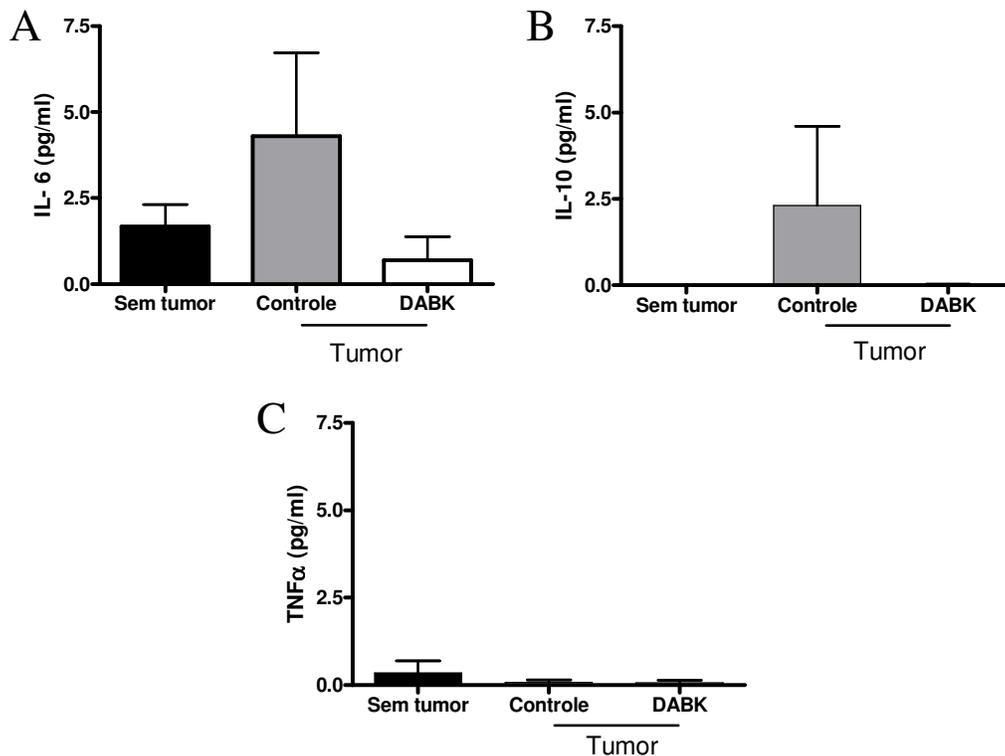


Figura 29: Avaliação por ELISA da quantidade de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) circulante no plasma de animais sem tumor, inoculados com células Tm5 não estimuladas ou inoculados com células tratadas com DABK (1 μ M) por 24 h. n=3. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido por Newman-Keuls. DABK – desArg⁹-bradicinina; IL – interleucina; TNF α - fator de necrose tumoral alfa.

4.11. Avaliação da expressão de IFN γ nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1

Uma vez constatada a secreção da citocina pró-inflamatória IL-6 pelas células de melanoma Tm5 *in vitro* após estímulo com o agonista do receptor B1, levantou-se a possibilidade de que os tumores formados a partir de células estimuladas com DABK pudessem ser mais “visíveis” ao sistema imunológico dos animais. Desta forma, os tumores oriundos de células tratadas com DABK poderiam encontrar-se tanto na fase de eliminação quanto de equilíbrio da imuno-edição, enquanto que os tumores oriundos de células não estimuladas possivelmente conseguiram alcançar a fase de escape.

Para testar esta hipótese, avaliou-se a expressão de IFN γ , uma citocina pró-inflamatória importante na resposta do tipo Th1 e que tem sua expressão reduzida na fase de escape. Conforme se observa na figura 30 a expressão desta citocina é significativamente maior nos tumores dos animais que receberam células estimuladas com DABK.

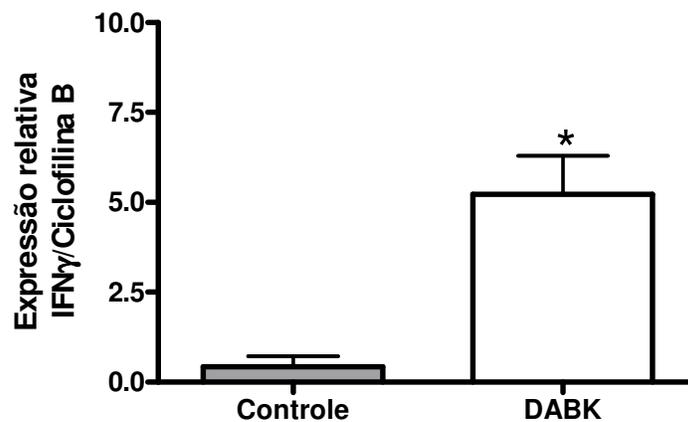


Figura 30: Análise da expressão de IFN γ em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h. Os dados foram plotados como expressão relativa VEGF/Ciclofilina B, segundo Zhu e colaboradores (2003). n=5. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.12. Avaliação da expressão de VEGF nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1

Na tentativa de compreender as modificações que ocorreram nos tumores desenvolvidos a partir de células estimuladas com DABK foi avaliada a expressão de VEGF, um dos principais fatores de crescimento envolvidos na angiogênese. No entanto, conforme se observa na figura 31, não existe modulação na expressão de VEGF nos tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas com o agonista do receptor B1 quando comparado aos que se desenvolveram a partir de células não estimuladas.

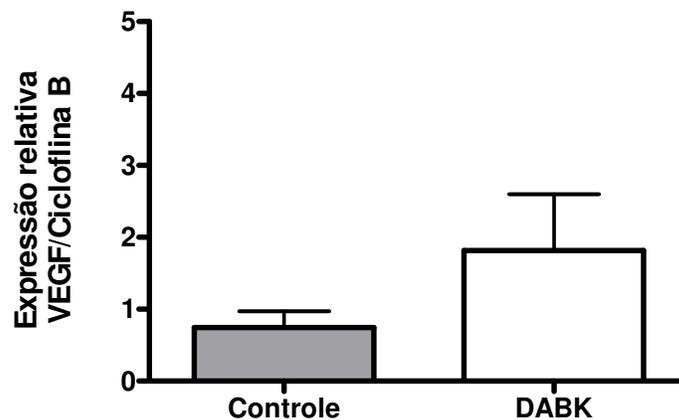


Figura 31: Análise da expressão de VEGF em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h. Os dados foram plotados como expressão relativa VEGF/Ciclofilina B e foram calculados pelo do método de $\Delta\Delta$ CT. n=5. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.13. Avaliação da expressão de E-caderina e TGF β nos tumores dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem Tm5 tratadas ou não com o agonista do receptor B1

Outra possível modificação nos tumores que poderia contribuir para a perda de agressividade é a re-indução da expressão de E-caderina, normalmente perdida ou bastante diminuída durante a transformação maligna. Desta forma, avaliou-se a expressão de E-caderina nos tumores formados por células estimuladas ou não com DABK. Além disto,

avaliou-se também a existência de modulação da expressão de TGF β , principal citocina indutora da TEM, um processo marcado pela perda da expressão de E-caderina.

Conforme se observa na figura 32, os tumores formados a partir de células estimuladas com o agonista do receptor B1 expressam aproximadamente 5 vezes mais E caderina do que os tumores oriundos de células não estimuladas (figura 32A), assim como também apresentam menor expressão da citocina que estimula a TEM (e consequentemente a perda de E-caderina) o TGF β (figura 32B).

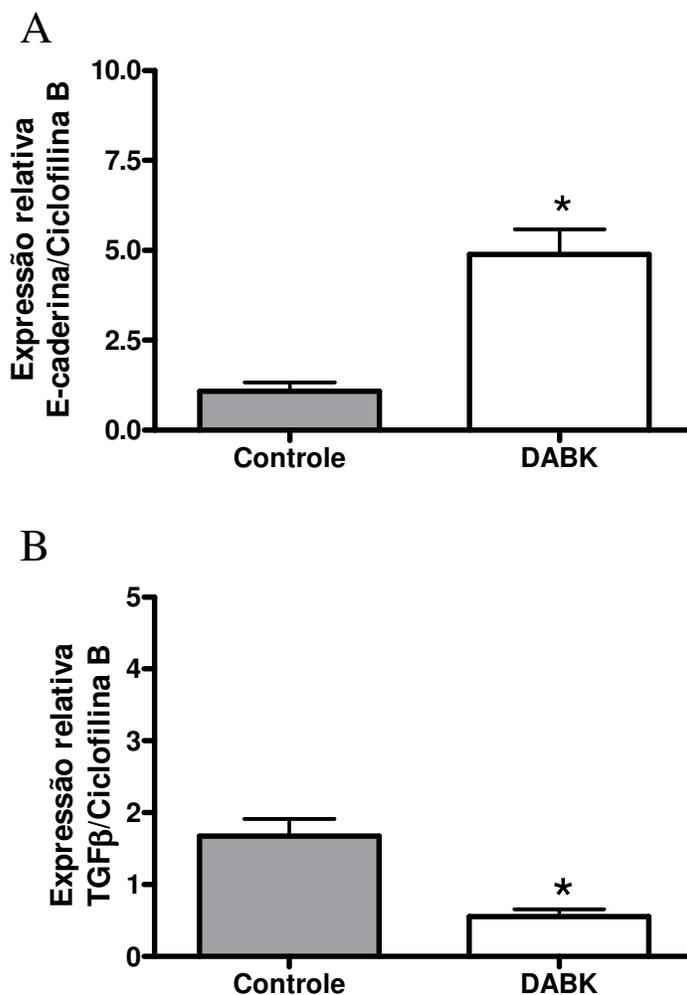


Figura 32: Análise da expressão de E-caderina (A) e TGF β (B) em tumores que se desenvolveram a partir de células estimuladas ou não com DABK 1 μ M por 24 h. Os dados estão plotados como expressão relativa de E-caderina/Ciclofilina B ou TGF β /ciclofilina B e foram calculados segundo Livak & Schmittgen (2001) e Zhu e colaboradores (2003, respectivamente. n=5. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.14. Avaliação da incidência de tumores, do tamanho desses tumores e da sobrevivência dos animais que foram inoculados com células de melanoma da linhagem B16/F10 pré-tratadas por 24h com o agonista do receptor B1

O mesmo protocolo experimental de estimular ou não as células tumorais *in vitro* foi realizado utilizando células de melanoma murino da linhagem B16/F10. Contudo, não foi observado o mesmo tipo de resposta visto com a linhagem Tm5 e conforme se verifica nas próximas figuras, o estímulo das células B16/F10 com DABK não alterou a incidência de tumores nos camundongos (figura 33), não interferiu na curva de progressão tumoral dos indivíduos (figura 34) e conseqüentemente todos os tumores apresentaram semelhante peso ao final do experimente (figura 35). Coerente com os resultados anteriores observa-se na figura 36 que a sobrevivência dos animais que receberam células da linhagem B16/F10 estimuladas com DABK também não sofreu alteração.

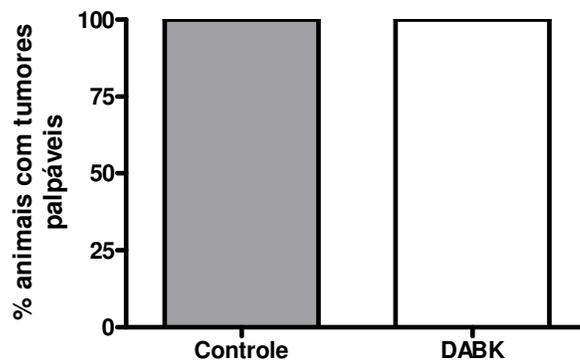


Figura 33: Análise da incidência de animais com tumores palpáveis após injeção de células da linhagem B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h. n=9. DABK – desArg⁹-bradicinina.

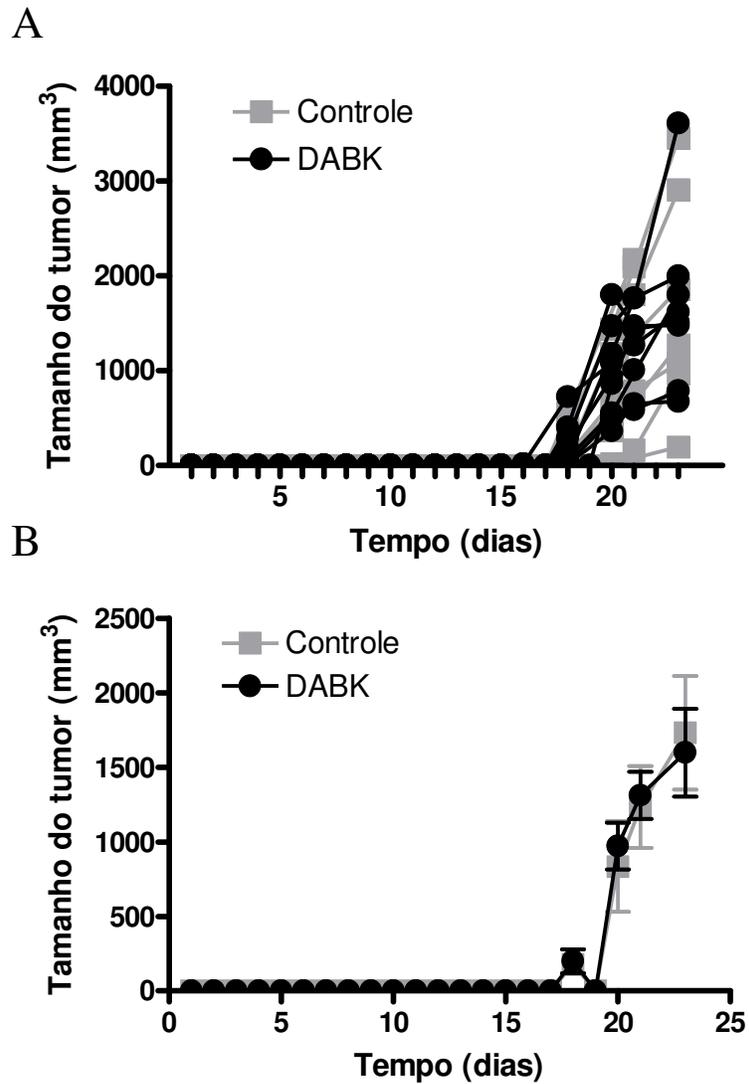


Figura 34: Análise da progressão tumoral dos animais injetados com células da linhagem B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h. A) Progressão tumoral de cada indivíduo estudado. B) Curva de progressão tumoral média dos grupos controle e DABK. n=9. DABK – desArg⁹-bradicinina.

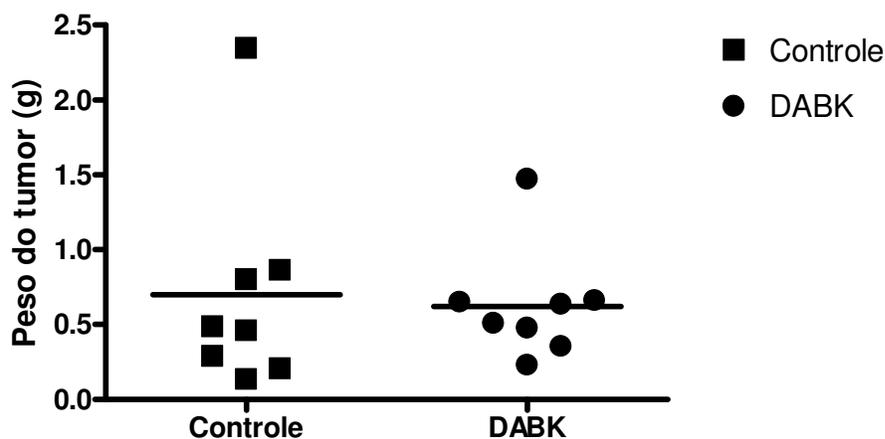


Figura 35: Avaliação do peso dos tumores dos animais injetados com células B16/F10 estimuladas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h. No dia do sacrifício dos animais, amostras de tumor foram retiradas dos animais, dissecadas para a retirada dos tecidos adjacentes ao tumor e a massa tumoral foi pesada. n=9. DABK – desArg⁹-bradicinina

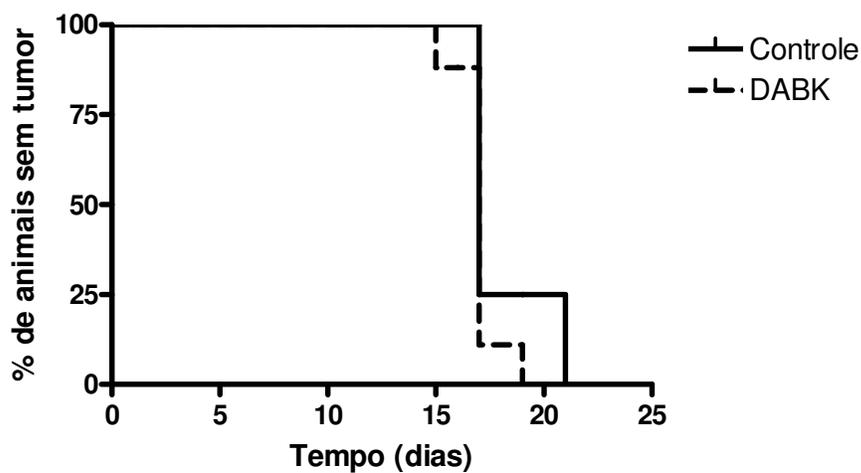


Figura 36: Curva de sobrevivência dos animais após receberem inóculo de células da linhagem B16/F10 expostas ou não a DABK (1 μ M) por 24 h. Os animais sofreram eutanásia praticamente todos no mesmo dia uma vez que o tamanho dos tumores era semelhante entre todos os indivíduos. n=9. DABK – desArg⁹-bradicinina.

