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

Andrea Gutierrez Maria

**PAPEL DO RECEPTOR B1 DE CININAS NO
DESENVOLVIMENTO DE MELANOMA MURINO**

Ribeirão Preto

2011

Andrea Gutierrez Maria

Papel do receptor B1 de cininas no desenvolvimento de melanoma murino

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em Ciências

Orientador: Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

Ribeirão Preto
2011

Maria, Andrea Gutierrez

Papel do Receptor B1 de Cininas no Desenvolvimento de
Melanoma Murino – Ribeirão Preto, 2011.

106p.; Il, 30 cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto – FMRP-USP, Departamento de Bioquímica e
Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

1- Receptor B1; 2- Melanoma; 3- Câncer;
4- Sistema Caliceínas-Cininas

Dedicatória

Dedico este trabalho à todos que,
de alguma maneira, lutam contra o câncer.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter tornado a vida possível;

Ao meus pais, Laurindo e Guiomar, pela minha criação e educação, por todo o apoio que me deram e, acima de tudo, por terem acreditado em mim e nos meus sonhos;

Ao meu amor, Adriano, por toda a paciência, por me mostrar que a vida pode ser bem menos complicada e que tudo é possível quando existe amor. Obrigada por estar sempre comigo;

Ao meu irmão, Eduardo, pelas longas conversas e por me levantar todas as vezes que eu achava que não era mais possível ficar em pé;

À minha família, meus tios Maria e Inoc, meus primos Priscila, Silvio, Leila e Ronaldo por terem apoiado a minha chegada em Ribeirão Preto;

À minha madrinha, Maria, por sempre lembrar de mim em suas orações;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto pela porta que me abriu em seu laboratório e pela contribuição científica tornando possível o desenvolvimento desse trabalho;

À Dra. Rosana Inácio dos Reis, pela amizade, apoio, por todos os ensinamentos e por me mostrar o que é ser cientista. Sem você, Rosana, esse trabalho não seria possível;

À Dra. Patrícia Dillenburg Pilla, pelo companheirismo nos experimentos, por trabalhar comigo e me ensinar muito e pelas várias risadas que arrancou de mim;

Ao Dr. Lucas Tabajara por sempre ter uma resposta para as minhas dúvidas e pelo companheirismo no laboratório;

À Dr. Marília Pereira, Dra. Laura de Sousa, Mariela Machado e Geisa Santos dividirem o laboratório comigo;

Ao Professor Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, pelo exemplo de acadêmico e aos seus alunos e ex-alunos Lara, Liliane e Hugo;

Ao Professor Dr. Marcelo Damário Gomes e seus alunos, Felipe (Xili), Adriana (Drika), Claudinha (Clória), Carol e Mariana pelo companheirismo e atenção;

À grande amiga que encontrei durante o meu mestrado, Sami Yokoo, muito obrigada por estar comigo quando eu mais precisei;

Às minhas “roommates” e grandes amigas, Karen, Nati e Vanessa por me emprestarem seus ouvidos e me renderem muitas risadas;

À minha amiga Margarete Galm por todo o apoio em meu estágio na Roche,

Às técnicas Lúcia, Odete e Cacilda por cuidarem do laboratório,

Aos funcionários da secretária, Ivone, Ronaldo e Lúcia, especialmente à Ivone, muito obrigada por me ajudar sempre;

Aos membros da banca, Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino e Prof. Dr. Vitor Faça por terem aceito o convite de comporem a banca e avaliarem este trabalho;

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero por ter cedido os animais knockout, fator chave para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Dario Zamboni por ter aberto seu laboratório e ter permitido que eu realizasse os experimentos de migração celular e aos seus alunos Catarina e Jonilson que estavam sempre dispostos a me ajudar;

À Profa. Dra. Simone Gusmão, sua técnica Elaine e sua aluna Cristiane pelo carinho e contribuição para que eu realizasse as análises histológicas;

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

***“Uma mente que se abre a uma nova idéia
nunca mais volta ao seu tamanho original”***

Albert Einstein

RESUMO

O melanoma maligno está entre os cânceres que mais têm aumentado nas últimas décadas representando um grande desafio terapêutico. Quando diagnosticado precocemente, as chances de cura por excisão cirúrgica com margens de segurança adequadas são altas. Entretanto, casos avançados de melanoma são resistentes às formas atuais de terapia; assim, um dos maiores desafios para a pesquisa em melanoma é a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. A capacidade de impedir o desenvolvimento de um tumor depende do melhor entendimento das vias celulares e moleculares que operam no microambiente tumoral. Uma inflamação crônica e persistente contribui para o desenvolvimento do câncer, e mesmo tumores que não são epidemiologicamente ligados a patógenos, são caracterizados pela presença de componentes inflamatórios em seu microambiente. O Sistema Caliceínas-Cininas (SCC) é responsável por uma série de efeitos biológicos, como vasodilatação, modulação da dor e inflamação, contração/relaxamento da musculatura lisa e efeitos sobre a proliferação celular. A participação do receptor B1 de cininas é bem relacionada a processos inflamatórios; contudo, a relação entre o SCC e câncer ainda é pouco descrita na literatura. Com relação ao melanoma, não existem na literatura, estudos que relacionam a participação do SCC e essa patologia. Portanto, a identificação de mecanismos genéticos e de vias de sinalização que levam à formação e progressão tumoral é de extrema importância para um desenho racional de terapias. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a participação do receptor B1 de cininas no desenvolvimento de melanoma. Primeiramente realizou-se ensaios *in vitro* com células de melanoma murino, B16F10, verificando-se a presença dos componentes do SCC nesta linhagem celular, bem como a capacidade de migração das células quando estimuladas com o agonista e antagonista do receptor B1. Posteriormente, induziu-se melanoma em animais selvagens e *knockout* para o receptor B1 e verificou-se expressão de citocinas, vias de proliferação e apoptose e vascularização nesses tumores a partir técnicas de PCR, western blotting e análise histológica. Observou-se que células B16F10 estimuladas com o agonista do receptor B1, diminuem a capacidade de migração. Tumores desenvolvidos em animais *knockout* para o receptor B1, possuem uma menor expressão gênica desse receptor quando comparados com tumores desenvolvidos em animais selvagens e apresentam vias de proliferação celular mais ativadas, além de uma vascularização irregular. Considerando esses resultados, sugerimos que o receptor B1 de cininas contribui para o impedimento da progressão tumoral, podendo, futuramente, ser um alvo terapêutico para o tratamento de melanoma.

ABSTRACT

Malignant melanoma is between the cancer types that most have been increased in the last decades, representing a therapeutic challenge. When it is early detected, chances of cure through surgical excisions with secure margins are high. However, advanced cases of melanoma are resistant to all types of therapies; thus, one of the most challenges for research in melanoma is the identification of molecular targets to further develop new strategies of treatment. The ability to blockade the development of a tumor depends on a better understanding of cellular and molecular pathways that operate in the tumor microenvironment. A chronic and persistent inflammation contributes to cancer development, and, even tumors that are not epidemiologically linked to pathogens present inflammatory components in their microenvironment. The Kallikrein-Kinin System (KKS) is responsible for several biological effects, like, vasodilatation, modulation of pain and inflammation, contraction/relaxation of smooth muscles and cell proliferation. The kinin B1 receptor is well related to inflammatory processes, however, the involvement of the KKS in cancer development is, yet, not well described in the literature. Regarding to melanoma, studies relating the involvement of the KKS in melanoma development is still not available. This way, identification of genetic mechanisms and signaling pathways that drive melanoma formation and progression is extremely important for designing rational therapies in the future. Thus, the aim of this study was evaluate the participation of the kinin B1 receptor in melanoma progression. First, *in vitro* assays with murine melanoma cells, B16F10, were performed to verify the presence of the KKS components in this cell lineage, as well as the capacity of migration when these cells are stimulated with the B1 receptor agonist and antagonist. Then, melanoma was induced in wild type and B1 receptor knockout mice and the expression of cytokines, proliferation and apoptosis pathways and vascularization were studied by PCR, western blotting and histological analyses. We observed that B16F10 cells stimulated with the B1 receptor agonist had their capacity of migration decreased. Tumors developed in B1 receptor knockout mice showed a lower expression of this gene comparing to the tumors developed in wild type animals, also presenting higher activation of proliferation pathways and abnormal vessels. Considering these results, we suggest that the kinin B1 receptor contributes to blockade, at least in part, the tumor progression which can, in the future, become a therapeutic target for melanoma treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