4.15. Avaliação dos níveis séricos de TNF α , IL-6 e IL-10 dos animais que receberam inóculo de células tumorais da linhagem B16/F10 tratadas ou não com o agonista do receptor B1

A concentração das citocinas IL-6 e IL-10 e de TNF α circulantes também foi avaliada no plasma dos animais que receberam inóculo com as células B16/F10 tratadas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h e não se observou diferença estatística na quantidade sérica de IL-6, IL-10 e nem TNF α entre os animais que receberam as células tratadas com DABK e os animais controles (figura 37).

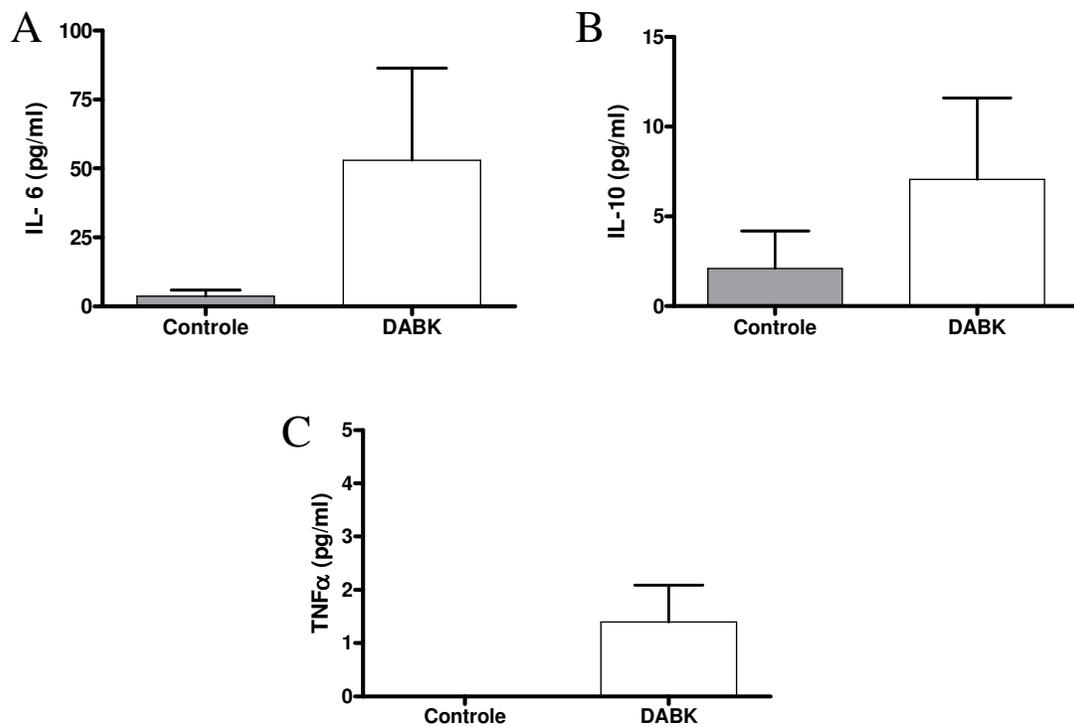


Figura 37: Avaliação por ELISA da quantidade de IL-6 (A), IL-10 (B) e TNF α (C) circulante no plasma de animais inoculados com células da linhagem B16/F10 tratadas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h. n=3. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina; IL – interleucina; TNF α - fator de necrose tumoral alfa.

4.16. Avaliação da habilidade das células da linhagem Tm5 estimuladas ou não com o agonista do receptor B1 em estabelecer metástase pulmonar

Por fim, voltando à linhagem Tm5 o efeito do tratamento com DABK na habilidade de fazer metástase pulmonar foi avaliado. Para isto, células tratadas ou não com DABK foram injetadas na veia caudal dos camundongos e o número de nódulos pulmonares 10 dias após a inoculação foi contado. Conforme se observa na figura 38, não existe diferença estatística entre o número de colônias pulmonares estabelecidas pelas células controle e tratadas. No entanto, neste experimento observa-se uma forte tendência de diminuição do número de nódulos pulmonares no grupo de animais que recebeu as células estimuladas com DABK. Contudo, apenas a presença de um número amostral maior permitiria confirmar se a diferença entre número de nódulos pulmonares nos animais que receberam células tratadas ou não com DABK é verdadeira ou meramente aleatória.

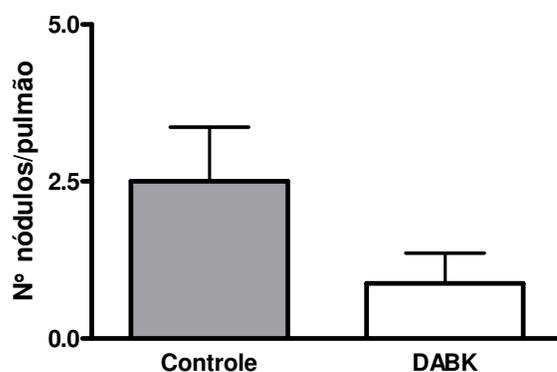


Figura 38: Análise do número de nódulos metastáticos encontrados no pulmão de animais que tiveram células da linhagem Tm5 tratadas ou não com DABK (1 μ M) por 24 h injetadas pela veia caudal. n=8. Análise estatística: teste *t*. DABK – desArg⁹-bradicinina.

5. Discussão

5. Discussão:

Embora o SCC seja classicamente relacionado com regulação da pressão arterial e inflamação (Duka et al., 2006; Calixto et al., 2004), a sua participação em diferentes patologias vem ganhando cada vez maior importância (Costa-Neto et al., 2008). Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar o papel do SCC, com ênfase no receptor B1, em diversas etapas da progressão de melanoma. Para isto, foram utilizadas células da linhagem de melanoma murino Tm5, um modelo estabelecido a partir da linhagem não tumorigênica de melanócitos (Melan-a) que foi submetida a ciclos sucessivos de *anoikis* (Oba-Shinjo et al., 2006).

As primeiras análises realizadas por PCR demonstraram que as células da linhagem Tm5 expressam o receptor B1 e não expressam o receptor B2. Este resultado é muito importante, pois aponta não apenas para um possível papel do receptor B1 no desenvolvimento de melanoma, mas também sugere que a linhagem Tm5 é um bom modelo para o estudo do papel do receptor B1 nesta patologia, uma vez que os ligantes dos dois receptores diferem entre si apenas por um resíduo de Arg carboxi-terminal. Desta forma, mesmo a BK/KD tendo maior afinidade por B2 e DABK/DAKD ligando-se preferencialmente ao receptor B1, os ligantes do receptor B1 conseguem ativar o receptor B2 (Fathy et al., 1998 e Leeb-Lundberg et al., 2005). Uma vez ativado, o receptor B2 estimula a secreção de citocinas e fatores de crescimento (Pan et al., 1996; Brunius et al., 2005; Zhang et al., 2008b), bem como exerce funções pró-tumorais estimulando tanto a proliferação de células normais e neoplásicas *in vitro* (Srinivasan et al., 2004; Greco et al., 2004; Greco et al., 2005) quanto a angiogênese e o crescimento dos tumores e *in vivo* (Ishihara et al., 2001; e Ishihara et al., 2002; Chan et al., 2002; Ikeda et al., 2004). Assim, o fato das células Tm5 só expressarem o receptor B1 representa, claramente, uma vantagem para o estudo desse receptor no melanoma.

Além das células Tm5 não expressarem o receptor B2 de cininas, também foi verificado que esta linhagem não expressa os receptores clássicos do SRA: AT₁ e AT₂. O SRA e SCC são sistemas que interagem em vários âmbitos, pois estão diretamente conectados por uma enzima comum que é a ECA, seus receptores interagem formando heterodímeros (Abadir et al., 2006), e se sabe que as atividades dos receptores do SCC sofrem modulação da ECA (Chen et al., 2005). Estes vários pontos de conexão tornam praticamente impossível qualquer intervenção em um dos dois sistemas sem causar modificações no outro. Desta forma, a ausência de receptores, cujas funções relacionadas à tumorigênese já foram descritas, (Egami et al., 2003; Deshayes & Nahmias, 2005; Rodrigues-

Ferreira et al., 2009) passa a ser mais uma vantagem na utilização das células da linhagem Tm5 para se estudar a contribuição do receptor B1 na progressão de melanoma.

Além disto, observou-se a existência de um aumento importante na expressão do RNA mensageiro da CPM na linhagem tumoral quando comparada com a linhagem de melanócito (Melan-a), da qual foi originada. A CPM é uma das enzimas capazes de retirar o resíduo de arginina carboxi-terminal da BK e KD formando os ligantes do receptor B1. Além disto, Zhang e colaboradores (2008a) mostraram que ela desempenha um importante papel em favorecer a ativação do receptor B1, pois interage fisicamente com esse receptor em *lipid rafts* e, desta forma, gera o agonista no local onde ele deve agir. Neste contexto e considerando a observação do sutil aumento da expressão do RNA mensageiro do próprio receptor B1 na linhagem tumoral comparado a não tumoral, sugere uma possível função do receptor B1 na progressão de melanoma.

Dessa forma, antes de investigar a participação do receptor B1 no melanoma, a sua presença a nível proteico e sua funcionalidade precisavam ser averiguadas. Para isto, foi avaliada a capacidade das células Tm5 de ativarem vias de sinalização intracelular, descritas como reguladas pela ativação deste receptor (Regoli & Barabé, 1980; Dixon e al., 2002; Greco et al., 2005; Molina et al., 2009). Os ensaios de mobilização de cálcio intracelular e de ativação de ERK mostraram que as células da linhagem Tm5 respondem ao estímulo com o agonista específico do receptor B1 e esta resposta é bloqueada na presença do antagonista DLBK. Estes dados demonstraram que o receptor B1 é expresso de forma funcional na linhagem Tm5.

O receptor B1 é membro da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR), a família mais ampla de moléculas de superfície envolvidas em transmissão de sinal intracelular e, desta forma, não é de se estranhar que os GPCRs estejam envolvidos em uma enorme gama de patologias e que sejam alvo, direta ou indiretamente, de 50-60% dos agentes terapêuticos atuais (Pierce et al., 2002). No câncer não é diferente, receptores de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, hormônios, receptores do sistema imune, dentre muitos outros que estão associados à tumorigênese, são membros da família dos GPCRs (Dorsam & Gutkind, 2007). Sendo assim e uma vez confirmada a presença e funcionalidade do receptor B1 no modelo de estudo, iniciou-se a investigação do seu possível papel na progressão de melanoma.

Sabendo-se que o aumento da proliferação celular, a perda da inibição de crescimento por contato, a capacidade de sobreviver sem adesão e maior mobilidade celular são características associadas à malignidade das células tumorais (Fidler, 2002); foi avaliado em um primeiro momento se a ativação do receptor B1 seria capaz de influenciar a proliferação e

a migração de células de melanoma, como já descrito em outros tipos de tumores (Taub et al., 2003; Molina et al., 2009). O ensaio de viabilidade celular mostrou que nem o estímulo com o agonista e nem o bloqueio do receptor com seu antagonista específico modulam o número de células viáveis, sugerindo que a ativação do receptor B1 não interfere no ritmo proliferativo e nem provoca a morte destas células de melanoma. Já no ensaio de migração celular, onde foi feita uma lesão na camada de células Tm5 confluentes, mostrou que o receptor B1 sim exerce influência sobre a mobilidade das células de melanoma.

Ao contrário do anteriormente descrito em células de câncer de próstata por Taub e colaboradores (2003), este experimento mostrou que na presença da DABK, as células de melanoma Tm5 migram 50% menos. O mesmo ensaio foi feito utilizando outra linhagem de melanoma, a B16/F10, e semelhantemente à Tm5, o estímulo com DABK também inibiu a migração destas células. Na realidade, este não é o primeiro relato de que a ativação do receptor B1 consegue inibir a migração celular. Morissette e colaboradores (2006) mostraram que a ativação do receptor B1 inibe a migração de células de músculo liso de artéria humana e de coelho e que este efeito é completamente revertido na presença do antagonista do receptor. No entanto, este é o primeiro relato mostrando que a ativação do receptor B1 inibe a migração de células tumorais.

Para confirmar se o efeito inibitório sobre a migração celular é realmente influenciado pela ativação do receptor B1, foi realizado o tratamento das células Tm5 com o antagonista competitivo, DLBK, para determinar se o mesmo conseguiria reverter o efeito inibitório. Observou-se que o antagonista sozinho promove um aumento na migração das células de melanoma, sugerindo que provavelmente um pouco de agonista do receptor B1 é produzido por estas células ou que o receptor B1 possa apresentar atividade independente de ligante, ou seja, apresentar atividade constitutiva (para revisão ver Leeb-Lundberg et al., 2001). Desta forma, a ativação do receptor B1 parece exercer efeito inibitório sobre a migração dessas células, por isso quando bloqueado, há um aumento na migração pela perda do efeito inibitório. Quando realizado o estímulo com DABK na presença do antagonista, observou-se que existe uma reversão parcial do efeito inibitório exercido pela DABK, sugerindo que a ativação do receptor B1 exerce efeito sobre a migração de células de melanoma, mas parece que existem outras vias que também contribuem de forma direta ou indireta para este efeito.

Ao analisar as imagens destes experimentos de cicatrização dos grupos controle e tratado com DABK, observou-se a existência no grupo controle de um número muito maior de células que se desprendiam do resto e migravam sozinhas para o centro da “lesão”. O trabalho de Meigs e colaboradores (2002) analisou de forma muito parecida, embora em um contexto bastante diferente, este efeito. Esses autores observaram que quando células eram

transfectadas com E-caderina ou promoviam a ativação de vias de sinalização que induziam a expressão desta molécula responsável por junções célula-célula, observaram que o número de células “pioneiras” que migravam sozinhas para o centro da “lesão” diminuía drasticamente. Quando o número destas células “pioneiras” foi quantificado de forma semelhante ao protocolo de Meigs e colaboradores (2002), observou-se que o tratamento com DABK, tanto na linhagem Tm5 quanto na linhagem B16/F10 também foi reduzido drasticamente.

O mecanismo responsável do fenômeno de inibição da migração celular e da redução no número de células capazes de se desprender das demais e migrar de forma “pioneira”, mediado pela ativação do receptor B1, ainda precisa ser elucidado. No entanto, acredita-se que este mecanismo possa estar relacionado com a alteração da expressão de moléculas de superfície envolvidas com adesão e/ou modulação de vias intracelulares relacionadas com migração. Neste sentido, foi avaliada a expressão de CD44, uma molécula de superfície que possui alto nível de expressão em vários tipos de tumores e que está diretamente relacionada com malignidade, conseqüentemente, sua expressão é associada a um prognóstico ruim da doença (Wang et al., 2007). O CD44 é responsável por mediar migração celular e invasão de células tumorais, uma vez que interage com inúmeros componentes da matrix extracelular e também induz a ativação de vias de sinalização relacionadas à migração celular (Konstantopoulos & Thomas, 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual a DABK inibe a migração das células de melanoma parece ser independente de CD44, uma vez que se observou forte marcação positiva para esta molécula tanto nas células Tm5 controle quanto nas que foram estimuladas com DABK.

Outra possibilidade é que a ativação do receptor B1 poderia direta ou indiretamente culminar na inibição das vias de Rho e Rac que controlam diretamente migração celular. Esta hipótese ganha força com o dado da diminuição do número de células “pioneiras” e a associação deste tipo de comportamento à presença de E-caderina, como demonstraram Meigs e colaboradores (2002), pois já foi mostrado que a modulação da atividade destas pequenas proteínas G monoméricas é capaz de regular a adesão célula-célula mediada por caderinas (Kaibuchi et al., 1999). Juntos, estes dados nos fazem cogitar que um dos possíveis mecanismos pelo qual o receptor B1 possa exercer o seu efeito inibitório seja modulando a atividade destas proteínas G monoméricas e através delas induzir a expressão de E-caderinas nas células de melanoma fazendo com que elas diminuam o seu ritmo migratório.

Em virtude deste efeito anti-migratório do receptor B1 nas células de melanoma, levantou-se a possibilidade de que a sua ativação poderia modular também a habilidade destas células de invadir a matrix extracelular. Para testar esta hipótese, foi avaliada a

atividade das enzimas MMP2 e 9 que são enzimas da família das metaloproteases diretamente relacionadas com o processo de invasão tumoral (Chabottaux & Noel, 2007).

Os resultados mostraram que o estímulo das células Tm5 com o agonista e/ou antagonista do receptor B1 não modula a quantidade de substrato degradado pela MMP9. No entanto, não foi possível avaliar a atividade de MMP2, provavelmente por não haver quantidade suficiente desta enzima secretada no sobrenadante das células Tm5 em nenhum dos grupos experimentais. Além disso, observando cuidadosamente o resultado da zimografia, observa-se que a atividade da MMP9 também é bastante discreta em todos os grupos, mesmo no controle, sugerindo que talvez a expressão e secreção de metaloproteases não seja o mecanismo utilizado por estas células para o processo de movimentação/invasão.

De fato, são descritas duas estratégias de movimentação das células tumorais: o tipo de movimento mesenquimal, no qual as células tumorais apresentam morfologia mais alongada e, por isso, dependem da ativação de Rac e de proteólise da matriz extracelular para se locomoverem (MMPs, dentre outras enzimas, são as principais responsáveis por esta degradação de matriz extracelular). O outro tipo de movimento é o amebóide, que é menos dependente da degradação de matriz extracelular, mas depende da ativação da via de Rho-quinase que permite altos níveis de contração de actina-miosina necessários para o movimento semelhante ao de uma ameba (por isso o nome amebóide) (Friedl, 2004; Sanz-Moreno et al., 2008). Sendo assim, nossos dados sugerem que as células de melanoma da linhagem Tm5 provavelmente utilizem a estratégia amebóide de movimentação, uma vez que não encontramos atividade significativa de proteases no sobrenadante da cultura destas células.

A próxima pergunta a ser respondida foi se o receptor B1 exerceria algum papel importante na progressão do tumor *in vivo*. Para respondê-la, primeiro foi necessário estabelecer no laboratório o modelo de melanoma a partir da injeção subcutânea de células Tm5 no dorso de camundongos. Durante este período de padronização do modelo, a existência de duas fases no desenvolvimento dos tumores foi observada: uma inicial de latência, que vai até aproximadamente o 12º dia, e uma fase exponencial mais tardia, onde o tumor apresenta um rápido crescimento. Sendo assim, a investigação de um possível papel do receptor B1 no desenvolvimento de melanoma *in vivo* começou com a análise da expressão deste receptor nos dois estágios da neoplasia. O resultado deste experimento apontou um aumento de 4,5 vezes da expressão do RNA mensageiro do receptor B1 nos tumores da fase exponencial quando comparados com os tumores pequenos na fase de latência, sugerindo um papel importante para o receptor B1 durante a fase aguda de crescimento tumoral. Estes dados corroboram outros trabalhos da literatura que mostram a expressão de receptores do

SCC em muitos tipos de tumores, avaliados tanto em linhagens celulares quanto em biópsias de pacientes (Hermann et al., 1999; Wu et al., 2002). Da mesma forma, a maior expressão do receptor B1 em estágios mais avançados durante a progressão do melanoma poderia ser utilizada como marcador do estágio da doença. De fato, Taub e colaboradores (2003) levantam esta mesma hipótese ao mostrar a expressão do receptor B1 apenas em lesões malignas de próstata. No entanto, essa hipótese precisa ser confirmada em amostras clínicas.

Tendo em vista que a expressão do receptor B1 sofre modulação ao longo do desenvolvimento do melanoma, um experimento foi desenhado de forma a testar a influência da ativação desse receptor na progressão tumoral. Assim, as células tumorais foram estimuladas com o agonista DABK 24 h antes da sua inoculação nos animais, para observar se a ativação do receptor B1 conseguiria “reprogramar” as células tumorais modulando a sua agressividade (Rodrigues-Ferreira et al., 2010). De forma interessante foi observado que os animais que receberam células estimuladas com DABK apresentaram menor incidência de tumores palpáveis e estes eram na maioria das vezes muito pequenos se comparados aos do grupo controle, indicando que provavelmente esses tumores estavam ainda na fase de latência. Além disto, alguns animais permaneceram sem tumores palpáveis por até 150 dias após a inoculação. Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação do receptor B1 diminui a agressividade das células de melanoma *in vivo*.

Este resultado foi bastante surpreendente, especialmente considerando que o receptor B1 está envolvido com modulação de respostas inflamatórias (Calixto et al., 2004), secreção de citonas como IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias (Calixto et al., 2004; Wang et al., 2008). Além disso, é importante salientar que a presença de um microambiente pró-inflamatório é um dos sete eventos associados à tumorigênese e que dados publicados por Correa e colaboradores (2005) mostraram a importância do receptor B1 no microambiente tumoral para mediar a indução da formação de tumores através de mecanismos inflamatórios. Mais precisamente, nesse trabalho, os autores mostraram que a co-injeção de células em apoptose e de um baixo número de células tumorais viáveis (o que normalmente não seria suficiente para que os animais desenvolvessem tumores durante o período de tempo avaliado no experimento) levou a altos índices de aparecimento de tumores em camundongos e, que esta resposta, está associada ao infiltrado inflamatório transiente, composto principalmente por neutrófilos e macrófagos, que se apresenta por causa das células em apoptose. Além disso, quando o experimento foi realizado em animais deficientes para o receptor B1 que apresentam problemas na transmigração de neutrófilos para regiões inflamadas se observou uma significativa diminuição do número de animais com tumores (Pesquero et al., 2000 e Araujo et al., 2001; Correa et al., 2005).

Os dados apresentados no presente trabalho mostraram que a ativação do receptor B1 na célula neoplásica promove uma significativa diminuição no aparecimento de tumores nos animais injetados com essas células. Esses achados fizeram levantar duas possibilidades: a primeira de que a ativação do receptor B1 pudesse modificar estas células tumorais para um padrão “mais imunogênico”, ou seja, que estas células sejam “re-programadas” após a ativação do receptor B1 e se tornassem mais perceptíveis ao sistema imunológico e ele conseguisse então reconhecer e controlar o crescimento destas células (Ostrand-Rosenberg, 2008). A segunda possibilidade foi embasada ainda pelos resultados obtidos nos ensaios de migração celular, de que a ativação do receptor B1 efetivamente diminuísse a agressividade destas células tumorais, possivelmente por mecanismos que envolvam a indução de E-caderina (Chen et al., 1997).

Para tentar compreender melhor o que estaria acontecendo durante a ativação do receptor B1 e que promoveria esta diminuição na incidência de neoplasias nos animais, algumas amostras de tumores foram coletadas, tanto do grupo controle como do grupo que recebeu células tratadas com DABK, sempre preservando o tumor e o seu microambiente para análises histológicas. Estas análises permitiram observar as características e a arquitetura dos tumores nos dois grupos e assim avaliar alguns parâmetros como: ritmo proliferativo, vascularização, capacidade de invasão e infiltrado inflamatório que estão relacionados diretamente com a agressividade dos tumores (Joyce & Pollard 2009).

A primeira característica que foi observada nesta análise histológica foi a diferença entre a grande reação estromal provocada pelo tumor do grupo controle e a pequena, quase inexistente, do tumor previamente estimulado com DABK. O estroma é o tecido de sustentação de todas as nossas estruturas e órgãos, e é composto por tecido conjuntivo, ou seja, principalmente por matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004). Desta forma, uma reação estromal envolve a infiltração de células do sistema imunológico nesta matriz, bem como a presença de fibroblastos que fazem parte e secretam componentes desta matriz, dando origem, neste caso, ao chamado tecido de cicatrização ou tecido fibrótico. Embora ainda não se saiba ao certo de que forma a resposta do hospedeiro influencia na progressão tumoral ou na eliminação deste, são muitos os relatos que associam a presença de um grande infiltrado inflamatório à maior agressividade dos tumores (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2008),

Outra característica marcante na análise histológica dos tumores do grupo controle foi a ausência de bordas definidas, ou seja, os tumores não possuíam uma cápsula bem formada para cercá-los e, assim eram encontradas células neoplásicas invadindo tecidos adjacentes em muitos pontos. Além disto, alguns animais apresentaram não apenas invasão ao tecido

muscular adjacente ao tumor, mas também metástase em linfonodos drenantes (dados não mostrados). Por outro lado, os animais que receberam células tumorais que tiveram o receptor B1 ativado, desenvolveram tumores de menor tamanho, encapsulados e não apresentaram células tumorais em nenhuma outra região que não dentro da cápsula do tumor. Este elemento é de especial importância, pois a presença ou não de uma cápsula que delimite o tumor é outra característica relevante para avaliar a sua agressividade. De forma geral, tumores não encapsulados são mais agressivos e invasivos do que os não encapsulados (Lunevicius et al., 2001; Rivera M et al., 2010).

As análises quantitativas destas amostras histológicas mostram que o número de células em mitose e o número de vasos nos tumores que foram previamente tratados com DABK eram substancialmente menores do que nos tumores formados por células não estimuladas. O ritmo proliferativo e o número de vasos de um tumor são fenômenos que normalmente estão associados e são correlacionados com a malignidade destes tumores (Joyce & Pollard 2009). Na realidade, um elemento viabiliza o outro, ou seja, um alto ritmo proliferativo estimula a formação de novos vasos e estes novos vasos possibilitam a manutenção deste alto ritmo proliferativo sem que as células morram pela falta de nutrientes e oxigenação (Folkman, 2007a; Folkman, 2007b). Quando este processo de retro-alimentação positiva é quebrado, aparecem regiões necróticas sendo indicadoras de maior grau de malignidade (Hockel & Vaupel, 2001; Bottaro & Liotta, 2003; Pennacchietti et al., 2003). No presente modelo, a presença de inúmeras zonas de necrose nas amostras do grupo controle foi observada, o que não acontecia com tanta frequência nos tumores do grupo que recebeu células estimuladas com DABK (dados não mostrados).

Todos estes dados de histologia apontam para uma drástica redução da agressividade dos tumores cujas células foram “re-programadas” pela ativação do receptor B1 *in vitro*. Devido a sua grande importância no processo de angiogênese, o VEGF foi selecionado como possível alvo a ser modulado nesta “re-programação”. Sendo assim, a sua expressão foi avaliada por PCR em tempo real em amostra de tumores de animais que receberam células Tm5 estimuladas ou não com DABK. Embora se esperasse uma redução nos níveis de VEGF do grupo que recebeu células estimuladas com DABK, o resultado desta análise mostrou que não existe modulação na expressão de VEGF entre os dois grupos experimentais. Este dado pode estar relacionado às novas descobertas feitas com relação à função do VEGF na progressão tumoral que colocam a prova o então conhecido papel do VEGF como indutor da angiogênese. Estas descobertas feitas após o inesperado insucesso das terapias anti-VEGF testadas na clínica (Hurwitz et al., 2006; Mayer et al., 2007; Kerbel, 2008), sugerem que este fator de crescimento além do papel de induzir angiogênese também atua como regulador

negativo da maturação de vasos sanguíneos neoformados. Neste contexto, as estratégias anti-VEGF não necessariamente promoveriam a redução dos tumores, assim como tumores menos agressivos não necessariamente apresentariam uma modulação negativa da sua expressão (Greenberg et al., 2008; Vecchiarelli-Federico et al., 2010).

Outro possível mecanismo envolvido na diminuição da agressividade nos tumores “re-programados” pela ativação do receptor B1 é a indução da expressão de E-caderina nas células tumorais, uma vez que o processo de transformação maligna e a TEM induzida por TGF- β promovem uma redução significativa da expressão desta molécula. A base desta hipótese está em que a modulação da expressão desta molécula de adesão está relacionada com o controle da motilidade celular (Meigs et al., 2002), com a transformação maligna de melanócitos em melanomas (Hsu et al., 1996) e com a perda de malignidade de melanomas que tiveram esta molécula re-introduzida (Hsu et al., 2000). Desta forma, quando a expressão de E-caderina foi analisada nos dois grupos experimentais, observamos que os tumores oriundos de células estimuladas com DABK apresentavam níveis mais altos de expressão de E-caderina do que os tumores originados a partir de células não estimuladas. Concordando com isso, foi observada uma diminuição na expressão de TGF- β , outro indício de redução da malignidade destes tumores “re-programados”, pois esta é a principal citocina envolvida na indução da TEM, etapa importante para aumento da agressividade e capacidade metastática das células tumorais (Fidler 2002; Gavert & Bem-Ze’ev, 2008; Polyak & Weinberg, 2009)

Inúmeros trabalhos relatam a conexão entre câncer e inflamação, embora ainda seja discutido qual é causa e qual é consequência, ou seja, se o câncer gera uma resposta inflamatória do hospedeiro tentando controlar o crescimento tumoral ou se o próprio tumor promove a infiltração de células do sistema imune e aproveita-se de um microambiente inflamatório, rico em citocinas e fatores de crescimento para progredir (Blackwill & Mantovani 2001; Mantovani et al., 2008; Mantovani, 2009). Por causa desta estreita conexão entre inflamação e câncer, foi avaliado o infiltrado inflamatório existente nos tumores do grupo controle e em aqueles estimulados com DABK. Foi observado que o número de células do sistema imunológico infiltrando os tumores do grupo controle era muito superior ao encontrado nas células do grupo tratado com DABK. Neste contexto, e considerando as fases que compõem ao chamado fenômeno de “imuno-edição dos tumores”: eliminação, equilíbrio e escape (Dunn et al., 2004), pode-se especular que os tumores dos animais que receberam as células tumorais não estimuladas estariam já na fase de escape, onde os tumores se mostram bem pouco imunogênicos e parecem se aproveitar da formação de um microambiente inflamatório, enquanto que os tumores cujas células foram previamente estimuladas com o agonista de B1 parecem encontrar-se em uma fase de eliminação ou equilíbrio, onde existem

algumas células infiltradas, especialmente da imunidade inata, mas o microambiente aparece menos invadido ou “inflamado”, sugerindo que o sistema imunológico do animal conseguiu controlar o desenvolvimento do tumor.

Uma análise mais cuidadosa das populações celulares do infiltrado peri-tumoral mostrou a existência de um grande número de neutrófilos e macrófagos nos tumores do grupo controle (que receberam células não estimuladas), enquanto que o número destas células da imunidade inata nos tumores formados a partir de células estimuladas com DABK foi significativamente menor. Mantovani e colaboradores (2008) revisaram o papel destas células inflamatórias na tumorigênese, mostrando que quimiocinas, citocinas e prostaglandinas produzidas pelas células tumorais conseguem recrutar diferentes tipos de células inflamatórias, dentre elas: macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células supressoras mielóides (Gabrilovich et al, 2007). Estas células de alguma forma são ativadas e também passam a secretar citocinas e quimiocinas que podem recrutar mais células inflamatórias, promovendo um processo de retro-alimentação positiva. Em última instância este fenômeno está relacionado com proliferação e sobrevivência das células tumorais, e a TEM (em que as células neoplásicas transformam-se morfológicamente adquirindo um fenótipo mais agressivo Gavert & Bem-Ze'ev, 2008; Polyak & Weinberg, 2009); angiogênese e linfogênese, migração e invasão das células tumorais, metástase e evasão da resposta imune (Koebel et al., 2007). Desta forma, possivelmente os tumores formados a partir de células de melanoma que tiveram o receptor B1 ativado não conseguem estabelecer este processo de retro-alimentação positiva com as células do sistema imune impedindo que passem para a fase de escape, e em consequência, tornando-os menos agressivos.

Trabalhos recentes relatam que não apenas células do sistema imune inato contribuem na tumorigênese, mas que linfócitos T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ também exercem papéis fundamentais na progressão tumoral. Nagaraj e colaboradores (2007) mostraram que a modificação do complexo formado pelo TCR (receptor de célula T) e a molécula de superfície CD8 do linfócito T pela adição de nitrogênio a resíduos de tirosina (nitração) compromete a resposta específica das células T CD8⁺ pois impede que o complexo TCR - CD8 se ligue ao complexo MHC-peptídeo, sendo esse um dos mecanismos pelos quais as células tumorais conseguem evadir a citotoxicidade dos linfócitos T CD8⁺. Além disto, DeNardo e colaboradores (2009) mostraram que linfócitos T CD4⁺ são fundamentais para o processo de metástase pulmonar de carcinoma mamário, pois atuam aumentando as propriedades pró-tumorais de macrófagos. Considerando isto, procedeu-se a quantificação de linfócitos infiltrados na região peri-tumoral e foi observado que nos tumores controle existem linfócitos presentes nessa região, mas que o número é drasticamente menor nos tumores

formados a partir de células estimuladas com DABK. Considerando a hipótese de que os tumores do grupo controle estariam na fase de escape do sistema imunológico e os tumores estimulados com DABK na fase de equilíbrio, poderíamos especular que os linfócitos presentes nos tumores do grupo controle representariam uma tentativa do hospedeiro de controlar o já incontrolável crescimento da massa tumoral. Outra possibilidade é que este tumor já modificado e selecionado para ser pouco imunogênico possa utilizar não apenas células da imunidade inata a seu favor, mas também células da imunidade adaptativa.