AT1	Receptor de angiotensina do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina do tipo 2
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B1^{-/-}	Grupo de animais <i>knockout</i> para o receptor B1
BK	Bradicinina
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPB	Carboxipeptidase B
CPD	Carboxipeptidase D
CPM	Carboxipeptidase M
CPN	Carboxipeptidase N
CT	Linha de base
C-terminal	Carboxi-terminal
DABK	desArg ⁹ - bradicinina
DALBK	desArg ⁹ [Leu ⁸] – bradicinina
DAKD	desArg ⁹ -calidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina I
E-Caderina	Caderina endotelial
ECL	Reagente para quimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal

EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ELISA	Ensaio de ligação de enzima imunoabsorvente
ERK1/2	Quinase extracelular reguladora de sinal 1/2
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HCl	Ácido clorídrico
H&E	Hematoxilina e eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IFN-γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
JNK	cJun N-terminal Kinase
KD	Calidina
KKS	<i>Kallicrein Kinin System</i>
LIGHT	Proteína induzível análoga à linfotóxina que compete com a glicoproteína D para a entrada do vírus da herpes em células T
MAP	Proteína mitógeno ativado
MAPK	Proteína quinase mitógeno ativado
MART-1	Antígeno de melanoma reconhecido por células T - 1
MAT	Macrófagos associados a tumores
MHC	Complexo de maior histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa de cadeia leve de células B ativadas
NK	<i>Natural Killers</i>
NO	Óxido nítrico
N-terminal	Amino-terminal
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases

PBS	Tampão salino de fosfato
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidylinositol 3-quinases
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PP2A	Proteína fosfatase 2
PSA	Antígeno prostático específico
qPCR	Reação da polymerase em cadeia quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SCC	Sistema Calicreínas-Cininas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio – desnaturante
SFB	Soro fetal bovino
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFSF14	Fator de necrose tumoral da superfamília da proteína 14
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTBS	Tris tamponado com salina + Tween
UDG	Uracil DNA glicosilase
VEGF	Fator de crescimento vascular e endotelial
WT	Tipo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O Sistema Calicreínas-Cininas	16
1.1.1. Histórico	16
1.1.2. Formação dos peptídeos ativos do SCC	17
1.1.3. Visão geral do SCC	18
1.1.4. A sinalização dos receptores	19
1.1.5. SCC e câncer	20
1.2. Inflamação e microambiente tumoral	21
1.3. Melanoma	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Reagentes	30
3.2. Estudos <i>in vitro</i>	30
3.2.1. Cultura de células	30
3.2.2. Ensaio de ativação de ERK1/2	31
3.2.3. Ensaio de migração celular	31
3.2.4. Ensaio de viabilidade celular – MTT	32
3.2.5. Ensaio de viabilidade celular – Azul de Tripán	33
3.3. Modelo <i>in vivo</i>	34
3.3.1. Animais	34
3.3.2. Modelo de indução de melanoma em camundongos C57/BL6, utilizando a linhagem B16F10	34
3.4. Análise da expressão de RNAm por PCR	35
3.4.1. Extração de RNA total por Trizol	35
3.4.2. Tratamento das amostras com DNase	36
3.4.3. Transcrição Reversa	37
3.4.4. Desenho e padronização dos primers específicos para PCR	37
3.4.5. PCR semi-quantitativo	39
3.4.6. PCR em tempo real – quantitativo	40

3.5. Análise da expressão de proteínas	41
3.5.1. Extração de proteínas totais do tecido	41
3.5.2. Ensaio de Western Blotting	41
3.5.3. Dosagem de citocinas circulantes - ELISA	42
3.6. Análises histológicas	42
3.6.1. Histologia das amostras de tumor	42
3.7. Análises estatísticas	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Modelo <i>in vitro</i>	45
4.1.1. Análise da expressão de RNAm dos componentes do SCC em células de melanoma murino B16F10	45
4.1.2. Análise da funcionalidade do receptor B1 em células de melanoma murino B16F10 através da ativação de ERK1/2	46
4.1.3. Análise do efeito da ativação do receptor B1 na migração de células de melanoma murino B16F10	47
4.1.4. Análise da viabilidade das células B16F10 após tratamento com 1 µM de DABK	50
4.2. Modelo <i>in vivo</i>	51
4.2.1. Indução de melanoma a partir da injeção de células B16F10 em camundongos C57/BL6 selvagens (WT) e <i>knockout</i> para o receptor B1 (B1 ^{-/-})	51
4.2.2. Monitoramento do peso corporal e do desenvolvimento do tumor após a implantação de células B16F10 em animais selvagens e animais B1 ^{-/-}	52
4.2.3. Análise da expressão gênica do receptor B1 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	55
4.2.4. Análise da expressão gênica da Enzima conversora de angiotensina I nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	56
4.2.5. Análise da expressão de RNAm da carboxipeptidase M nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	57
4.2.6. Análise da expressão de RNAm do receptor AT1 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	58
4.2.7. Análise da expressão de RNAm do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	59
4.2.8. Análise histológica dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-} quanto à presença de vasos sanguíneos	60
4.2.9. Análise da expressão de interleucina 6 (IL-6) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	61
4.2.10. Análise da expressão de IL-6 em plasma de animais selvagens e B1 ^{-/-} que desenvolveram melanoma através da injeção subcutânea de células B16F10	62

4.2.11. Análise da expressão de interleucina-10 (IL-10) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	62
4.2.12. Análise da expressão de IL-10 em plasma de animais selvagens e B1 ^{-/-} que desenvolveram melanoma através da injeção subcutânea de células B16F10	63
4.2.13. Análise da expressão de RNAm do fator de necrose tumoral - α (TNF- α) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	64
4.2.14. Análise da expressão de RNAm do fator de transformação de crescimento- β (TGF- β) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	65
4.2.15. Análise da expressão de RNAm do interferon- γ (IFN- γ) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	66
4.2.16. Análise da ativação do fator de transcrição, p53, nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	67
4.2.17. Análise da clivagem de caspase 3 em células de tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	68
4.2.18. Análise da ativação de p38 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	69
4.2.19. Análise da ativação de c-Jun N-terminal kinases (JNK) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	70
4.2.20. Análise da ativação de Akt nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	71
4.2.21. Análise da ativação de ERK1/2 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-}	72
4.2.22. Análise histológica dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1 ^{-/-} quanto à presença de células em processo de mitose	73
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÃO.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Sistema Caliceínas-Cininas

1.1.1. Histórico

Um dos primeiros relatos sobre a existência do sistema Caliceínas-Cininas (SCC) ocorreu em 1909 quando se observou uma queda transiente na pressão sanguínea de humanos submetidos à injeção intravenosa de frações da urina humana (revisado por Prado et al., 2002). Em 1928, um trabalho de Frey e colaboradores também mostrou o efeito hipotensivo da urina humana injetada em cachorros e foi então que os modernos conceitos das ações e do metabolismo das cininas começaram a surgir. Em 1930, Kraut e colaboradores encontraram altas concentrações desse agente hipotensivo no pâncreas e tais autores nomearam essa substância de caliceína (do grego: *Kallikreas* – pâncreas). Em 1937, foi descrito por Werle, pela primeira vez, um dos peptídeos ativos, denominado DK, que futuramente seria um dos componentes do SCC, hoje conhecido como calidina (KD). Werle mostrou que ao se trabalhar com caliceínas e soro sanguíneo, ocorria a formação de uma nova substância de menor peso molecular que apresentava ações semelhantes às da caliceína (Para revisão, ver Prado et al. 2002 e Costa-Neto et al. 2008). Em 1949, em um estudo com veneno de serpentes brasileiras no plasma humano, Rocha-e-Silva e colaboradores identificaram e caracterizaram essa substância de menor peso molecular como sendo um peptídeo e o nomearam bradicinina (BK), (do grego: *bradys* – lento, *kinesia* – movimento), (Rocha e Silva, 1949). A sequência do peptídeo BK foi determinada em 1960 concomitantemente por dois grupos independentes (Boissonnas et al., 1960 e Elliott et al., 1960) e em 1961, a sequência de aminoácidos da KD foi descrita por Werle e seus colaboradores (Werle et al., 1961).

Em 1980, Regoli e Barabé descreveram as respostas fisiológicas para a BK e seu análogo, desArg⁹-bradicinina (DABK), em uma variedade de tecidos. Os autores propuseram que as respostas eram mediadas por dois receptores de membrana diferentes, que foram nomeados receptores B1 e B2. Embora os receptores do SCC tenham sido descobertos somente no final dos anos 70, no início da década de 90 esses receptores já haviam sido clonados (Menke et al., 1994) e poucos anos depois, animais com os receptores deletados já estavam disponíveis para estudo (Borkowski et al., 1995; Pesquero et al., 2000).

1.1.2. Formação dos peptídeos ativos do SCC

As cininas são liberadas a partir do cininogênio, uma proteína multifuncional sintetizada no fígado. Há dois tipos de cininogênio, o de alto peso molecular (88-120 kDa) e o de baixo peso molecular (50-68 kDa). O cininogênio de alto peso molecular está presente no plasma e o de baixo peso molecular, além de estar presente no plasma, pode também extravasar para os tecidos. As calicreínas, serino endopeptidases, são as enzimas responsáveis por liberar BK e KD a partir do cininogênio; essas enzimas são classificadas como plasmáticas ou teciduais de acordo com a sua localização (Takagaki et al., 1985).

A BK e a KD se ligam e ativam preferencialmente o receptor B2. Estes peptídeos podem sofrer a ação das cininases do tipo I que retiram o resíduo de arginina da porção carboxi-terminal da BK e da KD, dando origem à DABK e desArg¹⁰-calidina (DAKD) respectivamente, que por sua vez, se ligam preferencialmente ao receptor B1. São consideradas cininases do tipo I as carboxipeptidases M (CPM), N (CPN), B (CPB) e D (CPD), sendo todas metalocarboxipeptidases dependentes de zinco (Vendrell et al., 2000).

Uma segunda classe de enzimas capaz de clivar a BK é chamada de cininase do tipo II. As cininases do tipo II são peptidil-peptídeo hidrolases que removem o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ da porção carboxi-terminal da BK e Phe⁹-Arg¹⁰ da KD gerando peptídeos inativos. Interessantemente, no início dos anos 70 foi mostrado que a cininase do tipo II de membrana era idêntica à enzima conversora de angiotensina I (ECA) descoberta por Skeggs em 1956 (Skeggs et al., 1956), sugerindo que o sistema Renina-Angiotensina e o SCC poderiam estar interligados: a enzima responsável pela clivagem de BK e KD em peptídeos inativos era também a responsável por gerar angiotensina II, a partir da angiotensina I (Yang et al., 1971).

A sequência de aminoácidos dos peptídeos ativos do SCC está descrita na Tabela 1:

Tabela 1: Sequência de aminoácidos dos peptídeos ativos do SCC

Peptídeo ativo	Sequência de aminoácidos
BK	<i>Arg – Pro – Pro – Gly – Phe – Ser – Pro – Phe – Arg</i>
KD	<i>Lys – Arg – Pro – Pro – Gly – Phe – Ser – Pro – Phe – Arg</i>
DABK	<i>Arg – Pro – Pro – Gly – Phe – Ser – Pro – Phe</i>
DAKD	<i>Lys – Arg – Pro – Pro – Gly – Phe – Ser – Pro – Phe</i>

1.1.3. Visão geral do SCC

Atualmente, sabe-se que o SCC é responsável por uma série de efeitos biológicos, entre eles, vasodilatação, modulação da dor, aumento da permeabilidade capilar, contração/relaxamento da musculatura lisa e efeitos sobre a proliferação celular (Regoli & Barabé, 1980). As cininas são importantes mediadores inflamatórios e, como mencionado anteriormente, agem via dois receptores específicos acoplados à proteína G: B1 e B2 – Figura 1 (Regoli et al., 1994; para revisão veja Böckmann e Paegelow, 2000; Calixto et al., 2004). Ao contrário do receptor B2, que é constitutivamente expresso em uma variedade de células em condições normais, o receptor B1 geralmente está ausente ou possui baixa expressão nessas condições. Entretanto, sua expressão aumenta rapidamente em condições patológicas, ou de lesão tecidual, ou pela exposição aos seus agonistas DABK ou DAKD (para revisão veja Costa-Neto et al., 2008). Estudos mostraram que mesmo a expressão basal do receptor B1 é suficiente para causar uma regulação na síntese de colágeno em resposta a DAKD, o que permitiria a ativação do receptor B1 mesmo antes da sua indução. Para a síntese *de novo* do receptor B1, proteínas quinases específicas aparentemente são ativadas no tecido lesionado, mais especificamente, a via da MAP quinase p38 (Ricupero et al., 2000 e Larrivee et al., 1998).

Recentemente, foi demonstrado que estas cininas também influenciam a atividade de células imunes estimulando a síntese de citocinas, eicosanóides e fatores quimiotáticos. Entre as principais ações fisiológicas da BK estão os mecanismos de controle da vascularização. A ação vasodilatadora arterial da BK deve-se principalmente à ativação de receptores B2 na superfície de células endoteliais, seguida da liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandina (Bertram, 2007).

Figura 1: Esquema representativo do Sistema Caliceínas-Cininas. Estão indicados alguns dos eventos fisiopatológicos relacionados a esse sistema.

Além da participação na regulação de processos fisiológicos, as cininas também podem mediar situações de choque séptico e asma. Além disso, estudos mostraram que as cininas possuem um papel bastante importante na mediação de processos inflamatórios e seus sintomas (dor, edema, rubor e calor) (Stewart, 1994), bem como em outras patologias (para revisão veja Costa-Neto et al., 2008).

1.1.4. A sinalização dos receptores

A BK e a KD são agonistas endógenos preferenciais do receptor B2 enquanto que a DABK e a DAKD são agonistas preferenciais do receptor B1. Quando ativado, o receptor B2 desencadeia respostas inter e intracelulares que dependem do tipo da célula. Os eventos de sinalização desse receptor incluem a ativação de proteína G e aumento de Ca^{2+} citosólico. Além disso, outras vias subsequentes podem ser ativadas a partir da BK, como por exemplo, a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos de pulmão (Hayashi et al., 2000), geração de espécies reativas de oxigênio em células de músculo liso e síntese de agentes inflamatórios

vasoativos (Greene et al., 2000). Muitas dessas vias podem por sua vez ativar a expressão gênica do receptor B1. A regulação cruzada entre o receptor B1 e o receptor B2 também já foi sugerida com base na observação de que a ativação do receptor B2 também ativa NF- κ B que por sua vez, pode levar à expressão gênica do receptor B1 (Schanstra et al., 1998; Phagoo et al., 1999 e Xie et al., 2000).