Outro parâmetro avaliado para tentar explicar a diferença de agressividade encontrada nas células de melanoma não estimuladas e nas que foram “re-programadas” pela ativação do receptor B1 foi a secreção de algumas citocinas por estas células. Foram selecionadas para análise as citocinas IL-6 (pró-inflamatória), IL-10, citocina anti-inflamatória e característica de padrão de resposta Th2, e TNF α , citocina pró-inflamatória que sabidamente estimula o crescimento tumoral (Abbas & Lichtman, 2005). Nestas análises as células de melanoma Tm5 não secretaram níveis detectáveis no ELISA de nenhuma das citocinas avaliadas. No entanto, quando estimuladas com DABK níveis de IL-6 foram detectados e este efeito foi especificamente mediado pela ativação do receptor B1, uma vez que foi bloqueado pela administração de DLBK, antagonista do receptor B1. A secreção de IL-6, após o estímulo do receptor B1, foi atribuída a um efeito indireto da ativação deste receptor, pois uma vez ativado, ele promove a translocação do fator de transcrição NF κ B para o núcleo e assim induz a produção de IL-1 β (Wang et al., 2008) que por sua vez é capaz estimular a secreção de IL-6 (Fan et al., 2009).

O papel de IL-6 na tumorigênese ainda não está bem estabelecido. Considera-se que logo que as primeiras células sofrem a transformação maligna, estas células tumorais precisam evadir a resposta imune, ou seja, precisam ficar “invisíveis” para sobreviverem a imuno-vigilância do hospedeiro (Dunn et al., 2004; Ostrand-Rosenberg, 2008); possivelmente, células tumorais que secretem uma citocina pró-inflamatória desde o princípio, não consigam passar despercebidas pelas células da imunidade inata, recrutando macrófagos e neutrófilos. Esta ativação de células da primeira linha de defesa do hospedeiro poderia culminar na morte das células tumorais por fagocitose ou pela liberação de espécies reativas de oxigênio, ou mesmo induzir a formação de uma resposta da imunidade adaptativa (Abbas & Lichtman, 2005). Já foi descrito que dependendo do padrão da resposta adaptativa desenvolvido, o tumor pode ser eliminado ou progredir. Por exemplo, um microambiente tumoral predominantemente Th1 (com altos níveis de IFN γ) está associado à eliminação dos tumores, enquanto que a inibição deste padrão de resposta e a presença de um microambiente

tumoral com características de respostas do tipo Th2, Th17 ou de células T regulatórias parecem contribuir para a progressão dos tumores (Ostrand-Rosenberg, 2008).

Além disto, as análises realizadas com amostras dos dois grupos experimentais, mostraram uma maior expressão de IFN- γ nos tumores formados a partir de células estimuladas com o agonista do receptor B1. Embora outros parâmetros precisam ser avaliados, este resultado sugere fortemente que os tumores estimulados com DABK estejam em uma fase diferente do processo de imuno-edição dos tumores não estimulados. Isto porque níveis mais elevados de IFN- γ estão relacionados com as fases de eliminação e de equilíbrio da imuno-edição, enquanto que a diminuição dos níveis desta citocina é característica da fase de escape. Além disto, a secreção de IFN- γ é parte do padrão Th1 de resposta e este tipo de resposta parece favorecer a eliminação dos tumores, conforme descrito anteriormente.

Além de avaliar a secreção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α pelas células tumorais, e a expressão de IFN- γ nas amostras de tumor dos animais, também foram medidos os níveis das três primeiras citocinas no soro dos animais, mas não foi possível detectar nenhuma das citocinas pelos métodos empregados, em concordância com o observado nos ensaios *in vitro*.

Juntos, estes resultados sugerem que as duas hipóteses propostas e que os mecanismos sugeridos nelas para tentar explicar o fenômeno observado *in vivo* contribuem de forma semelhante. Assim, como pode ser observado na Figura 39, as análises realizadas apontam que a ativação do receptor B1 tanto poderia aumentar a imunogenicidade das células Tm5, fazendo com que o sistema imunológico do hospedeiro consiga controlar o seu crescimento, quanto diminuir a sua agressividade, ou seja, com menor ritmo de crescimento, com menor motilidade e menor capacidade de invasão. Embora em um primeiro momento pareçam hipóteses independentes, estes dois eventos não são mutuamente excludentes, muito pelo contrário, possivelmente o aumento da imunogenicidade influencia na agressividade dos tumores e vice-versa.

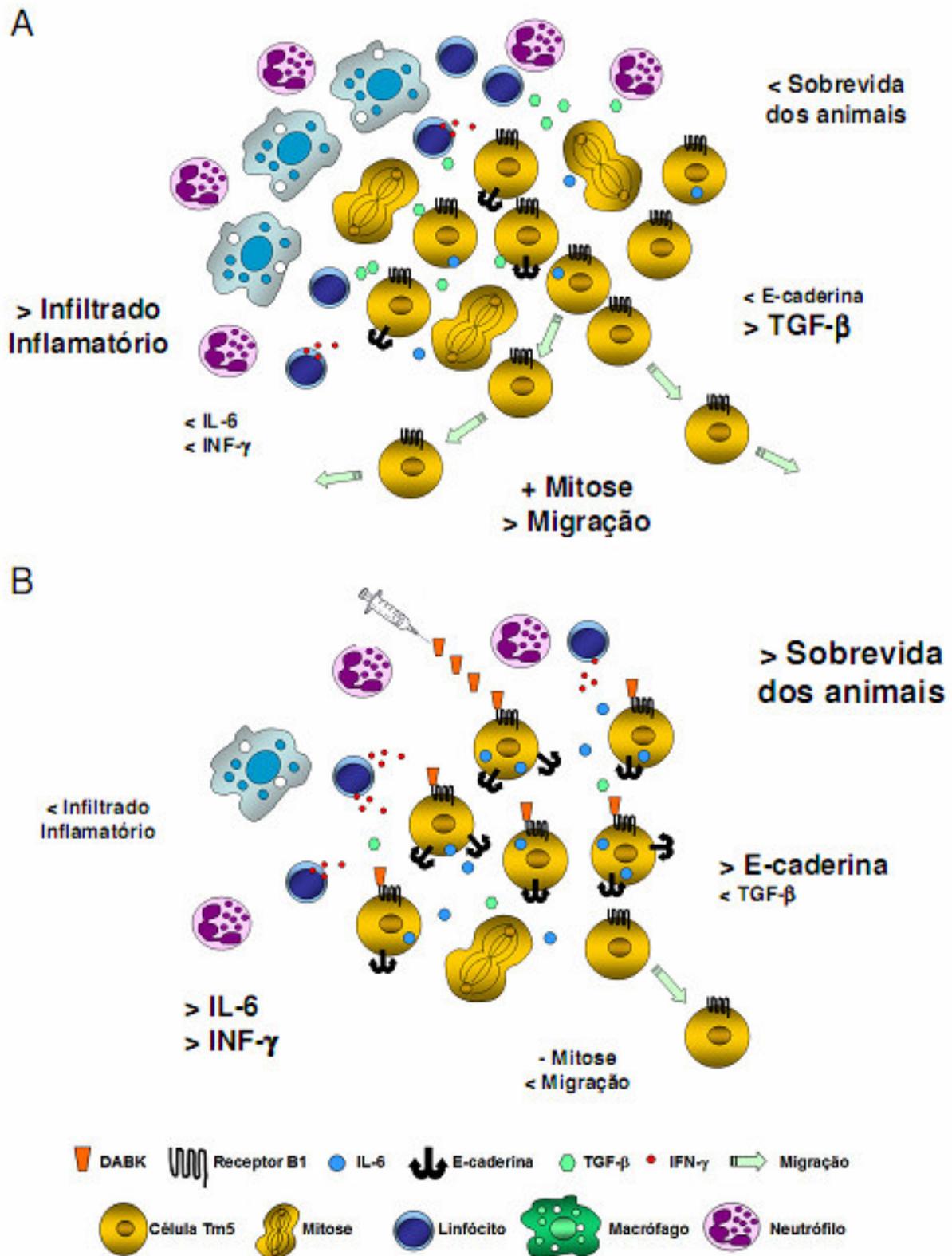


Figura 39: Esquema dos mecanismos envolvidos na perda de agressividade dos tumores formados a partir de células estimuladas com o agonista do receptor B1. A) Tumor na fase de escape formado a partir de células da linhagem Tm5 controle (não estimuladas), no

qual observa-se maior infiltrado inflamatório peri-tumoral, menor expressão de IL-6 e IFN- γ , maior expressão de TGF- β e conseqüente redução da expressão de E-caderina, maior ritmo proliferativo e maior capacidade de migração. B) Tumor na fase de eliminação ou equilíbrio, formado a partir de células da linhagem Tm5 estimuladas com DABK 1 μ M por 24 h, no qual observa-se menor infiltrado inflamatório peri-tumoral, maior expressão de IL-6 e IFN- γ , menor expressão de TGF- β e maior expressão de E-caderina, menor ritmo proliferativo e menor capacidade de migração. DABK – desArg⁹-bradicinina.

Todos estes resultados que são considerados interessantes e promissores levantaram a questão de que o efeito anti-tumoral do receptor B1 encontrado na linhagem Tm5 possivelmente poderia ser visto também em outras linhagens celulares de melanoma. Por isto, foi realizado o mesmo ensaio *in vivo*, utilizando o mesmo desenho experimental, mas agora com células da linhagem de melanoma murino B16/F10. Observou-se que o estímulo de células B16/F10 com o agonista do receptor B1 não foi capaz de “re-programar” as células desta linhagem de forma semelhante ao que foi observado com as células da linhagem Tm5. Este resultado demonstra que muitas partes deste fenômeno ainda precisam ser caracterizadas. Em outras palavras, possivelmente as linhagens B16/F10 e Tm5 tenham um padrão de expressão de moléculas de superfície, citocinas, quimiocinas, dentre tantas outras moléculas, que justifiquem a diferença de comportamento entre as duas linhagens frente à “re-programação” induzida pela ativação do receptor B1. De fato, as duas linhagens têm características bem diferentes. Por exemplo, enquanto Tm5 é uma linhagem de tumor primário, ou seja, que sofreu uma diferenciação maligna da linhagem de melanócito Mela-a, por causa da imposição de uma pressão seletiva de sobrevivência sem adesão (Oba-Shinjo et al., 2006); a B16/F10 é uma linhagem de melanoma que sofreu 10 ciclos de seleção de metástase pulmonar, ou seja, é uma linhagem de melanoma metastática, mais agressiva (Fidler & Kripke, 1977). Neste caso, podemos cogitar a possibilidade de que a ativação do receptor B1 na linhagem B16/F10 apesar de conseguir inibir a migração celular e inibir o número de células “pioneiras”, não foi suficiente para impedir o estabelecimento dos tumores destas células tão agressivas *in vivo*. Sendo assim, futuras terapias anti-tumorais tendo como alvo o receptor B1 devem ser utilizadas contra alguns tipos de melanoma, especialmente aqueles em estágios iniciais ou de menor agressividade.

Este resultado evidencia a importância de compreender a biologia multifatorial dos tumores, pois uma vez determinados os fatores que tornam uma determinada linhagem susceptível à perda da agressividade pela “re-programação” promovida via ativação do

receptor B1, poderiam ser desenhadas estratégias que tenham como mecanismo de ação a ativação desse receptor.

Embora não exista nenhum outro relato correlacionando a ativação do receptor B1 a um efeito protetor contra tumores, é interessante lembrar também de alguns resultados obtidos em trabalhos que avaliam o efeito de inibidores da ECA na progressão tumoral. Isto porque a ECA é o ponto central entre os sistemas renina-angiotensina e calicreínas-cininas e, sendo assim, qualquer interferência neste ponto central, induz alterações em ambos os sistemas. O fato é que muitos trabalhos em modelos animais, assim como relatos clínicos de pacientes hipertensos tratados com inibidores da ECA ou com outros tipos de anti-hipertensivos mostraram que o bloqueio desta enzima exerce papel anti-tumoral (Lever et al., 1998; Williams et al., 2005).

Por ser um ponto comum e central entre os dois sistemas, podemos dizer que a ECA teria dois “braços”: o braço do SRA e o braço do SCC e que a administração de inibidores desta enzima faz com que pare de ser formado a angiotensina II no braço SRA e com que pare a degradação da BK em metabólitos inativos no braço SCC. Neste panorama, e com base em trabalhos que demonstram que tanto o receptor AT_1 do SRA (Fujita et al., 2002; Miyajima et al., 2002), quanto o receptor B2 do SCC (Ishihara et al., 2001; Ishihara et al., 2002; Ikeda et al., 2004) possuem papel importante na progressão tumoral; foi proposto que o efeito anti-tumoral observado com a inibição da ECA seria mediado pela menor disponibilidade de angiotensina II e conseqüentemente menor ativação do receptor AT_1 e não por mecanismos mediados pela maior disponibilidade de BK, até porque a sua ação já havia sido demonstrada como pró-tumoral (via receptor B2).

No entanto, os resultados aqui apresentados sugerem que o braço SCC também pode contribuir para o efeito anti-tumoral da inibição da ECA, pois mostraram propriedades anti-tumorais do receptor B1. Sendo assim, o aumento dos níveis de BK induzidos pela inibição desta enzima pode não necessariamente significar um aumento na ativação do receptor B2, mas sim servir de substrato para carboxi-peptidases que retirem a arginina terminal da BK, originando o ligante preferencial do receptor B1. Esta hipótese está amparada no trabalho de Zhang e colaboradores de 2008 (a), que mostra um mecanismo efetivo de desvio da sinalização via receptor B2 para o receptor B1.

Além disto, Ignjatovic e colaboradores (2002) demonstraram de forma muito elegante que muitos inibidores da ECA conseguem interagir com o receptor B1 e ativá-lo diretamente e que esta ativação consegue mediar uma série de respostas características da ativação do receptor B1 após estímulo com os seus clássicos ligantes peptídicos (Ignjatovic et al., 2004; Stanisavljevic et al., 2006). Desta forma, o efeito anti-tumoral exercido pelos inibidores da

ECA poderia também ser atribuído ao efeito da ativação do receptor B1, que neste caso pode ocorrer tanto pela maior disponibilidade do seu agonista endógeno, quanto pela sua ativação direta do receptor pelos inibidores da ECA.

Embora este seja o primeiro relato mostrando a ativação do receptor B1 com efeitos anti-tumorais em alguns subtipos de melanoma, Schulze-Topphoff e colaboradores (2009) também mostraram que a ativação do receptor B1 tem efeito protetor em esclerose múltipla, uma doença inflamatória crônica. Considerando que o câncer apresenta também características de uma doença inflamatória e de acordo com os dados mostrados neste trabalho de que a ativação do receptor B1 inibe o desenvolvimento dos tumores *in vivo* e a migração das células tumorais *in vitro*, acreditamos que o receptor B1 poderia ser um alvo para o desenvolvimento de fármacos anti-tumorais, ou mesmo para uma nova utilização de fármacos amplamente utilizados, como é o caso dos anti-hipertensivos inibidores da ECA. Certamente mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos por trás deste efeito protetor, bem como identificar outros tipos de melanoma que seriam susceptíveis a esta estratégia terapêutica.

6. Conclusões

Conclui-se que o sistema caliceínas-cininas, através do receptor B1, exerce um importante papel na progressão de tumores de pele do tipo melanoma e que a ativação deste receptor tem efeito anti-tumoral sobre a linhagem de melanoma Tm5, diminuindo a agressividade destas células através da inibição da migração celular, redução na incidência e crescimento tumoral e, conseqüentemente, aumentando a sobrevida dos animais.