A sinalização do receptor B1, em resposta aos seus agonistas preferenciais, é similar ao receptor B2. Assim como a BK, a DABK também induz a proliferação e a divisão celular. Vale salientar ainda que o receptor B1 utiliza principalmente Ca^{2+} extracelular nos processos de sinalização enquanto que o receptor B2 utiliza, na maioria das vezes, Ca^{2+} intracelular (Zhou et al., 2000; revisado por Prado et al., 2002).

1.1.5. SCC e câncer

A relação entre o SCC e câncer ainda é pouco descrita na literatura, mas uma importante descoberta, utilizada até hoje na clínica para fins de diagnóstico de câncer de próstata, relaciona este sistema com câncer. A enzima denominada antígeno prostático específico (PSA) é uma calicreína que começou a ser utilizada na clínica como marcador biológico para câncer de próstata na década de 80 (para revisão veja Paliouras et al., 2007).

Hermann e colaboradores em 1999 demonstraram a presença de componentes do SCC em diversas linhagens de tumores epiteliais humanos. Em 2003, Taub e colaboradores verificaram o efeito da ativação do receptor B1 em células de câncer de próstata, e Borgoño & Diamandis (2004), descreveram o padrão de expressão e as funções até então conhecidas de calicreínas no desenvolvimento tumoral. Chee e colaboradores (2008) estudaram a expressão dos receptores B1 e B2 em câncer de pulmão e verificaram a modulação da expressão de calicreínas em diferentes subtipos e estágios dessa patologia, sugerindo que essas proteínas poderiam ser utilizadas como biomarcadores neste tipo de câncer; e ainda, que os inibidores de calicreínas e/ou antagonistas dos receptores de cininas poderiam ser, futuramente, aplicados na clínica para terapia de câncer de pulmão.

Uma possível relação para a participação do SCC no desenvolvimento de câncer pode ocorrer através da indução da proteólise da matriz extracelular que consequentemente influenciam os processos de crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástase (Borgoño e Diamandis, 2004). Outra relação do SCC no desenvolvimento de câncer pode ser

estabelecida a partir de sua estreita relação com inflamação, um componente fundamental da progressão tumoral (Schwartzburd, 2003; de Marzo et al., 2007, Allavena et al., 2008 e Collota et al., 2009).

1.2. Inflamação e microambiente tumoral

O microambiente tumoral consiste de uma combinação variável de células tumorais, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos infiltrantes, como macrófagos, linfócitos T e células dendríticas. Uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são produzidos no ambiente tumoral por diferentes células a partir de uma interação do complexo celular com o microambiente. A interação entre citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e seus receptores, forma uma rede no sítio tumoral que se torna responsável pelo desenvolvimento e progressão do tumor, aumento ou indução de respostas imunológicas antitumorais e/ou rejeição tumoral (Shurin et al., 2006).

Alguns estudos mostraram que as células tumorais podem passar por mutações que ativam proto-oncogenes e mutações que inativam genes supressores de tumor. Esses estudos têm contribuído para o entendimento de como as células podem adquirir um potencial replicativo, diminuir os processos apoptóticos, ultrapassar a barreira do sistema imunológico e assim, apresentar um fenótipo invasivo (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Entretanto, mais recentemente, tem sido mostrado que somente essas mutações não são suficientes para dar um completo fenótipo maligno ao tumor e que esse fenótipo maligno se manifesta apenas em um microambiente permissivo. De acordo com o microambiente, as células podem modular significativamente o grau de malignidade de um tumor, estabelecendo-se um processo dinâmico entre o microambiente tumoral e as células, e assim, mutações poderiam ocorrer a partir dessas interações (Whiteside, 2008).

Vários estudos mostram que os macrófagos populam o microambiente da maioria, se não de todos os tipos de tumores. Estes podem produzir enzimas e inibidores que regulam a degradação da matriz extracelular, favorecendo assim a invasão tumoral. Os macrófagos também possuem um papel essencial no reparo de lesões através do remodelamento do tecido, da liberação de fatores de crescimento e angiogênicos, e através do recrutamento de outras células como fibroblastos (Crowther *et al.*, 2001; Leek & Harris, 2002).

Na fase invasiva de tumores, os macrófagos auxiliam na migração e invasão celular secretando fatores quimiotáticos e quimiocinéticos, além de promoverem a angiogênese pela síntese de fatores angiogênicos incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Zhang *et al.*, 2003). Assim, os tumores podem continuar a crescer espontaneamente apesar de uma infiltração de macrófagos tumorocidas. Além disso, os macrófagos, ao produzirem o fator de crescimento epidermal (EGF), estimulam a migração e invasão de células tumorais que podem atingir níveis metastáticos no momento em que o tumor alcança os vasos sanguíneos (Galon *et al.*, 2006).

Tumores invasivos são também sítios de angiogênese, uma vez que os tumores em crescimento, ao adquirirem certo volume, requerem o estabelecimento de uma vascularização para o fornecimento de nutrientes e remoção dos resíduos tóxicos (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2010). De fato, estudos mostram que há um aumento dramático do número de vasos durante a transição de tumor benigno para maligno (Pollard, 2008). Em um estudo com tumores sólidos de camundongos, Stockmann e colaboradores (2008) mostraram que o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) embora leve a um aumento do número de vasos sanguíneos, em alguns casos, também pode contribuir para a inibição da angiogênese. Os autores ainda sugerem que VEGF poderia agir retardando, ao invés de promover, o crescimento tumoral. Além disso, um estudo realizado em coelhos que apresentavam a expressão gênica de VEGF e seus receptores inibidos, mostrou que VEGF estimulou a expressão gênica de LIGHT/TNFSF14 (membro da superfamília do fator de necrose tumoral) promovendo a apoptose de macrófagos (Petreaca *et al.*, 2008).

Estudos para analisar a capacidade do macrófago para sintetizar óxido nítrico em resposta a um estímulo, mostraram que alguns fatores produzidos por células de melanoma são capazes de inibir a síntese, por macrófagos, dessa importante molécula citotóxica (Naama *et al.*, 2001), sugerindo o comprometimento da função normal do macrófago no ambiente tumoral. Essas atividades fariam com que macrófagos com função comprometida fossem benéficos para o crescimento tumoral, e especula-se que fatores liberados por células tumorais possam ser capazes de converter macrófagos infiltrantes do tumor em macrófagos do tipo alternativamente ativados (Duff *et al.*, 2007). Portanto, macrófagos associados a tumores (MATs), apesar de serem vistos como tendo uma atividade antitumoral, poderiam promover invasão celular tumoral e difusão metastática em certas condições (Elgert *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2004; Sica *et al.*, 2006; Pollard JW 2004). Esses efeitos conflitantes podem ser explicados com base nas diferentes funções desempenhadas pelos MATs sob influência de sinais gerados por células inflamatórias e pelas próprias células tumorais (Stout *et al.*, 2005; Lewis & Pollard, 2006).

O reconhecimento de um importante papel para células inflamatórias e seus fatores na etiologia e patogênese de um tumor começou no século XIX por Virchow Ludwig em um trabalho sobre a origem do câncer em inflamação crônica. Alguns trabalhos focados em dados clínicos e experimentais demonstraram citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como importantes potenciadores de carcinogênese (Milas et al., 1987; Duff et al., 2003). No entanto, ao mesmo tempo, há evidências demonstrando o papel da proteção imunológica sobre o crescimento tumoral, ou seja, o reconhecimento e a eliminação de células comprometidas (Evans R, 1982). Assim, a questão sobre o papel do infiltrado inflamatório no desenvolvimento tumoral ainda não é totalmente conhecida.

Entretanto, a importância do microambiente inflamatório na região do desenvolvimento tumoral é bem descrita na literatura (Liotta & Kohn, 2001; Balkwill & Mantovani, 2001). Bianchini e colaboradores (2007) estudaram a expressão de COX-2 em MATs em diferentes estágios de melanoma cutâneo e mostraram que há uma alta concentração de COX-2 em MATs, sugerindo que a COX-2 poderia agir como um efetivo biomarcador para a progressão de melanoma. Os autores ainda sugerem que a prostaglandina 2 (PGE2), o principal produto de COX-2, é o mais provável candidato em promover as propriedades malignas associadas com a expressão de COX-2. De fato, já foi mostrado que PGE2 impede a proliferação de linfócitos T e B e a atividade de células *natural killers* (NK), atividades essenciais para a defesa da célula contra a progressão tumoral (Calder, 2001; Young, 1994).

A ocorrência de um microambiente inflamatório em tumores que não estão epidemiologicamente relacionados com inflamação levou alguns pesquisadores a questionar se eventos genéticos causando neoplasia eram os responsáveis pelo estabelecimento de um ambiente inflamatório (Allavena et al., 2008). O atual paradigma do desenvolvimento de câncer é um processo multifatorial e com vários estágios, durante os quais as células adquirem múltiplas mutações genéticas e epigenéticas. A pergunta principal é quantas e quais mudanças genéticas são necessárias para uma célula se tornar maligna (Hanahan e Weinberg, 2000). Entre os genes envolvidos na regulação desse processo, estão aqueles responsáveis pela monitoração do crescimento através da supressão da proliferação ou promoção de apoptose, genes que indiretamente suprimem a neoplasia assegurando a fidelidade do código do DNA através de efetivos reparos à danos no DNA ou pela regulação da estabilidade genômica. Em contraste, existem genes e situações fisiológicas que podem afetar as células pela modulação do microambiente no qual os tumores crescem, através da regulação direta ou indireta das proteínas da matriz extracelular, marcadores de superfície celular, proteínas de adesão ou fatores de secreção (Kinzler e Vogelstein, 1998; Li e Dalton, 2006).

1.3. Melanoma

Melanoma é um tumor cutâneo caracterizado pela proliferação anormal de melanócitos que invadem a membrana. Dados epidemiológicos têm mostrado um aumento tanto na incidência quanto na mortalidade de pacientes com melanoma e a importância dessa neoplasia, relativamente comum, é atestada pelo fato de que o melanoma maligno causa 67% das mortes atribuídas a pacientes com câncer de pele. Quando diagnosticado precocemente, as chances de cura por excisão cirúrgica são altas; entretanto, os casos avançados de melanoma são muito resistentes às formas atuais de terapia pois não respondem às quimioterapias citotóxicas convencionais e representam um grande desafio terapêutico (Sigalotti et al, 2010). No contexto atual, um dos maiores desafios para a pesquisa em melanoma é identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, pois o índice de sobrevivência por tempo prolongado de pacientes com a doença metastática é baixo. Em média, pacientes que estão no estágio avançado da doença, sobrevivem de 6-10 meses (Chen et al., 2010). Consequentemente, a busca por novos agentes anti-melanoma é de grande interesse clínico.

Entre os diferentes tipos de câncer de pele, são considerados melanoma somente aqueles que se originam de melanócitos, as células responsáveis pela produção de melanina, presentes na camada superficial da pele, a epiderme. Os melanócitos normais são controlados por queratinócitos, os quais ditam quando os melanócitos podem crescer e quais moléculas de superfície devem ser expressas (Shih et al., 1994). Os queratinócitos, por sua vez, necessitam de um contato célula-célula mediado pela proteína de adesão E-caderina para estabelecer esse controle.

No melanoma, os melanócitos escapam do controle dos queratinócitos como consequência da diminuição da expressão de E-caderina (Fukunaga-Kalabis et al., 2008). As células ficam, então, aptas a deixar a epiderme e se comunicar com fibroblastos, células endoteliais, e células estromais. As células do melanoma passam a utilizar as proteínas produzidas por fibroblastos que também liberam fatores de crescimento que o melanoma não é capaz de sintetizar. Estes fatores de crescimento podem aumentar a capacidade de crescimento e invasão do melanoma. Dessa forma, o comando das células é revertido e o melanoma passa a controlar as outras células (Meier et al., 1998). A Figura 2 mostra um esquema representativo das fases de crescimento do melanoma humano.

Figura 2: Esquema representativo das fases de crescimento do melanoma humano. À esquerda, um exemplo de um tecido normal contendo: tecido subcutâneo, derme e mais superficialmente a epiderme, onde se encontram os melanócitos e nevo normais. À direita, um exemplo de tecido com tumor onde estão representadas 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 subcutâneo com o crescimento vertical e por fim a fase metastática. (Adaptado de www.microvet.arizona.edu/courses/VSC519/Secure/CaseMelanoma/CaseMelanoma.htm).

As propriedades do comportamento celular que definem suas funções são crescimento, morfologia, polaridade, adesão, migração e expressão de proteínas tecido-específicas. Essas propriedades medeiam as interações entre a expressão de genes específicos e as respostas da matriz extracelular para as células vizinhas e para efetores solúveis como fatores de crescimento e citocinas que, posteriormente, constituirão o fenótipo benigno ou maligno do tecido (Hanahan e Weinberg, 2000).

Várias vias de sinalização estão constitutivamente ativas em melanoma, entre elas, as vias RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/Akt (Akt) ativadas através de múltiplos mecanismos. Estas vias aparentemente possuem um papel de destaque no desenvolvimento e progressão de melanoma (Meier et al., 2005). Meier e colaboradores (2007) mostraram que a inibição concomitante das vias de sinalização das MAPKs e Akt resultaram na diminuição do crescimento, sobrevivência, migração e invasão de células de melanoma em culturas de pele. A ativação das vias de ERK1/2 e Akt são potentes inibidores de apoptose (Meng et al., 2010). Estudos mostram que a inibição da via MEK/ERK sensibiliza células cancerígenas para a indução de apoptose mediada por TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), um ligante que induz o processo de morte celular (Shigematsu et al., 2010). Além disso, resultados

similares foram obtidos com inibidores de PI3K/Akt e quando se utilizou inibidores para ambas as vias, os resultados foram adicionais (Zhang et. al, 2003; Smalley et al., 2006).

O estudo dessas vias de sinalização e a busca por novos inibidores do crescimento e avanço de melanoma são de extrema importância pelo fato desse tumor ser bastante metastático e ainda não existirem terapias eficazes para esse estágio de desenvolvimento da doença.

A metástase do tumor é uma sequência de eventos. Primeiramente células metastáticas devem se soltar do tumor primário perdendo o contato célula-célula, em seguida, essas células devem produzir fatores capazes de degradar a matriz extracelular; posteriormente, essas células precisam conseguir romper a barreira dos vasos ou linfonodos e atravessá-los. Uma vez na circulação, as células tumorais necessitam sobreviver a severos desafios mecânicos e imunológicos. As células que sobrevivem a esses desafios podem parar no capilar de um órgão distante, aderir na base sub-endotelial, extravasar através da matriz extracelular e formar uma colônia em um novo sítio metastático. A partir daí, deve ocorrer neoangiogênese nessa região para assegurar o contínuo crescimento das células. As respostas do microambiente tumoral juntamente com as alterações genéticas e epigenéticas em células cancerígenas sustentam a evolução metastática de tumores (Fidler et al, 2007).

O melanoma é reconhecido como imunogênico e a imunoterapia com este tipo de câncer vem sendo testada há mais de um século. O tumor expressa antígenos como Melan-A/MART-1 em associação com MHC de classe I que podem ser reconhecidos por linfócitos T citotóxicos e, aparentemente, a resposta imunológica pode contribuir com o insucesso do crescimento do melanoma. Entretanto, estudos recentes mostram que apesar do melanoma não ser capaz de evadir totalmente a resposta imune, este pode suprimir a imunidade localmente e desenvolver estágios criticamente mais avançados como a metástase (Polak et al., 2009).