7. Referências Bibliográficas

- Aaronson AS (1991) Growth factors and cancer. *Science*, 254: 1146-1153;
- Abadir PM, Periasamy A, Carey RM, Siragy HM (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*, 48: 316-22;
- Abbas K & Lichtman AH (2005) *Imunologia celular e molecular*. 5° edição. Elsevier, Rio de Janeiro;
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66: 1-9;
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Muschel RJ (2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine*, 6: 100-102;
- Andoh T, Akira A, Saiki I, Kuraishi Y (2009) Bradykinin increases the secretion and expression of endothelin-1 through kinin B2 receptors in melanoma cells. *Peptides*, *in press*;
- Araujo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M (2001) Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biological Chemistry*, 382: 91-95;
- Baba K & Yamaguchi O (2001) Effects of bradykinin on cytoplasmic calcium and motility in murine bladder tumor cells. *The Journal of Urology*, 165: 259-262;
- Bakhom SF, Thompson SL, Manning AL, Compton DA (2009) Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nature Cell Biology*, 11: 27- 35;
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A (2001) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 3622-3634;
- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, Queirolo P, Vermi W, Facchetti F, Moretta A, Moretta L, Mingari MC, Vitale M (2009) Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 20847-20852;

- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444: 756-760;
- Barki-Harrington L, Bookout AL, Wang G, Lamb ME, Leeb-Lundberg LMF, Daaka Y (2003) Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. *The Biochemical Journal*, 371: 581-587;
- Barth A, Wanck LA, Morton DL (1995) Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *Journal of the American College of Surgeons*, 181: 193-201;
- Bernards R & Weinberg RA (2002) A progression puzzle. *Nature*, 418: 823;
- Bhoola KD, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, Dlamini Z, Naicker S (2001) Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 382: 77-89;
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V, Hayward N, Trent J (2000) Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 406: 536-540;
- Blackwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357: 539-545;
- Blaukat A, Herzer K, Schroeder C, Bachmann M, Nash N, Muller-Esterl W (1999) Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*, 38: 1300-1309;
- Bockmann S & Paegelow I (2000) Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 68: 587-592;
- Bogenrieder T & Herlyn M (2002) Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intracellular communication in the progression of melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 44: 1-15;
- Boissonnas RA, Guttmann S, Jaquenoud PA, Konzett H, Stuermer E (1960) Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia*, 16: 326;
- Borrego CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 4: 876-890;

- Borgoño CA, Kishi T, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP (2006) Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12: 1487-1493;
- Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, Hess JF (1995) Target disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 13706-13710;
- Bottaro & Liotta (2003) Out of air is not out of action. *Nature*, 423: 593-595
- Braga VMM, Machesky LM, Hall A, Hotchin NA (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *The Journal of Cell Biology*, 137: 1421-1431;
- Brunius G, Domeij H, Gustavsson A, Yucel-Lindberg T (2005) Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Peptides*, 126: 183-188;
- Burch RM & Axelrod J (1987) Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: Evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 6374-6378;
- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British Journal of Pharmacology*, 143: 803-818;
- Campos ACE, Molognoni F, Melo FHM, Galdieri LC, Carneiro CRW, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG (2007) Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte Anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia*, 9: 1111-1121;
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10: 105-115;
- Chabottaux V & Noel A (2007) Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clinical & Experimental Metastasis*, 24: 647-656;
- Chan D, Gera L, Stewart J, Helfrich B, Verella-Garcia M, Johnson G, Baron A, Yang J, Puck T, Bunn Jr P (2002) Bradykinin antagonist dimmer, CU201, inhibits the growth of human lung cancer cell lines by a "biased agonist" mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 4608-4613;

- Chan W & White PD (2003) Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. New York: Oxford University Press;
- Chee J, Naran A, Misso NL, Thompson PJ, Bhoola KD (2008) Expression of tissue and plasma kallikreins and kinin B1 and B2 receptors in lung cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 389: 1225-1233;
- Chen W & Obrink B (1991) Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restricts invasive behavior of L-cells. *The Journal of Cell Biology*, 114: 319-327;
- Chen H, Paradies NE, Fedor-Chaikin M, Brackenbury R (1997) E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *Journal of Cell Science*, 110: 345-356;
- Chen BC, Yu CC, Lei HC, Chang MS, Hsu MJ, Huang CL, Chen MC, Shen JR, Chen TF, Chen TL, Inoue H, Lin CH (2004) Bradykinin B2 receptor mediates NF κ B activation and cyclooxygenase-2 expression via the Ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 173: 5219-5228;
- Chen Z, Tan F, Erdos EG, Deddish PA (2005) Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension*, 46: 1368-1373;
- Colditz GA, Sellers TA, Trapido E (2006) Epidemiology – identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Reviews Cancer*, 6: 75-83;
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Gerlanda C, Mantovani A (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30: 1073-1081;
- Correa M, Machado J, Carneiro CRW, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, Jasiulionis MG (2005) Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *International Journal of Cancer*, 114: 356-363;
- Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parieras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, Souza PP (2008) Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *International Immunopharmacology*, 8: 135-142;
- Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, 103: 481-490;
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptor in pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 429: 161-176;

- Dai DL, Martinka M, Li G (2005) Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 1473-1482;
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417: 949-954;
- Davis CL, Naeem S, Phagoo SB, Campbell EA, Urban L, Burgess GM (1996) B1 bradykinin receptor and sensory neurons. *British Journal of Pharmacology*, 118: 1469-1476;
- Davis AE (2004) Biological effects of C1 inhibitor. *Drug News & Perspectives*, 17: 439-446
- de Agostini A, Lijnen HR, Pixley RA, Colman RW, Schapira M (1984) Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C1-inhibitor. *Journal of Clinical Investigation*, 73: 1542-1549;
- de Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 7: 256-269;
- DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM (2009) CD4⁺ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 16: 91-102;
- Deshayes F, Nahmias C (2005) Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16: 293-299;
- de Visser KE, Eichten A, Coussens (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6: 24-37;
- DharS, Bhargava R, Yunes M, Li B, Goyal J, Naber SP, Wazer DE, Band V (2001) Analysis of normal epithelial cell specific-1 (NES1)/kallikrein 10 mRNA expression by in situ hybridization, a novel marker for breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 7: 3393-3398;

- Dixon BS, Evanoff D, Fang WB, Dennis MJ (2002) Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1. *American Journal Cell Physiology*, 283: 193-203;
- Dlamini Z, Raidoo D, Bhoola K (1999) Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in oesophageal carcinoma. *Immunopharmacology*, 43: 303-310;
- Dlamini Z & Bhoola KD (2005) Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 58: 915-922;
- Donnenberg VS & Donnenberg AD (2005) Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 45: 872-877;
- Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7: 79-94;
- Dray A & Perkins MN (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in Neuroscience*, 16: 99-104;
- Drouin JN, Gaudreau P, St-Pierre SA, Regoli D (1979) Structure-activity studies of [des-Arg9]-bradykinin on the B1 receptor of the rabbit aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 57: 562-566;
- Duka A, Duka I, Gao G, Shenouda S, Gavras I, Gavras H (2006) Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 291: 268-274;
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annual Reviews Immunology*, 22: 329-360;
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6: 836-848;
- Easton AS & Abbott NJ (2002) Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain Research*, 953: 157-169;
- Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS (2009) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 15:232-239;

- Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, Ishii M, Akagi T, Ikeda H, Matsuishi T, Imaizumi T (2003) Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *Journal of Clinical Investigation*, 112: 67-75;
- Ehrenfeld PE, Millan C, Matus CE, Figueroa JE, Burgos RA, Nualart F, Bhoola KD, Figueroa CD (2006) Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. *Journal of Leukocytes Biology*, 80: 117-124;
- Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C (2003) Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systemic review of 41 randomised clinical trials. *The Lancet Oncology*, 4: 748-759;
- Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, Zone JJ, Cannon-Albright LA, Samlowski WE, Leachman SA (2006) Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families. *American Journal of Clinical Dermatology*, 126: 660-666;
- Elliott DF, Horton EW, Lewis GP (1960) Actions of pure bradykinin. *The Journal of Physiology*, 153: 473-480;
- Elliott DF, Horton EW, Lewis GP (1961) The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood. *Biochemical Journal*, 78: 60-65;
- Erdos EG & Sloane EM (1962) An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochemical Pharmacology*, 11: 582-592;
- Fan Y, Yu Y, Shi Y, Sun W, Xie M, Ge N, Mao R, Zhang A, Xu G, Schneider MD, Zhang H, Fu S, Qin J, Yang J (2009) Lysine 63-linked polyubiquitination of transforming growth factor- β -activated kinase 1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor α and interleukin-1 β -induced I κ B kinase/nuclear factor- κ B and c-JUN N-terminal kinase/activator protein 1 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *in press*;
- Fathy DB, Mathis SA, Leeb T, Leeb-Lundberg LMF (1998) A single position in the third transmembrane domains of the human B1 and B2 bradykinin receptors is adjacent to and discriminates between the C-terminal residues of subtype-selective ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 12210-12218;
- Faussner A, Proud D, Towns M, Bathon JM (1998) Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization and signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 2617-2623;
- Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM (2007) Toward a molecular classification of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 1606-1620;

- Fidler IJ, Kripke ML (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197: 893-895;
- Fidler IJ (2002) The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer*, 3: 453-458;
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 18: 1182-1186;
- Folkman J (2007a) Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *Journal of Pediatric Surgery*, 42: 1-11;
- Folkman J (2007b) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 273- 286;
- Friedl P (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 14-23;
- Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Itoman M, Majima M (2002) Blockade of angiotensin AT₁a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 441-447;
- Fujita M, Andoh T, Ohashi K, Akira A, Saiki I, Kuraishi Y (2009) Roles of kinin B1 and B2 receptors in skin cancer pain produced by orthotopic melanoma inoculation in mice. *European Journal of Pain*, *in press*;
- Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Schreiber H.(2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*, 67: 425;
- Gao J, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, Clements JA (2007) Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer. *Prostate*, 67: 348-360;
- Gavard J & Gutkind S (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 11: 1223-1234;
- Gavert N & Ben-Ze’ev A (2008) Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine*, 14: 199-209;
- Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E (2009) Localized and reversible TGF β signaling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature Cell Biology*, 11:1287-1296;

- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293: 876-880;
- Greaves M (2007) Darwinian medicine: a case for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7: 213-221;
- Greco S, Muscella A, Elia MG, Romano S, Storelli C, Marsigliante S (2004) Mitogenic signalling by B2 bradykinin receptor in epithelial breast cells. *Journal of Cellular Physiology*, 201: 84-96;
- Greco S, Elia MG, Muscella A, Romano S, Storelli C (2005) Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. *Journal of Endocrinology*, 186: 291-301;
- Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Chersesh DA (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456: 809-813;
- Gupta GP & Massagué J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127: 679-695;
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279: 509-514;
- Hanahan D & Weinberg (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70;
- Hart IR, Fidler IJ (1980) Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Research*, 40: 2281-2287;
- Hayashi N & Cunha GR (1991) Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Research*, 51: 4924-4930;
- Hecquet C, Tan F, Marcic BM, Erdös EG (2000) Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Molecular Pharmacology*, 58: 828-836;
- Hermann A, Arnhold M, Kresse H, Neth P, Fink E (1999) Expression of components of the kallikrein-kinin system in human cell lines. *Immunopharmacology*, 45: 135-139;
- Hockel M Vaupel P (2001) Biological consequences of tumor hypoxia. *Seminars in Oncology*, 28: 36-41;
- Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M (1996) Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1: 188-194;

- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M (2000) E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *American Journal of Pathology*, 156: 1515-1525;
- Hurwitz HI, Honeycutt W, Haley S, Favaro J (2006) Long-term treatment with bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer: case report. *Clinical Colorectal Cancer*, 6: 66-69;
- Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdos EG (2002) Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors. Direct activation of bradykinin B1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 16847-16852;
- Ignjatovic T, Stanisavljevic S, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdos EG (2004) Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. *Molecular Pharmacology*, 66: 1310-1316;
- Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, Yamazaki A, Endo H, Ishihara K, Yamashina S, Tsutsumi Y, Matsubara H, Majima M (2004) Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Research*, 64: 5178-5185;
- Ishihara K, Hayashi I, Yamashina S, Majima M (2001) A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 87: 318-326;
- Ishihara K, Kamata M, Hayashi I, Yamashina S, Majima M (2002) Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor. *International Immunopharmacology*, 2: 499-509;
- Jasiulionis MG, Luchessi AD, Moreira AG, Souza PPC, Suenaga APM, Correa M, Costa CAS, Curi R, Costa-Neto CM (2006) Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. *Cell Biochemistry and Function*, 25: 109-14;
- Joyce JA & Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 9: 239-252;
- Junqueira LC & Carneiro J (2004) *Histologia Básica*. 10ª Edição. Editora Guanabara koogan, Rio de Janeiro;
- Kahn R, Hellmark T, Leeb-Lundberg LMF, Akbari N, Todiras M, Olofsson T, Wieslander J, Christensson A, Westman K, Bader M, Muller-Esterl W, Karpman D

- (2009) Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin. *The Journal of Immunology*, 182: 7906-7915;
- Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by Rho family GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*, 11: 591-596;
 - Kao JPY, Harootunian AT, Tsiens RY (1989) Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by Fluo-S. *The journal of Biological Chemistry*, 264: 8179-8184;
 - Karamysheva AF (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 73: 751-762;
 - Kasper B, D'Hondt V, Vereecken P, Awada A (2007) Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62: 16-22;
 - Kath R, Jambrosic JA, Holland L, Rodeck U, Herlyn M (1991) Development of invasive and growth factor-independent cell variants from primary human melanomas. *Cancer Research*, 51: 2205-2211;
 - Kerbel RS (2008) Tumor angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 358: 2039-2049;
 - Kerr MA & Kenny AJ (1974) The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochemical Journal*, 137: 489-495;
 - Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 352 : 786-792
 - Koebel CM, Vermi W, Swann J, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450: 903-907;
 - Konstantopoulos K, Thomas SN (2009) Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11: 177-202;
 - Koong AC, Denko NC, Hudson KM, Schindler C, Swiersz L, Koch C, Evans S, Ibrahim H, Le QT, Terris DJ, Giaccia AJ (2000) Candidate genes for the hypoxia tumor phenotype. *Cancer Research*, 60: 883-887;
 - Leeb-Lundberg LMF, Kang DS, Lamb ME, Fathy DB (2001) The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity. Roles of

residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 8785-8792;

- Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*, 57: 27-77;
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JÁ, Harris AL (2000) Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *Journal of Pathology*, 190: 430-436;
- Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JWK (1998) Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *The Lancet*, 352: 179-184;
- Li J, Rehli M, Timblin B, Tan F, Krause SW, Skidgel RA (2002) Structure of the human carboxypeptidase M gene. Identification of a proximal GC-rich promoter and a unique distal promoter that consists of repetitive elements. *Gene*, 284: 189-202;
- Li-Juan Q, Yan-Ting G, Hua Z, Yi-Xue X (2009) Bradykinin-induced blood-tumor barrier opening is mediated by tumor necrosis factor- α . *Neuroscience Letters*, 450: 172-175;
- Lilja H, Ulmert D, Bjork T, Becker C, Serio AM, Nilsson JA, Abrahamsson PA, Vickers AJ, Berglund G (2007) Long-term prediction of prostate cancer up to 25 years before diagnosis of prostate cancer using prostate kallikreins measured at age 44 to 50 years. *Journal of Clinical Oncology*, 26: 431-436;
- Liotta LA & Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature*, 411:375-379;
- Liu L, Xue Y, Liu Y, Wang Y (2008) Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occluding, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *Journal of Neuroscience Research*, 86: 1153-1168;
- Liu T & Boykins RA (1989) Hydrolysis of proteins and peptides in a hermetically sealed microcapillary tube: high recovery of labile amino acids. *Analytical Biochemistry*, 182: 383-387;
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25: 402-408;
- Lübke J, Reichel M, Burg G, Kleihues P (1994) Absence of p53 gene mutations in cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 102: 819-821;

- Lundwall A & Brattsand M (2008) Kallikrein-related peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 2019-2038;
- Lunevicius R, Nakanishi H, Ito S, Kozaki K, kato T, Tatematsu M, Yasui K (2001) Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127: 193-199;
- MacKie RM, Reid R, Junor B (2003) Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *The New England Journal of Medicine*, 348:567-568;
- Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature*, 276: 523-526;
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454: 436-444;
- Mantovani A (2009) Inflaming metastasis. *Nature*, 457: 36-37;
- Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR (2006) Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 126: 422-431;
- Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg F (1996) B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single culture vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*, 50: 128-139;
- Matsukado K, Sugita M, Black KL (1998) Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B2 receptors in malignant gliomas. *Brain Research*, 792: 10-15;
- Mayer EL, Lin NU, Burstein HJ (2007) Novel approaches to advanced breast cancer: bevacizumab and lapatinib. *The Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 5: 314-323;
- McAloose D & Newton AL (2009) Wildlife cancer: a conservation perspective. *Nature Reviews Cancer*, 9: 517-526;
- McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K (1991) Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 7724-7728;
- McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A (2000a) Kinin B1 receptor and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovascular Research*, 48: 194-210;

- McLean PG, Ahluwalia A, Perretti M (2000b) Association between kinin B1 receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *The Journal of Experimental Medicine*, 192: 367-380;
- Meigs TE, Fedor-Chaikin M, Kaplan DD, Brackenbury R, Casey PJ (2002) Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *The journal of Biological Chemistry*, 277: 24594-24600;
- Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994) Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 21583-21586;
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6: 924-935;
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436: 518-524;
- Mintz B & Illmensee K (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72:3585-3589
- Miyajima A, Kosaka T, Asano T, Asano T, Seta K, Kawai T, Hayakawa M (2002) Angiotensin II type I antagonist prevents pulmonary metastasis of murine renal cancer by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 62: 4176-4179;
- Molina L, Matus CE, Astroza A, Pavicic F, Tapia E, Toledo C, Perez JA, Nualart F, Gonzalez CB, Burgos RA, Figueroa CD, Ehrenfeld P, Poblete MT (2009) Stimulation of the bradykinin B1 receptor induces the proliferation of estrogen-sensitive breast cancer cells and activates the ERK1/2 signaling pathway. *Breast Cancer Research and Treatment*, 118: 499-510;
- Moreau ME, Bawolak MT, Morissette G, Adam A, Marceau F (2006) Role of NFκB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*, 71: 949-56;
- Morissette G, Sabourin T, Adam A, Marceau F (2006) Inhibition of human and rabbit arterial smooth muscle cell migration mediated by the kinin B1 receptor: role of receptor density and released mediators. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84: 1107-1119;

- Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8⁺ T cell tolerance in cancer. *Nature Medicine*, 13: 828-835;
- Naraba H, Ueno A, Kosugi Y, Yoshimura M, Murakami M, Kudo I, Oh-ishi S (1998) Agonist stimulation of B1 and B2 kinin receptors causes activation of the MAP kinase signaling pathway, resulting in the translocation of AP-1 in HEK 293 cells. *FEBS Letters*, 435: 96-100;
- Naumov GM et al., (2002) Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Research*, 62: 2162-2168;
- Nawa H, Kitamura N, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S (1983) Primary structure of bovine liver low molecular weight kininogen precursors and their mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 90-94;
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, 9: 274-284;
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of Cell Biology*, 147: 631-643;
- Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammass R, Jasiulionis MG (2006) Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia*, 8: 231-241;
- Oliveira EB, Souza LL, Sivieri DO, Bispo-da-Silva LB, Pereira HJV, Costa-Neto CM, Souza MV, Salgado COM (2007) Carboxypeptidase B and other kininases of the rat coronary and mesenteric arterial bed perfusates. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 293: 3550-3557;
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research*, 59: 5002-5011;
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carrey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinoma promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121: 335-348;
- Ostrand-Rosenberg S (2008) Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18: 11-18;
- Packer RJ, Krailo M, Mehta M, Warren K, Allen J, Jakacki R, Villablanca JG, Chiba A, Reaman G (2005) A phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin with

radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer*, 104: 1968-1974;

- Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 15:220-331.
- Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP (2007) Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Letters*, 249: 61-79;
- Pampalakis G & Sotiropoulou G (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1776: 22-31;
- Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, Browning DD, Ye RD (1996) Bradykinin stimulates NFκB activation and interleukin 1β gene expression in cultured human fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 98: 2042-2049;
- Pan ZK, Christiansen SC, Ptaszniak A, Zuraw BL (1999) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activity for bradykinin stimulation of NFκB activation in cultured human epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 9918-9922;
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2004) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3: 895-902;
- Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH (2000) The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Méd Today*, 6: 324-329;
- Parking DM, Pisani P, Muñoz N, Ferlay J (1999) *Infections and human cancer*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*, 3: 347-361;
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva Jr JA, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory response in mice lacking kinin B1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 8140-8145;
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3: 639-650;
- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P,

Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS (2003) High frequency of BRAF mutation in nevi. *Nature Genetics*, 33: 19-20;

- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer*, 9: 265-273;
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P (2002) Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B2 receptors. *Journal of Cellular Physiology*, 193: 275-286;
- Prados MD, Schold SC JR SC, Fine HA, Jaeckle K, Hochberg F, Mechtler L, Fetell MR, Phuphanich S, Feun L, Janus TJ, Ford K, Graney W (2003) A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 5: 96-103;
- Prezas P, Arlt MJE, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Kruger A, Magdolen V (2006a) Overexpression of human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6 and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 387: 807-811;
- Prezas P, Scorilas A, Yfanti C, Viktorov P, Agnanti N, Diamandis E, Talieri M (2006b) The role of human kallikreins 7 and 8 in intracranial malignancies. *Biol Chem*, 387: 1607-1612;
- Rajasagi M, von Au A, Singh R, Hartmann N, Zöller M, Marhaba R (2009) Anti-CD44 induces apoptosis in T lymphoma via mitochondrial depolarization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *in press*;
- Regoli D, Barabe J, Park WD (1977) Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Canadian Journal of Physiology*, 55: 855-867;
- Regoli D, Marceau F, Barabe J (1978) De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 56: 674-677;
- Regoli D, Barabé J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 32: 1-46;
- Reverter D, Maskos K, Tan F, Skidgel RA, Bode W (2004) Crystal structure of human carboxypeptidase M, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity. *Journal of Molecular Biology* 338: 257-269;
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70: 401-410;

- Rivera M, Ricarte-Filho J, Patel S, Tuttle M, Shaha A, Shah JP, Fagin JA, Ghossein RA (2010) Encapsulated thyroid tumors of follicular cell origin with high grade features (high mitotic rate/tumor necrosis): a clinicopathologic and molecular study. *Human Pathology*, 41: 172-180;
- Rocha-e-Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G (1949) Bradykinin, a hipotensive smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsine. *American Journal of Physiology*, 156: 261-273;
- Rodrigues-Ferreira S, Di Tommaso A, Dimitrov A, Cazaubon S, Gruel N, Colasson H, Nicolas A, Chaverot N, Molinié V, Reyat F, Sigal-Zafrani B, Terris B, Delattre O, Radvanyi F, Perez F, Vicent-Salomon A, Nahmias C (2009) 8p22 MTUS1 gene product ATIP3 is a novel anti-mitotic protein underexpressed in invasive breast carcinoma of poor prognosis. *PLoS One*, 4:e7239;
- Rodrigues-Ferreira S, Dillenburg-Pilla P, Costa-Neto CM, Nahmias C (2010) Angiotensin II increases brain metastasis of breast carcinoma. *Manuscript in preparation*;
- Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ (1996) Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Ver*, 76: 69-125;
- Rothschild BM, Tanke D, Hershkovitz I, Schultz M (1998) Mesozoic neoplasia: origins of haemangioma in the Jurassic age. *The Lancet*, 351: 1862;
- Rothschild BM, Witzke B, Hershkovitz I (1999) Metastatic cancer in the Jurassic. *The Lancet*, 354: 398;
- Rui-Cheng J (2008) Lymphatic endothelial cells, lymphodematous lymphogenesis, and molecular control of edema formation. *Lymphatic research and biology*, 6: 123-137;
- Ryu B, Kim DS, DeLuca AM, Alani RM (2007) Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS ONE*, 7: e594
- Sahai E, Marshall CJ (2003) Differing modes of tumor cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signaling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology*, 5: 711-719;
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ (2008) Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*, 135: 510-523;

- Schanstra JP, Bataille E, Castaño MEM, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL (1998) The B1-agonist [desArg¹⁰]-kallidin activates transcriptional factor NFκB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 101: 2080-2091;
- Schulze-Topphoff U, Prat A, Prozorovski T, Siffrin V, Paterka M, Herz J, Bendix I, Ifergan I, Schadock I, Mori MA, Horssen JV, Schroter F, Smorodchenko A, Han MH, Bader M, Steinman L, Aktas O, Zipp F (2009) Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. *Nature Medicine*, 15: 788-793;
- Schwartzburd PM (2003) Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22: 95-102;
- Semple JW & Freedman J (2010) Platelets and innate immunity. *Cellular and Molecular Life Science*, 67: 499-511;
- Shan SJC, Scorilas A, Katsaros D, Diamandis EP (2007) Transcriptional upregulation of human tissue kallikrein 6 in ovarian cancer: clinical and mechanistic aspects. *British Journal of Cancer*, 96: 362-372;
- Skeggs Jr LT, Kahn JR, Shumway NP (1956) The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*, 103: 295-299;
- Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdos EG (1984) Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*, 5: 769-776;
- Skidgel RA & Erdos EG (2004) Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides*, 25: 521-525;
- Skidgel RA & Erdos EG (2007) Structure and function of human plasma carboxipeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *International Immunopharmacology*, 7: 1888-1899;
- Smith GR & Missailidis S (2004) Cancer, inflammation and the AT₁ and AT₂ receptors. *Journal of Inflammation*, 1:1-12;
- Spackman DH, Stein WH, Moore S (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Analytical Chemistry*, 30: 1190-1206;

- Srinivasan D, Kosaka AH, Daniels DV, Ford APDW, Bhattacharya A (2004) Pharmacological and functional characterization of bradykinin B2 receptor in human prostate. *European Journal of Pharmacology*, 504: 155-167;
- Stanisavljevic S, Ignjatovic T, Deddish PA, Brovkovich V, Zhang K, Erdos EG, Skidgel RA (2006) Angiotensin I-Converting enzyme inhibitors block PKC ϵ by activating bradykinin B1 receptor in human endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316: 1153-1158;
- Stephan C, Jung K, Nakamura T, Yousef GM, Kristiansen G, Diamandis EP (2006) Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. *International Journal of Urology*, 13: 238-243;
- Stevens G, McKay, MJ (2006) Dispelling the myths surrounding radiotherapy for treatment of cutaneous melanoma. *Lancet Oncology*, 7: 575-583;
- Stewart JM, Gera L, Chan DC, York EJ, Simkeviciene V, Bunn Jr PA, Taraseviciene-Stewart L (2005) Combination cancer chemotherapy with one compound: pluripotent bradykinin antagonists. *Peptides*, 26: 1288-1291;
- Stockman C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JI, Cheresch DA, Johnson RS (2008) Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, 456: 814-818;
- Sugarbaker PH (1993) Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastasis from colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 3: 158-160;
- Takagaki Y, Kitamura N, Nakanishi S (1985) Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 8601-8609;
- Tan F, Chan SJ, Steiner DF, Schilling JW, Skidgel RA (1989) Molecular cloning and sequencing of the cDNA for human membrane-bound carboxypeptidase M. Comparison with carboxypeptidases A, B, H, and N. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 13165-13170;
- Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LMF, Madden JF, Daaka Y (2003) Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Research*, 63: 2037-2041;
- Timblin B, Rehli M, Skidgel RA (2002) Structural characterization of the human carboxypeptidase D gene and its promoter. *International Immunopharmacology*, 2: 1907-1917;
- Tomakidi P, Mirancea N, Fusenig NE, Herold-Mende C, Bosch FX, Breitkreutz D. (1999) Defects in the basement membrane and hemi-desmosomes structure correlates

with malignant phenotype and stromal interactions in HaCaT-Ras xenografts. *Differentiation*, 64: 263-275;

- Vecchiarelli-Federico LM, Cervi D, Haeri M, Li Y, Nagy A, Ben-David Y (2010) Vascular Endothelial Growth Factor—A Positive and Negative Regulator of Tumor Growth. *Cancer Research*, 70: 863-867;
- Vendrell J, Querol E, Avilés FX (2000) Metalloproteinases and their protein inhibitors structure, function and biomedical properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477: 284-298;
- Veveris-Lowe TL, Lawrence MG, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, et al (2005) Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 12: 631-643;
- Wang PH, Campanholle G, Cenedeze MA, Feitoza CQ, Gonçalves GM, Landgraf RG, Jancar S, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Câmara NO. (2008) Bradykinin [corrected] B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*, 3: e3050;
- Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LYW (2007) Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck*, 29: 550-558;
- Wang Y & Liu Y (2009) Bradykinin selectively modulates the blood-tumor barrier via calcium-induced calcium release. *Journal of Neuroscience Research*, 87: 660-667;
- Warren K, Jakacki R, Widemann B, Aikin A, Libucha M, Packer R, Vezina G, Reaman G, Shaw D, Krailo M, Osborne C, Cehelsky J, Caldwell D, Stanwood J, Steinberg SM, Balis FM (2006) Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 58: 343-347;
- Weis SM, Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 437: 497-504;
- Weiss L (1990) Metastatic inefficiency. *Advances in Cancer research*, 54: 159-211;
- Werle E, Trautshold I, Leysath G (1961) Isolation and structure of kallidin. *Physiological Chemistry*, 326: 174-176;
- Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA (2005) Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an

angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *EJSO*, 31: 1042-1050;

- Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto Y, Nakagawa T, Miyakawa K, Muller-Esterl W, Maeda H (2002) Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *International Journal of Cancer*, 98: 29-35;
- Yang HYT, Erdos EG, Levin Y (1970) A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214: 374-376;
- Yang HYT, Erdos EG, Levin Y (1971) Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II angiotensin I converting enzyme). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 177: 291-300;
- Yousef GM, Magklara A, Diamandis EP (2000a) KLK12 is a novel serine protease and a new member of the human kallikrein gene family-differential expression in breast cancer. *Genomics*, 69: 331-341;
- Yousef GM, Chang A, Diamandis EP (2000b) Identification and characterization of KLK-L4, a new kallikrein-like gene that appears to be down-regulated in breast cancer tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 11891-11898;
- Yu H, Levesque MA, Clark GM, Diamandis EP (1998) Prognostic value of prostate-specific antigen for women with breast cancer: a large United States cohort study. *Clinical Cancer Research*, 4: 1489-1497;
- Zhang X, Tan F, Zhang Y, Skidgel RA (2008a) Carboxypeptidase M and kinin B1 receptor interact to facilitate efficient B1 signaling from B2 agonists. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 7994-8004.
- Zhang W, Bholo N, Kalyankrishna S, Gooding W, Hunt J, Seethala R, Grandis JR, Siegfried JM (2008b) Kinin B2 receptor mediates induction of cyclooxygenase-2 and is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas. *Molecular Cancer Research*, 6: 1946-1956;
- Zhu GG, Hulfang X, Mohan VP, Tanaka K, Tyagi S, Tsen F, Salgame P, Chan J (2003) Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. *Cellular Microbiology*, 5: 445-453;

8. Anexo



Participation of kallikrein–kinin system in different pathologies

Claudio M. Costa-Neto*, Patrícia Dillenburg-Pilla, Tassiele A. Heinrich, Lucas T. Parreiras-e-Silva, Marília G.A.G. Pereira, Rosana I. Reis, Pedro P.C. Souza

Department of Biochemistry and Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

Received 30 June 2007; received in revised form 1 August 2007; accepted 2 August 2007

KEYWORDS

Kinin;
Bradykinin;
Pathologies;
Diseases;
Inflammation;
Cancer;
Tumor;
Cardiovascular;
Renal;
Central nervous system

Abstract

The general description of kinins refers to these peptides as molecules involved in vascular tone regulation and inflammation. Nevertheless, in the last years a series of evidences has shown that local hormonal systems, such as the kallikrein–kinin system, may be differently regulated and are of pivotal importance to pathophysiological control. The combined interpretations of many recent studies allow us to conclude that the kallikrein–kinin system plays broader and richer roles than those classically described until recently. In this review, we report findings concerning the participation of the kallikrein–kinin system in inflammation, cancer, and in pathologies related to cardiovascular, renal and central nervous systems.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first report concerning the kallikrein–kinin system (KKS) dates to 1928 from Frey and coworkers, when they reported the hypotensive effect of human urine when injected into the blood stream of dogs [1,2]. Few years later, the discovery

of that principle in the pancreas resulted in the name kallikrein (from kallikreas: pancreas in Greek). Eugen Werle in 1937, performing assays with kallikrein mixed to blood serum, concluded that probably a new substance should be generated, which was capable of contracting isolated guinea pig ileum. The actions of that substance were similar to those of kallikrein, but it presented a lower molecular weight and it was thermostable; and therefore it was concluded that it was a polypeptide, firstly named DK [3] and later on kallidin. Bradykinin (BK) was first reported in 1949 by Rocha-e-Silva and coworkers, who described a potent vasodilation agent released from plasma using the venom from the Brazilian snake *Bothrops jararaca* [4]. Subsequent studies showed that kallikrein could also be found in many other tissues, foreseeing what decades later would be discovered: the

Abbreviations: KKS, Kallikrein–kinin system; BK, bradykinin; DABK, des-Arg⁷-BK; NO, nitric oxide; CNS, central nervous system; ACE, angiotensin converting enzyme; COX-2, cyclooxygenase-2; NF- κ B, nuclear factor-kappa B.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3261; fax: +55 16 3633 6840.

E-mail address: claudio@fmp.usp.br (C.M. Costa-Neto).

participation of the KKS in a great diversity of pathophysiological processes.