Na literatura, poucos estudos mostram a participação do SCC no desenvolvimento tumoral e as vias de sinalização celular que os receptores desse sistema podem estar envolvidos em diferentes tipos de tumores. Além disto, até o momento não existem estudos mostrando se o desenvolvimento de melanoma inclui a participação de componentes do SCC. Considerando a relação estreita entre câncer e inflamação crônica e o papel do receptor B1 em mediar processos inflamatórios, este trabalho teve como objetivo estudar caminhos moleculares para um melhor entendimento dos mecanismos do desenvolvimento de melanoma, com foco no receptor B1 do SCC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a participação do receptor B1 no desenvolvimento de melanoma murino, levando-se em consideração as contribuições específicas da célula tumoral e do microambiente hospedeiro.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a presença dos componentes do SCC em células de melanoma murino B16F10;
- Analisar o desenvolvimento de tumor após a implantação de células de melanoma B16F10 em camundongos C57/BL6;
- Analisar o desenvolvimento tumoral após a implantação de células de melanoma B16F10 em camundongos C57/BL6 *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-});
- Analisar o perfil de ativação de diferentes vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no decorrer do processo de desenvolvimento de melanoma, à luz de um microambiente na presença ou ausência do receptor B1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O peptídeo DABK, agonista do receptor B1 foi obtido da Sigma-Aldrich e o peptídeo desArg⁹[Leu⁸]-BK (DALBK) foi sintetizado utilizando-se a estratégia FMOC – Fluorenilmetoxilcarbonil (Chan e White, 1999), sendo purificado por HPLC utilizando-se uma coluna C-18. Uma pequena alíquota deste peptídeo sofreu hidrólise ácida (Liu & Boykins, 1989) para posterior análise do seu conteúdo de aminoácidos a partir de um analisador de aminoácidos automático (Spackman et al., 1958). Posteriormente o peptídeo foi validado em modelo de contração de aorta de coelho (Regoli et al., 1977). A síntese do peptídeo bem como a análise da composição de aminoácidos foram feitas em colaboração com Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) com o auxílio do Dr. Felipe Roberti Teixeira. A validação funcional dos peptídeos foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP).

3.2. Estudos *in vitro*

3.2.1. Cultura de células

As células utilizadas nesse trabalho foram células de melanoma murino B16F10 (ATCC: CLR-6475). Essas células foram cultivadas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C em meio HAM-F10 (Gibco), pH 6,9 suplementado com 1,2 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 10 µg/mL de antibiótico gentamicina. Quando confluentes, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas da garrafa com uma solução de PBS/EDTA 10 mM. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 g, o precipitado ressuspenso em meio de cultura e parte dessa suspensão celular foi colocada em cultura novamente para a manutenção da linhagem, e outra parte utilizada para os experimentos ou descartada. Quando as células foram ressuspensas em PBS/EDTA e posteriormente colocadas em cultura novamente, considerou-se uma nova passagem. Para todos os experimentos, utilizou-se células entre as passagens 8 e 30.

3.2.2. Ensaio de ativação de ERK1/2

Para verificar a funcionalidade do receptor B1 nas células B16F10, semeou-se 3×10^5 células por poço em placas de 6 poços em meio HAM-F10 completo e incubou-se por 24 horas para a adesão das células. Após esse período, o meio das células foi trocado por meio sem SFB e as células foram incubadas por mais 16 horas. Procedeu-se do estímulo por meio da adição de meio de cultura contendo 1 μ M de DABK nos seguintes tempos: 10; 30; 60; 120 e 180 minutos. DABK foi dissolvido em meio HAM-F10 sem soro e sem antibiótico. No poço correspondente ao controle, adicionou-se apenas o meio de cultura sem o peptídeo em questão.

Ao final do estímulo, as placas foram imediatamente colocadas em gelo, o meio de cultura aspirado e 80 μ L de tampão de lise gelado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1%, Nonidet P-40 1% e os seguintes inibidores de protease, PMSF 2 mM, SBTI 100 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL, aprotinina 100 μ g/mL, benzamidina 10 mM e ortovanadato de sódio 2 mM) foram colocados na placa. O lisado celular foi recuperado, agitado em geladeira por 30 minutos e então centrifugado por 15 minutos a 4°C, 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado e as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (kit Anresco). Posteriormente, seguiu-se o ensaio de Western Blotting (descrito mais adiante), utilizando-se 25 μ g de proteína.

3.2.3. Ensaio de migração celular

Para a realização do ensaio de migração celular, semeou-se 3×10^5 células B16F10 por poço em placas de 12 poços. As células foram cultivadas em cultura por 48 horas para que as mesmas formassem uma monocamada com 100% de confluência. Após as 48 horas de incubação, as células foram privadas de soro e re-incubadas por mais 24 horas. Posteriormente, com o auxílio de uma ponteira de 10 μ L, fez-se um risco em forma de cruz na monocamada, de forma que as extremidades da cruz alcançassem todo o raio do poço (Figura 3). Para retirar as células que foram removidas ao se fazer a lesão, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e então as células receberam novamente meio sem soro. As células tratadas com o peptídeo agonista do receptor B1, receberam meio sem soro contendo 1 μ M de DABK.

No caso das células tratadas com o peptídeo antagonista do receptor B1, previamente ao risco, as células foram incubadas durante 30 minutos com 10 μ M de DALBK e após o risco e as lavagens em PBS, as células foram incubadas com meio sem soro contendo 1 μ M de DABK. Em seguida, as células foram fotografadas em um microscópio invertido de contraste de fase. Considerou-se nesse momento o tempo zero (0h). Fotografou-se 5 campos por poço conforme o esquema mostrado na Figura 3. Depois de fotografadas, as células foram incubadas novamente a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas, quando foram novamente fotografadas nos mesmos campos. Nesse momento, considerou-se o tempo 24 horas (24h).

As fotos foram quantificadas utilizando-se o programa Image J para se estabelecer a porcentagem de fechamento do risco (migração das células).

Figura 3: Esquema representativo dos campos fotografados nos tempos 0 e 24 horas após a lesão (risco) para a quantificação da migração celular.

3.2.4. Ensaio de viabilidade celular – MTT

Um dos métodos utilizados para verificar a viabilidade das células B16F10 quando tratadas com o peptídeo agonista do receptor B1, DABK, foi o ensaio de MTT (Sigma-Aldrich). 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 possuem 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. O ensaio é realizado juntamente com células controle, ou seja, que não receberam nenhum tipo de tratamento para que, posteriormente, o número de células viáveis presentes nos poços com tratamento possam ser comparadas com as células que não receberam nenhuma forma de estímulo.

Para a realização do ensaio de viabilidade celular por MTT foram semeadas 2×10^4 células B16F10 por poço em placas de 48 poços com um volume de meio de 500 μL . As células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas para a adesão das mesmas. Após esse período, o meio foi trocado e o tratamento com 1 μM de DABK foi administrado. As células foram então, incubadas por 24, 48 ou 72 horas e após estes períodos receberam 50 μL , por poço, de uma solução de 5 mg/mL de MTT em PBS. Incubou-se novamente as células, agora na presença de MTT, por 3 horas. Posteriormente o meio foi removido cuidadosamente para que as células não se desprendessem da superfície da placa. Adicionou-se 200 μL de isopropanol acidificado (ácido acético 0,4 M) e agitou-se levemente a placa em temperatura ambiente até que a coloração fosse completamente solubilizada/homogeneizada, para em seguida, realizar a leitura em espectrofotômetro utilizando-se um comprimento de onda de 570 nm.

3.2.5. Ensaio de viabilidade celular – Azul de Tripan

Para confirmar o ensaio de viabilidade celular realizado por MTT, fez-se um outro ensaio utilizando-se o reagente azul de tripan. A reatividade do azul de tripan é baseada no fato de que o cromóforo é negativamente carregado e não penetra na célula a não ser que a membrana esteja danificada. Sendo assim, tratando-se as células com esse reagente pode-se distinguir quais estão viáveis e quais não estão. As células coradas em azul indicam rompimento da membrana, portanto não são viáveis, enquanto que células que não estão coradas são viáveis.