Kinins are classically known as peptides that participate in vascular and inflammatory events. Such peptides are generated by action of kallikreins over kininogens and act by binding to two receptor types, namely B_1 and B_2 , which belong to the G-protein coupled receptor family. In contrast to B_2 receptors that are constitutively expressed in a variety of cells under physiological conditions, B_1 receptors are generally absent or low expressed in healthy tissues, but their expression rapidly increases under pathological conditions [5,6] or by exposure to B_1 receptor agonists [7].

The peptides BK and kallidin (Lys-BK) have higher affinity to the B_2 receptor. The action of carboxypeptidases over those peptides generate the active metabolites des-Arg⁹-BK (DABK) and Lys-DABK, which have higher affinity to B_1 receptor. Stimulation of both receptors after agonist binding leads to the classical G-protein activation and also the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which culminates in the transcription of a series of other genes involved in later responses [2].

In the last years many evidences have shown that the KKS has crucial participation in different pathological states, such as those described in the next pages.

2. Cardiovascular diseases

The KKS is an important mediator of pathophysiological conditions of the cardiovascular system. It has been shown that BK is able to cause a significative decrease in heart rate and blood pressure [8], probably due to NO production after B_2 receptor activation [9]. The B_1 receptor has also been shown to participate in hypotensive responses in some mammalian species after induction of infection [10–12].

Both kinin receptors have been shown to be expressed in cardiomyocytes and cardiac conduction tissue [8,13]. Chahine and coworkers [14] showed that B_1 activation reduces sympathetic outflow, effect that corroborates with the proposed protective activity of DABK in ischemia/reperfusion injury. After myocardial infarct induction in rats, which leads to an ischemic process, B_1 receptor expression is rapidly up-regulated [15]. It has also been shown that about 24 h after myocardial infarct kinins have an important contribution in expression of cytokines [16,17]. After myocardial infarct, plasma levels of kallikrein, kininogen and BK are increased, events that correlate with the survival rate of post-myocardial infarct patients [18].

Several studies have shown that kinins exert cardioprotective effects on myocardial infarct and heart failure, such as reduction of both left ventricular hypertrophy and progression of heart failure [19–22]. The protective effects of BK are mainly mediated by B_2 receptor due to NO production by endothelial cells [23,24], induction of anti-proliferative effects on fibroblasts [25,26] and antihypertrophic effects on cardiomyocytes [27,28]. Yao and coworkers [29] showed that kallikrein infusion in rats for 7 days after myocardial infarct induction improved cardiac function, normalized left ventricular wall thickness, and reduced macrophage infiltration in the infarcted heart. As those effects of kallikrein were all blocked by icatibant, a selective B_2 receptor antagonist, it indicates the B_2 receptor

as an important player in protection against heart failure [30,31].

Regarding to cardiac fibrosis, transgenic rats expressing the human kallikrein gene which were induced to diabetes showed the left ventricle function preserved [32]. Furthermore, in a similar model, it was shown that left ventricle contractile dysfunction is attenuated after experimental myocardial infarction [33]. Administration of exogenous B_1 or B_2 receptor agonists in an ischemia model of isolated rat heart reduced infarct damaged area, effect that was counteracted by selective antagonists [34], showing participation of both kinin receptors in cardioprotective processes.

During the process of preconditioning to ischemia, the KKS is activated and improves cardioprotective effects of kinins by activation of both kinin receptors [35,36]. While B_2 receptor activation leads to reduced arrhythmias [37], reduced infarcted area [38] and improvement of post-ischemic ventricular recovery [39], B_1 activation seems to be important to protect the endothelial function in coronary resistance arteries [40], to inhibit noradrenaline overflow and to prevent ventricular fibrillation in reperfusion [14].

A recent study in a model of pressure overload-induced cardiac hypertrophy showed that B_2 receptor signaling improves cardiac function and protects against the development of cardiac hypertrophy, effects that were mediated by NO formation [41]. KKS may also be involved in evolution of other cardiovascular diseases. It was recently shown that a plasma kallikrein inhibitor attenuated symptoms of hereditary angioedema, what might become an interesting therapy for this disease [42].

3. Renal diseases

Renal diseases present several characteristics, including inadequate filtration of proteins (proteinuria), apoptosis, inflammatory cells recruitment, and accumulation of extracellular matrix proteins in the interstitium [43]. Oxidative stress is also an important factor in renal injury because it can stimulate the expression of proinflammatory and profibrotic molecules [44].

The role of KKS in renal protection by suppression of reactive oxygen species production has been showed to be mediated by B_2 receptor activation [45,46]. Chao and coworkers [47] demonstrated that kinins have a direct effect on the protection of salt-induced renal injury by suppression of oxidative stress, TGF- β expression and MAPK activation, with no effect on blood pressure. Tissue kallikrein has also been reported to attenuate salt-induced renal damage by activation of B_2 receptors [45,48]. Corroborating with that, the B_2 receptor antagonist icatibant abolished the kallikrein's protective effects [48]. The participation of this receptor in the protective effect against renal injury was also evidenced in B_2 receptor knockout mice [49,50]. In addition, a human B_2 receptor gene polymorphism has been demonstrated in patients with chronic renal failure, suggesting a role of this receptor in the early development of this pathology [51].

Ischemic acute renal failure can occur in patients with hypertension, diabetes, and atherosclerosis [52]. The involvement of KKS in this pathology was partially demonstrated using ACE inhibitors, resulting in reduced acute tissue damage caused by ischemia/reperfusion in kidneys [53,54].

It was also shown that the beneficial effects of ACE inhibitors were mainly due to activation of NO cascade [55–57] as a result of B₂ receptor activation. In addition, B₂ receptors antagonists and NO synthase blockers markedly attenuated the protective effects of ACE inhibitors [55,56,58]. Chronic treatment with ACE inhibitors induces B₁ receptor expression in vasculature and in the kidney; and therefore, B₁ receptor renal expression might also be associated to the renoprotective effects of ACE inhibitors [59].

Diabetic nephropathy occurs in approximately 30% of all patients with diabetes [60]. Transgenic mice super-expressing ACE, which showed a decrease in BK concentration without changes in angiotensin II levels, presented severe renal complications in a diabetic induced model [61,62], suggesting the involvement of KKS in this pathology. Also, human tissue kallikrein gene delivery efficiently attenuated insulin resistance and prevented diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [63].

Unilateral renal obstruction in mice and rats is a well-established experimental model to study tubulointerstitial fibrosis. The protective role of BK in unilateral renal obstruction was suggested by Morrissey and coworkers [64]; and Schanstra and coworkers using this model in B₂ knockout mice demonstrated that BK has antifibrotic properties [50].

4. Inflammation

Since its discovery, BK was demonstrated to induce the four classical signals of inflammation (heat, redness, swelling and pain) when injected in human or animal tissues [65]. Nowadays, it is well established that kinins are rapidly generated after tissue injury and that the endogenous kinins have a pivotal role in the development and maintenance of inflammatory processes.

The activation of both B₁ and B₂ receptors is importantly involved in both acute and chronic inflammation. The majority of the effects observed in acute inflammation such as vasodilation, edema, pain, hyperalgesia and smooth muscle contraction, seems to be related to B₂ receptor activation. In chronic inflammatory processes, B₁ receptor plays an important role, enhancing or substituting the B₂ receptor described actions [66–71].

The activation of B₂ receptor leads to transduction of various signaling pathways, and most of the final released substances are cytokines and other inflammatory mediators, such as eicosanoids [72–76]. Activation of B₂ receptors induces a rapid release of eicosanoids, and a late release of prostaglandin E₂ [77], probably by up-regulation of COX-2 [78]. This event was primarily attributed only to B₂ receptor activation, but recent findings suggest that B₁ receptor is also involved, mainly acting in synergism with cytokines [79].

The correlation among kinins, immune cells and cytokines has been demonstrated by different groups. Plasma kallikrein, tissue kallikrein, high and low molecular weight kininogens have been localized in neutrophils [80], and seem to be involved on diapedesis and control of vascular permeability by local generation of kinins. Also, kinin receptors may be involved in chemotaxis of such cells [81,82]. The ability of BK to activate NF- κ B strongly evidences the link between BK and cytokines. The expression of many cytokines is mediated by this factor, and importantly

the B₁ receptor expression is also regulated by this transcriptional factor [83,84]. The correlation among kinins, TNF- α and IL-1 β is also observed in prostaglandin biosynthesis in osteoblasts, involving up-regulation of COX-2 [79].

The classical model of rat paw edema has been extensively used to study the participation of KKS in inflammation. In this model, the constitutive expression of B₂ receptor and its participation in acute inflammation, and the up-regulation of B₁ receptor by mRNA levels analysis and functional experiments were described. The pre-treatment of these animals with lipopolysaccharide, either local or systemic, leads to an increase of the responsiveness to B₁ receptor agonist injection and up-regulation of its mRNA levels [70].

5. Cancer

Differential expression of KKS components in neoplasias has been widely described [85–87], pointing to an important contribution of this system in tumorigenesis. Moreover, kinins as inflammatory mediators which cause vasodilation and vascular permeability, contribute to invasion, metastasis and immune cells recruitment.

The role of human tissue kallikreins in tumor progression is not completely elucidated, but some of the mechanisms have already been described, such as the direct extracellular matrix degradation [88], cleavage of hormones, growth factors and other substrates, including kininogen [89]. Additionally, Wolf and coworkers [90] using tissue kallikrein inhibitors, demonstrated suppression of breast cancer cells invasiveness in *in vitro* and *in vivo* invasion assays. Connections between KKS and prostate cancer have been extensively studied since 1980, when a kallikrein called prostate-specific antigen, known as PSA, was introduced as a biologic marker leading to a substantial increase in early-stage diagnosis. Nowadays, many of these serine proteases, such as kallikrein 4 (KLK4/hK4), kallikrein 2 (KLK2/hK2) and kallikrein 11 (KLK11/hK11) which are also differentially regulated in prostate neoplasias, have been targeted as potential biomarkers to use in diagnosis, prognosis and monitoring the disease [91–93], for a recent review see Ref. [87].

Although most of the importance has been attributed to kallikreins in tumor growth and progression, kinin receptors also have their own role. Accordingly, suppression of tumor growth and angiogenesis has been demonstrated by using B₂ antagonist [94] and in kininogen knockout animals [95]. Wu and coworkers [96] had previously described the contribution of B₂ receptor in modulation of vascular permeability in a mice model of Sarcoma 180, and Srinivasan and coworkers functionally characterized kinin receptors in human prostate [97]. Moreover, BK has been directly involved in endothelial cell proliferation *via* B₂ receptor, or indirectly *via* B₁ receptor [98,99], pointing to a participation in angiogenesis stimulation, a crucial process for tumor growth. Besides that, Greco and coworkers demonstrated that BK activated the MAPK pathway in human breast cancer cells [100,101].

Concerning brain tumor development, in astrocytome condition, immunolabelled B₂ and B₁ receptors have been identified in astrocytic, endothelial and tumor cells [102].

Brain tumors treatment present singular features when compared to other neoplasias, such as radiotherapy resistance and inefficient chemotherapy, due to the blood–brain-barrier. Kinin receptors became valuable targets in this scenario as B₂ receptor expression was shown to be up-regulated in tumors, brain-surrounding-tumor and blood–brain–tumor-barrier. Intracarotid infusion of low doses of B₂ agonist selectively increased delivery of substances to tumor area [103]. In an *in vitro* study Easton and Abbott presented results that suggest the participation of calcium and 5-lipoxygenase in BK-induced blood–brain-barrier permeability [104]. Intravenous infusion of B₂ synthetic agonist RMP-7 as adjuvant in Carboplatin chemotherapy to childhood brain tumors [105], recurrent gliomas [106], and also associated to radiotherapy in children with newly diagnosed brainstem gliomas [107] have been tested.

6. Central nervous system diseases

The large distribution of the KKS components in the central nervous system (CNS) indicates the functional importance of this system [108]. It has been shown that BK is able to influence cerebrovascular resistance, vessels capacitance and permeability of the blood–brain-barrier under physiological and pathological conditions. Infusion of BK in cerebral blood vessels can increase the vascular permeability, which is mediated by NO due to activation of endothelial B₂ receptors [109]. Concerning B₁ receptor, labeling of this receptor was detected mainly after injury [110]. The control of vascular permeability is a critical process to the maintenance of CNS integrity. The acute state of schizophrenia involves the increase of neurovascular permeability and the development of autoimmune reactions due to easier access of antigens. Shcherbakova and coworkers [111] suggested the participation of the KKS in this process as the acute state of the schizophrenia was accompanied by the activation of components of this system.

Another pathology that involves the regulation of the immune system in CNS is neuropsychiatric lupus. The mechanisms regulating such pathogenesis have not been elucidated yet, but central or systemic originated inflammatory mediators have been shown to be of pivotal importance [112]. In this pathology, the involvement of the KKS was shown by Dellalibera-Joviliano and coworkers [113], detecting increased levels of kininogen, kallikreins and ACE in plasma and cerebrospinal fluid of patients.

The Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterized by deposition of extracellular insoluble amyloid plaques in the brain and its blood vessels [114]. It was shown that BK improves the β -amyloid peptide formation (one of the components of the amyloid plaques) and that this peptide can also stimulate the release of kinins [115]. It has been also suggested that serine proteases could have a major participation in the establishment of this disease; and accordingly, kallikrein 6 (KLK6/hK6) was localized in brain tissues of patients with Alzheimer's disease [116] and described to have its concentration altered in the cerebrospinal fluid [117]. More recently, kallikreins 7 and 10 (KLK7/hK7 and KLK10/hK10, respectively) were also reported to have its concentration altered in patients with Alzheimer disease [118].

Epileptic syndrome is a common chronic neurologic disorder that affects 1% to 2% of the population [119]. Studies investigating the participation of the KKS in epileptic seizures have recently emerged. In models of experimental epilepsy induced by either kainate or electrical stimulation, it was observed that activation of B₁ receptors leads to an overflow of glutamate in the hippocampus, and hence participating in the CNS hyperexcitability [120]. In epileptic seizures induced by pilocarpine it was observed an up-regulation on the expression levels of both kinin receptors and also a change in the distribution of these receptors in the CNS [121]. Ongali and coworkers [122] showed that the B₁ receptor level was up-regulated in the hippocampus after kindled seizures using the temporal lobe epilepsy model of electrical stimulation of amygdala. Studies carried out with knockout mice for the B₁ or the B₂ receptor showed that the B₂ knockout animals presented seizures with shorter latency and increased mortality of hippocampal cells [123]. On the other hand, the B₁ knockout animals had an increased latency and diminished hippocampus and amygdala cell death, as compared to the control mice [123]. Our group showed that an increase in the hippocampal mRNAs for the B₁ and B₂ receptors correlated with audiogenic kindling in a model of temporal lobe epilepsy, possibly with a role in a kininergic neurotransmission, as inflammatory mediators were not up-regulated [124].

7. Final remarks

Different strategies, such as the use of classical pharmacology, molecular biology and transgenic animals, as well as the availability of high specificity antagonists, resulted in important data that in the last years uncovered the relevant participation of the KKS in different pathological processes. Those discoveries highlight the kinin receptors and the proteins involved on their functional regulation as potential new targets for treatment of different pathologies, such as inflammation, cancer, cardiovascular, renal, central nervous system diseases, and many others still to be investigated.

Acknowledgments

We are thankful to the São Paulo State Research Foundation (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). CMCN holds a CNPq Research Fellowship.

References

- [1] Erdős EG. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein, vol. XXV. Germany: Springer-Verlag; 1970.
- [2] Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27–77.
- [3] Werte E. Über den aktivitätszustand des kallikreins der bauchspeicheldrüse und ihres äusseren sekretes beim hund. *Biochem Z* 1937;290:129–34.

- [4] Rocha-e-Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949;156:261–73.
- [5] Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998;16:385–401.
- [6] McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 2000;48:194–210.
- [7] Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, et al. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1998;101:2080–91.
- [8] Ribuot C, Godin D, Couture R, Regoli D, Nadeau R. In vivo B2-receptor-mediated negative chronotropic effect of bradykinin in canine sinus node. *Am J Physiol* 1993;265:H876–9.
- [9] Tirapelli CR, Bonaventura D, de Oliveira AM. Functional characterization of the mechanisms underlying bradykinin-induced relaxation in the isolated rat carotid artery. *Life Sci* 2007;80:1799–805.
- [10] Regoli D, Marceau F, Lavigne J. Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* 1981;71:105–15.
- [11] McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg9bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br J Pharmacol* 1999;128:275–82.
- [12] Siebeck M, Whalley ET, Hoffmann H, Weipert J, Fritz H. The hypotensive response to des-Arg9-bradykinin increases during E. coli septicemia in the pig. *Adv Exp Med Biol* 1989;247B:389–93.
- [13] Gouin L, Cardinal R, Adam A, Drapeau G, Nadeau R. Kinin-induced prolongation of action-potential duration in right ventricular muscle from rat: involvement of B1 and B2 receptors. *Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:337–43.
- [14] Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, Nadeau R. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *Br J Pharmacol* 1993;108:318–22.
- [15] Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, Spillmann F, Wendorf M, Leitner E, et al. Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 2000;129:1537–8.
- [16] Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, Browning DD, Ye RD. Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 1996;98:2042–9.
- [17] Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett* 1989;247:189–92.
- [18] Hashimoto K, Hamamoto H, Honda Y, Hirose M, Furukawa S, Kimura E. Changes in components of kinin system and hemodynamics in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1978;95:619–26.
- [19] Schölkens BA, Linz W, König W. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril, in isolated ischaemic rat heart are abolished by a bradykinin antagonist. *J Hypertens Suppl* 1988;6:S25–8.
- [20] McDonald KM, Mock J, D'Alota A, Parrish T, Hauer K, Francis G, et al. Bradykinin antagonism inhibits the antigrowth effect of converting enzyme inhibition in the dog myocardium after discrete transmural myocardial necrosis. *Circulation* 1995;91:2043–8.
- [21] Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest* 1997;99:1926–35.
- [22] Wollert KC, Studer R, Doerfer K, Schieffer E, Holubarsch C, Just H, et al. Differential effects of kinins on cardiomyocyte hypertrophy and interstitial collagen matrix in the surviving myocardium after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1997;95:1910–7.
- [23] Groves P, Kurz S, Just H, Drexler H. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation* 1995;92:3424–30.
- [24] Kitakaze M, Node K, Minamino T, Asanuma H, Ueda Y, Kosaka H, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases the nitric oxide levels in canine ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2461–6.
- [25] McAllister BS, Leeb-Lundberg LM, Javors MA, Olson MS. Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. *Arch Biochem Biophys* 1993;304:294–301.
- [26] Van Zoelen EJ, Peters PH, Afink GB, Van Genesen S, De Roos DG, Van Rotterdam W, et al. Bradykinin-induced growth inhibition of normal rat kidney (NRK) cells is paralleled by a decrease in epidermal-growth-factor receptor expression. *Biochem J* 1994;298:335–40.
- [27] Ishigai Y, Mori T, Ikeda T, Fukuzawa A, Shibano T. Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1997;273:H2659–63.
- [28] Rosenkranz AC, Dusting GJ, Ritchie RH. Hyperglycaemia abolishes the antihypertrophic efficacy of bradykinin in rat ventricular myocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:519–21.
- [29] Yao YY, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein infusion prevents cardiomyocyte apoptosis, inflammation and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Regul Pept* 2007;140:12–20.
- [30] Tondangu D, Hittinger L, Ghaleh B, Le Corvoisier P, Sambin L, Champagne S, et al. Chronic infusion of bradykinin delays the progression of heart failure and preserves vascular endothelium-mediated vasodilation in conscious dogs. *Circulation* 2004;109:114–9.
- [31] Su JB. Kinins and cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2006;12:3423–35.
- [32] Tschöpe C, Walther T, König J, Spillmann F, Westermann D, Escher F, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *FASEB J* 2004;18:828–35.
- [33] Koch M, Spillmann F, Dendorfer A, Westermann D, Altmann C, Sahabi M, et al. Cardiac function and remodeling is attenuated in transgenic rats expressing the human kallikrein-1 gene after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol* 2006;550:143–8.
- [34] Lagneux C, Adam A, Lamontagne D. A study of the mediators involved in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1511–8.
- [35] Yang XP, Liu YH, Scicli GM, Webb CR, Carretero OA. Role of kinins in the cardioprotective effect of preconditioning: study of myocardial ischemia/reperfusion injury in B2 kinin receptor knockout mice and kininogen-deficient rats. *Hypertension* 1997;30:735–40.
- [36] Boucharad JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol* 1998;123:413–20.
- [37] Vegh A, Papp JG, Parratt J. Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning by blockade of bradykinin B2 receptors. *Br J Pharmacol* 1994;113:1167–72.
- [38] Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:681–9.

- [39] Brew EC, Mitchell MB, Rehring TF, Gamboni-Robertson F, McIntyre RC, Harken AH, et al. Role of bradykinin in cardiac functional protection after global ischemia-reperfusion in rat heart. *Am J Physiol* 1995;269:H1370-8.
- [40] Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of B1 receptors in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1998;91:941-5.
- [41] Li HJ, Yin H, Yao YY, Shen B, Bader M, Chao L, et al. Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3beta activation. *Cardiovasc Res* 2007;73:130-42.
- [42] Levy JH, O'Donnell PS. The therapeutic potential of a kallikrein inhibitor for treating hereditary angioedema. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15:1077-90.
- [43] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000;15:290-301.
- [44] Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F606-16.
- [45] Bledsoe G, Shen B, Yao Y, Zhang JJ, Chao L, Chao J. Reversal of renal fibrosis, inflammation, and glomerular hypertrophy by kallikrein gene delivery. *Hum Gene Ther* 2006;17:545-55.
- [46] Zhang Y, Adner M, Cardell LO. Up-regulation of bradykinin receptors in a murine in-vitro model of chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;489:117-26.
- [47] Chao J, Li HJ, Yao YY, Shen B, Gao L, Bledsoe G, et al. Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity. *Hypertension* 2007;49:490-7.
- [48] Hirawa N, Uehara Y, Suzuki T, Kawabata Y, Numabe A, Gomi T, et al. Regression of glomerular injury by kallikrein infusion in Dahl salt-sensitive rats is a bradykinin B2-receptor-mediated event. *Nephron* 1999;81:183-93.
- [49] Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carretero OA. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* 1997;29:483-7.
- [50] Schanstra JP, Neau E, Drogop Z, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, et al. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:371-9.
- [51] Jozwiak L, Drop A, Buraczynska K, Ksiazek P, Mierzicki P, Buraczynska M. Association of the human bradykinin B2 receptor gene with chronic renal failure. *Mol Diagn* 2004;8:157-61.
- [52] Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F608-27.
- [53] Oosterlinck W, Roelandt R, De Sy WA, Praet M. Captopril: a protective agent in renal warm ischemia in rats. *Eur Urol* 1985;11:36-9.
- [54] Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D, Nishimatsu H, et al. Effects of vasodilatory antihypertensive agents on endothelial dysfunction in rats with ischemic acute renal failure. *Hypertens Res* 2000;23:527-33.
- [55] Kitakaze M, Minamino T, Node K, Komamura K, Shinozaki Y, Mori H, et al. Beneficial effects of inhibition of angiotensin-converting enzyme on ischemic myocardium during coronary hypoperfusion in dogs. *Circulation* 1995;92:950-61.
- [56] Liu DT, Turner SW, Wen C, Whitworth JA. Angiotensin converting enzyme inhibition and protein restriction in progression of experimental chronic renal failure. *Pathology* 1996;28:156-60.
- [57] Guba M, Steinbauer M, Buchner M, Frolich D, Farkas S, Jauch KW, et al. Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on posts ischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock* 2000;13:190-6.
- [58] Brunner F, Kukovetz WR. Posts ischemic antiarrhythmic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. Role of suppression of endogenous endothelin secretion. *Circulation* 1996;94:1752-61.
- [59] Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Neau E, Pradaude F, Pecher C, Ader JL, et al. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* 2002;105:627-32.
- [60] Gilbert RE, Wu LL, Kelly DJ, Cox A, Wilkinson-Berka JL, Johnston CI, et al. Pathological expression of renin and angiotensin II in the renal tubule after subtotal nephrectomy. Implications for the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 1999;155:429-40.
- [61] Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, et al. Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13330-4.
- [62] Smithies O, Kim HS, Takahashi N, Edgell MH. Importance of quantitative genetic variations in the etiology of hypertension. *Kidney Int* 2000;58:2265-80.
- [63] Yuan G, Deng J, Wang T, Zhao C, Xu X, Wang P, et al. Tissue kallikrein reverses insulin resistance and attenuates nephropathy in diabetic rats by activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 2007;148:2016-26.
- [64] Morrissey JJ, Ishidoya S, McCracken R, Klahr S. Nitric oxide generation ameliorates the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2202-12.
- [65] Elliott DF, Horton EW, Lewis GP. Actions of pure bradykinin. *J Physiol* 1960;153:473-80.
- [66] Perkins MN, Campbell E, Dray A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 1993;53:191-7.
- [67] Perkins MN, Kelly D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol* 1993;110:1441-4.
- [68] Campos MM, Calixto JB. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* 1995;114:1005-13.
- [69] Campos MM, Mata LV, Calixto JB. Expression of B1 kinin receptors mediating paw edema and formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:812-9.
- [70] Campos MM, Souza GE, Calixto JB. Upregulation of B1 receptor mediating des-Arg9-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br J Pharmacol* 1996;117(5):793-8.
- [71] Khasar SG, Miao FJ, Levine JD. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience* 1995;69:685-90.
- [72] Marceau F, Lussier A, Regoli D, Giroud JP. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen Pharmacol* 1983;14:209-29.
- [73] Myers SI, Bartula L, Kalley-Taylor B. Bradykinin and not cholecystokinin stimulates exaggerated prostanoid release from the inflamed rabbit gallbladder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1992;47:35-9.
- [74] Bogar LJ, Bartula LL, Parkman HP, Myers SI. Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase. *J Surg Res* 1999;84:71-6.
- [75] Sundqvist G, Rosenquist JB, Lerner UH. Effects of bradykinin and thrombin on prostaglandin formation, cell proliferation and collagen biosynthesis in human dental-pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol* 1995;40:247-56.

- [76] Brechter AB, Lerner UH. Characterization of bradykinin receptors in a human osteoblastic cell line. *Regul Pept* 2002; 103:39–51.
- [77] Chen BC, Yu CC, Lei HC, Chang MS, Hsu MJ, Huang CL, et al. Bradykinin B2 receptor mediates NF-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via the Ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173:5219–28.
- [78] Rodriguez JA, De la Cerda P, Collyer E, Decap V, Vio CP, Velarde V. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in aortic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290: H30–6.
- [79] Brechter AB, Lerner UH. Bradykinin potentiates cytokine-induced prostaglandin biosynthesis in osteoblasts by enhanced expression of cyclooxygenase 2, resulting in increased RANKL expression. *Arthritis Rheum* 2007;56:910–23.
- [80] Henderson LM, Figueroa CD, Muller-Esterl W, Stain A, Bhoola KD. Immunovisualisation of plasma prekallikrein and H-kininogen on human neutrophils and in human hepatocytes. *Agents Actions Suppl* 1992;38:590–4.
- [81] Santos DR, Calixto JB, Souza GE. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. *Br J Pharmacol* 2003;139:271–8.
- [82] Paegelow I, Trzeciak S, Bockmann S, Vietinghoff G. Migratory responses of polymorphonuclear leukocytes to kinin peptides. *Pharmacology* 2002;66:153–61.
- [83] Moreau ME, Bawolak MT, Morissette G, Adam A, Marceau F. Role of nuclear factor-kappaB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2007;71:949–56.
- [84] Merino VF, Silva Jr JA, Araujo RC, Avellar MC, Bascands JL, Schanstra JP, et al. Molecular structure and transcriptional regulation by nuclear factor-kappaB of the mouse kinin B1 receptor gene. *Biol Chem* 2005;386:515–22.
- [85] Hermann A, Arnhold M, Kresse H, Neth P, Fink E. Expression of components of the kallikrein-kinin system in human cell lines. *Immunopharmacology* 1999;45:135–9.
- [86] Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto Y, Nakagawa T, Miyakawa K, et al. Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int J Cancer* 2002;98:29–35.
- [87] Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett* 2007;249: 61–79.
- [88] Desrivieres S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Ménashi S. Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J Cell Physiol* 1993;157:587–93.
- [89] Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53: 245–82.
- [90] Wolf WC, Evans DM, Chao L, Chao J. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *Am J Pathol* 2001;159:1797–805.
- [91] Veveis-Lowe TL, Lawrence MG, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, et al. Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:631–43.
- [92] Gao J, Collard RL, Bui L, Herington AC, Nicol DL, Clements JA. Kallikrein 4 is a potential mediator of cellular interactions between cancer cells and osteoblasts in metastatic prostate cancer. *Prostate* 2007;67:348–60.
- [93] Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol Cancer Res* 2004;2:257–80.
- [94] Ishihara K, Hayashi I, Yamashina S, Majima M. A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *Jpn J Pharmacol* 2001;87:318–26.
- [95] Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, Yamazaki A, Endo H, Ishihara K, et al. Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2004;64:5178–85.
- [96] Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res* 1998;58:159–65.
- [97] Srinivasan D, Kosaka AH, Daniels DV, Ford AP, Bhattacharya A. Pharmacological and functional characterization of bradykinin B2 receptor in human prostate. *Eur J Pharmacol* 2004;504: 155–67.
- [98] Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J* 2001;15:1487–9.
- [99] Morbidelli L, Parenti A, Giovannelli L, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br J Pharmacol* 1998;124:1286–92.
- [100] Greco S, Elia MG, Muscella A, Romano S, Storelli C, Marsigliante S. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. *J Endocrinol* 2005;186:291–301.
- [101] Greco S, Storelli C, Marsigliante S. Protein kinase C (PKC)-delta/epsilon mediate the PKC/Akt-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in MCF-7 cells stimulated by Bradykinin. *J Endocrinol* 2006;188:79–89.
- [102] Raidoo DM, Sawant S, Mahabeer R, Bhoola KD. Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology* 1999;43:255–63.
- [103] Matsukado K, Sugita M, Black KL. Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B2 receptors in malignant gliomas. *Brain Res* 1998;792:10–5.
- [104] Easton AS, Abbott NJ. Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2002;953:157–69.
- [105] Warren K, Jakacki R, Widemann B, Aikin A, Libucha M, Packer R, et al. Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:343–7.
- [106] Prados MD, Schold Jr SC, Fine HA, Jaecle K, Hochberg F, Mechtler L, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003;5:96–103.
- [107] Packer RJ, Krailo M, Mehta M, Warren K, Allen J, Jakacki R, et al. A Phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin with radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer* 2005;104:1968–74.
- [108] Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 1995;26:1–26.
- [109] Gortlach C, Wahl M. Bradykinin dilates rat middle cerebral artery and its large branches via endothelial B2 receptors and release of nitric oxide. *Peptides* 1996;17:1373–8.
- [110] Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* 1997;36: 153–60.
- [111] Shcherbakova I, Neshkova E, Dotsenko V, Platonova T, Shcherbakova E, Yarovaya G. The possible role of plasma kallikrein-kinin system and leukocyte elastase in pathogenesis of schizophrenia. *Immunopharmacology* 1999;43:273–9.
- [112] Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimburger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, et al. Risk factors for cardiovascular

- disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation* 2001; 104:1887–93.
- [113] Dellalibera-Joviliano R, Dos Reis ML, Cunha Fde Q, Donadi EA. Kinins and cytokines in plasma and cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *J Rheumatol* 2003;30: 485–92.
- [114] Wenk GL. Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J Clin Psychiatry* 2006;67: 3–7.
- [115] Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y, Peerschke EI, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Interaction of factor XII and high molecular weight kininogen with cytokeratin 1 and gC1qR of vascular endothelial cells and with aggregated Abeta protein of Alzheimer's disease. *Immunopharmacology* 1999;43: 203–10.
- [116] Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y, et al. Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 2000;54:419–26.
- [117] Diamandis EP, Yousef GM, Petraki C, Soosaipillai AR. Human kallikrein 6 as a biomarker of Alzheimer's disease. *Clin Biochem* 2000;33:663–7.
- [118] Diamandis EP, Scorilas A, Kishi T, Blennow K, Luo LY, Soosaipillai A. Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem* 2004;37:230–7.
- [119] Sander JW, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:433–43.
- [120] Bregola G, Varani K, Gessi S, Beani L, Bianchi C, Borea PA, et al. Changes in hippocampal and cortical B1 bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy. *Neuroscience* 1999;92:1043–9.
- [121] Arganaraz GA, Silva JA, Perosa SR, Pessoa LG, Carvalho FF, Bascands JL, et al. The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 2004; 1006:114–25.
- [122] Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, et al. Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* 2003;461:506–19.
- [123] Arganaraz GA, Perosa SR, Lencioni EC, Bader M, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, et al. Role of kinin B1 and B2 receptors in the development of pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 2004;1013:30–9.
- [124] Pereira MGAG, Gitai DLG, Paço-Larson ML, Pesquero JB, Garcia-Cairasco N, Costa-Neto CM. Modulation of B1 and B2 kinin receptors expression levels in the hippocampus of rats after audiogenic kindling and with limbic recruitment, a model of temporal lobe epilepsy. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:200–5 (this issue), doi:10.1016/j.intimp.2007.07.028.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)