Para esse experimento semeou-se, em meio HAM-F10 completo, 1×10^5 células em placas de 12 poços e incubou-se por 24 horas. Posteriormente, o meio das células foi substituído por meio sem soro contendo 1 μM de DABK sendo que o grupo controle recebeu somente meio sem soro. Essas células foram incubadas novamente e 24, 48 e 72 horas após a incubação, foram soltas com PBS-EDTA. 0,5 mL da suspensão de células foram misturadas a 0,1 mL de azul de tripan 0,5% e esta solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período as células foram contadas de acordo com sua coloração (Freshney 1987).

3.3. Modelo *in vivo*

3.3.1. Animais

Os experimentos em animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Protocolo número: 121/2009).

Para o ensaio *in vivo*, dividimos o trabalho em dois grupos, A e B: i) ao grupo A pertencem os animais selvagens que consideramos nosso controle. ii) ao grupo B pertencem os animais *knockout* para o receptor B1. Os animais dos dois grupos foram inoculados com células de melanoma B16F10, que comprovadamente expressam o receptor B1. Verificamos a importância do microambiente para o desenvolvimento tumoral: um com a presença do receptor B1 (animais selvagens) e outro sem a presença desse receptor (animais *knockout*). Esses animais foram obtidos a partir do CEDEME – pelo método de recombinação homóloga, Universidade Federal de São Paulo, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. João Bosco Pesquero, Departamento de Biofísica desta Universidade.

3.3.2. Modelo de indução de melanoma em camundongos C57/BL6, utilizando a linhagem B16F10

Uma vez confluentes, as células B16F10 foram soltas com PBS/EDTA 10 mM, contadas, e 3×10^5 células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos selvagens e *knockout* com idade entre 6-8 semanas. Para esse estudo, utilizou-se 18 animais selvagens e 18 animais *knockout* divididos em três grupos independentes de 6 animais. O peso e o desenvolvimento tumoral dos animais foram monitorados diariamente. O aparecimento tumoral inicialmente foi monitorado apalpando-se os tumores e posteriormente, conforme o tumor progredia, os volumes dos tumores foram calculados com a seguinte fórmula: $(\text{diâmetro maior} \times \text{diâmetro menor}^2)/2$ (Correa et al., 2005).

Após 22 dias da implantação das células tumorais, os camundongos foram eutanaziados. A eutanásia foi realizada por decapitação com os animais anestesiados (quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg). Imediatamente após a morte dos animais, os tumores foram removidos e processados para as análises de interesse. As amostras de tumor destinadas para a extração de RNA e de proteína foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e subsequentemente estocadas a -80°C . As amostras destinadas à análise de imunohistoquímica foram imediatamente imersas em solução de formol tamponado 10%. Além disso, coletou-se sangue dos animais por punção cardíaca antes do sacrifício para obtenção de amostras para o ensaio de ELISA. O plasma das amostras de sangue foi isolado por centrifugação e as amostras foram armazenadas à -20°C para posterior análise dos níveis de citocinas circulantes. A Figura 4 mostra um esquema representativo da inoculação de células B16F10 nos animais.

Figura 4: Representação esquemática da indução de melanoma em camundongos C57/BL6 a partir da injeção subcutânea de células tumorais no dorso desses animais.

3.4. Análise da expressão de RNAm por PCR

3.4.1. Extração de RNA total por Trizol

Para a extração do RNA total das amostras em estudo, foi utilizado o protocolo do reagente Trizol (*Invitrogen*). No caso dos tecidos, o material ainda congelado, foi macerado por pressão com o auxílio de um martelo e a cada 100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de

Trizol. Para as células, foram adicionados de 500-1000 μL de Trizol na placa de cultura, dependendo do diâmetro da placa. Em ambos os casos, após a homogeneização, foi adicionado clorofórmio em uma proporção de 1:5 (clorofórmio:Trizol), e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos. Após centrifugação, a fase aquosa foi separada e o RNA total precipitado com isopropanol. Após nova centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado em etanol 75% contendo Dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC), seco ao ar e ressuspensão em água Mili-Q estéril com 0,1% de DEPC. A integridade do RNA obtido foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e este RNA estando íntegro, foi quantificado por absorvância a 260 nm. Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e posteriormente mantidas à -80°C .

3.4.2. Tratamento das amostras com DNase

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

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

Antes de utilizar estas amostras para a síntese de cDNA, um controle da eficácia de degradação do DNA genômico foi feito através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se primers específicos para um gene de controle endógeno (ciclofilina B, Tabela2). Nesse caso, somente haveria amplificação dos fragmentos se a etapa de degradação do DNA genômico não fosse 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, aquelas que apresentaram amplificação foram tratadas com DNase novamente.

3.4.3. Transcrição Reversa

Para a transcrição reversa, utilizou-se 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 μ L de Oligo-dT (0,5 μ g/mL), incubação por 5 minutos à 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 μ L de tampão (5x); 2,4 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ L da mistura de dNTP em água DEPC (10 mM) e 1 μ L de enzima (1 U/ μ L). A reação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e depois por 60 minutos à 42°C, que é a temperatura ótima de funcionamento da enzima, permitindo que a mesma sintetizasse a fita de DNA complementar ao molde o RNA. Depois de transcorrida a incubação à 42°C, os tubos contendo o cDNA foram incubados à 70°C para a inativação da enzima e posteriormente armazenados à -20°C.

3.4.4. 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 20 pares de bases (pb) e amplificação de 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 o genoma murino para testar a sua especificidade. As sequências que se mostraram específicas para os genes de interesse e estivessem localizadas em exons diferentes, foram escolhidas. Todos os primers foram sintetizados pela Prodimol e mantidos a -20°C em soluções de 100 μ M até o momento da utilização.

Anterior ao início das 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 de primers cujas reações de amplificação resultaram em apenas uma banda de tamanho esperado, passaram para a segunda etapa de definição do número de ciclos a ser utilizado. Os primers que foram reprovados nessa etapa pela presença de bandas de amplificação inespecíficas foram novamente testados com temperaturas de anelamento superiores (entre 58-60°C). Os primers que foram reprovados por

ausência de amplificação foram descartados e novas seqüências foram desenhadas. Na segunda etapa de padronização, o número de ciclos a ser utilizado foi selecionado para que fossem obtidos produtos de PCR na sua fase exponencial de amplificação e, desta forma fosse possível observar diferenças de expressão dos genes analisados entre as amostras. Para isso, uma reação de PCR em um volume final de 50 μ L foi feita e a reação foi parada nos ciclos 28, 30, 32, 35, 38 e 40 para a retirada de uma alíquota de 5 μ 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 as intensidades das bandas pudessem ser comparadas diretamente e assim permitissem a escolha do número de ciclos necessários para trabalharmos 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 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 foram utilizadas. O CT (*cycle threshold*) obtido em cada uma das diluições foi plotado em regressão linear de forma a permitir observar a existência de correlação entre a quantidade de amostra colocada e o CT obtido. Em outras palavras, para determinar se ao reduzir a quantidade de amostra à metade, o CT aumentaria em 1. Foram aceitas apenas regressões com $r \geq 0,98$. Além disso, a eficiência da 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 os 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*. Essa etapa de validação dos primers que permite selecionar seqüências 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 $\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001).

A relação e as seqüências de todos os primers utilizados neste trabalho estão descritas nas Tabelas 2 e 3. Na tabela 2 estão as seqüências que foram utilizadas nos ensaios de PCR semi-quantitativo. Na tabela 3 estão as seqüências que foram utilizadas nos ensaios de PCR quantitativo. Todas as seqüências foram desenhadas baseadas no genoma de camundongo.

Tabela 2: Relação dos primers utilizados nos experimentos de PCR semi-quantitativo e suas seqüências:

Gene	pb	T _m (°C)	Direto (5' - 3')	Reverso (5' - 3')
Ciclofilina B	300	55	5' AAGGACTTCATGATCCAGGG 3'	5' TGACATCCTTCAGTGGCTTG 3'
Receptor B1	291	55	5' CACGAAGCTTGGCACTTTGT 3'	5' GTCTGTGAGCTCCTTCCAGAA 3'
Receptor B2	341	56	5' GCACTGTGGCCGAGATCTA 3'	5' GCTGTATTCCCTCATGGTCCT 3'
Receptor AT1	191	55	5' AACAACTGCCTGAACCCTCT 3'	5' ACTGGTCCTTTGGTCGTGAG 3'
Receptor AT2	341	55	5' TCTGTCTCAAAGAAGGAATCCC 3'	5' CAAACACAACAGCAGCTGG 3'
ECA	500	55	5' ACTGAAGACCCCCCA ACG 3'	5' GGAACGCCACACACATGT T 3'
CPM	141	55	5' AAACATTTGTCCTCTCTG CG 3'	5' TGTAGGCCAGGTGTTGGAAA 3'
VEGF	261	55	5' TGAGACCCTGGTGGACATCT 3'	5' CAACGCGAGTCTGTGTTTTT 3'

Tabela 3: Relação dos primers utilizados nos experimentos de PCR quantitativo e suas seqüências:

Gene	pb	T _m (°C)	Direto (5' - 3')	Reverso (5' - 3')
IL-6	280	55	5' CATCCAGTTGCCTTCTTGGG 3'	5' CCAGTTTGGTAGCATCCATC 3'
IL-10	193	55	5' GGTTGCCAAGCCTTATCGGAAATGA 3'	5' TTCACCTGCTCCACTGCCTTGCT 3'
TNF-α	140	55	5' AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA 3'	5' AGGTACAACCCATCGGCTGG 3'
TGF-β	94	55	5' GCAACATGTGGAACCTACCA G 3'	5' CAGCCACTCAGGCGTATCA 3'
IFN-γ	179	55	5' CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG 3'	5' AATCTCTTCCCCACCCCGAATCA 3'
VEGF	77	55	5' ACTGGACCCTGGCTTTACTG 3'	5' TCTGCTCTCCTTCTGTCTGTG 3'

3.4.5. PCR semi-quantitativo

Utilizou-se o protocolo da enzima Platinum Taq polimerase (Invitrogen) em um volume total de 25 μ L. Cada reação recebeu: 2,5 μ L de tampão para PCR (10x); 0,75 μ L de MgCl₂ (50 mM); 0,5 μ L do oligonucleotídeo senso e 0,5 μ L do oligonucleotídeo anti-senso e 0,25 μ L da enzima Platinum Taq polimerase (5 U/ μ L). Uma vez pronta a reação, os tubos foram colocados em termociclador, onde foram submetidos por 2 minutos a 94°C, o que permitiu a desnaturação das fitas de DNA.

Depois de separadas as fitas, as amostras foram submetidas a ciclos subsequentes de amplificação. Estes ciclos consistiram em 3 etapas de 1 minuto, a primeira de 94°C para a separação das fitas, a segunda de 55°C (ou mais, conforme estabelecido na etapa de padronização), para que os primers pareassem com a região da fita ao qual possuíam complementaridade, e a terceira de 72°C, temperatura ótima de funcionamento da polimerase, onde a fita de DNA foi estendida. O número de ciclos realizados dependeu do gene de interesse e foi realizado conforme descrito no item anterior.

Para a análise da expressão dos receptores B1, B2, e das enzimas ECA e CPM, uma eletroforese em gel de agarose 1% foi feita para os produtos de PCR, realizando-se a fotodocumentação do mesmo. O arquivo foi aberto no programa *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para a análise de densitometria. A partir dos valores das áreas de cada banda, calculou-se a razão entre a expressão de cada RNAm analisado e o controle endógeno, ciclofilina B. Em seguida, foi gerado um gráfico representando os níveis de expressão diferencial de cada gene analisado (Graph Prism).

3.4.6. PCR em tempo real – quantitativo

Para as análises de PCR em tempo real, o reagente Platinum SYBR Green qPCR Supermix UDG com ROX (Invitrogen) e o equipamento *ABI Prism 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems) foram utilizados. 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 $2(-\Delta\Delta C(T))$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para os oligonucleotídeos cuja eficiência de reação não fosse aceita, mas que representassem uma regressão satisfatória e que atendesse 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). Os resultados obtidos pelo método do $2(-\Delta\Delta C(T))$ foram analisados e plotados no Graph Prism e as análises relativas ao controle endógeno (ciclofilina B) também foram feitas pelo método $2(-\Delta\Delta C(T))$ (Livak & Schmittgen, 2001).

O número de ciclos para a ciclofilina B foi 26 enquanto que para todos os outros primers, utilizou-se 40 ciclos. A concentração dos primers utilizada nos experimentos foi de 10 μ M.

3.5. Análise da expressão de proteínas

3.5.1. Extração de proteínas totais do tecido

Aproximadamente 100 mg do tecido tumoral ainda congelado foi lavado duas vezes com PBS e em seguida foram acrescentados 150 μ L de tampão de lise gelado (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, SDS 0.1%, Nonidet P-40 1%) e os seguintes inibidores de protease: PMSF 2 mM, SBTI 100 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL, aprotinina 100 μ g/mL, benzamidina 10 mM e ortovanadato de sódio 2 mM). Após ser macerado, o lisado celular foi agitado em geladeira por 30 minutos e em seguida, centrifugado por 15 minutos a 4 °C, 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado e as proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (kit Amresco).

3.5.2. Ensaio de Western Blotting

Após quantificação dos extratos protéicos, 50 μ g (no caso dos tecidos) ou 25 μ g (no caso de células) das proteínas totais de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*GE Healthcare*) e foi realizado Western Blot utilizando anticorpos contra p53, p38, Akt, e ERK 1/2 (formas total e fosforilada), caspase 3, citocromo *c*, JNK e β -actina. As bandas foram reveladas utilizando-se o kit ECL (*Santa Cruz*) e o programa image J (<http://rsb.info.nih.gov/y/>) foi utilizado para a quantificação densitométrica das bandas. A partir dos valores das áreas de cada banda, foi calculada a razão entre a expressão de cada proteína analisada e de β -actina (*Millipore* número de catálogo: 04-1116) caspase 3 (*Cell Signaling* – número de catálogo: 9661), JNK (*Abcam* – número de catálogo: ab47337) ou a razão entre as suas formas fosforiladas e total (para p53, p38, Akt e ERK 1/2). p53 total: *Cell Signaling* – número de catálogo: 2524; p53 fosforilada: (Ser15) *Cell Signaling* – número de catálogo: 9284; p38 total: *Cell Signaling* – número de catálogo: 9212; p38 fosforilada: (Thr180/Tyr182) *Cell Signaling* – número de catálogo: 9216; Akt total: *Cell Signaling* – número de catálogo: 4691; Akt fosforilada: (Ser473) *Cell Signaling* – número de catálogo: 4060; ERK1/2 total: *Cell Signaling* – número de catálogo: 4695; ERK1/2 fosforilada: (Thr202/Tyr204) *Cell Signaling* – número de

catálogo: 9106; Gerou-se então um gráfico que mostra os níveis de expressão diferencial de cada proteína analisada (Graph Prism).

3.5.3. Dosagem de citocinas circulantes - ELISA

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, IL-6, IL-10 e TNF- α . Após a incubação por 14-16 h à 4°C as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/TWEEN 0,05% (pH 7,2), bloqueadas em tampão de bloqueio (PBS/BSA 1%) e incubadas por 12 h à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagens, foram depositados 100 µL de cada uma das amostras (amostras de plasma sanguíneo dos animais, obtidas por punção cardíaca) seguido de uma incubação de 16-24 h à 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 à temperatura ambiente. O conjugado avidina-biotina peroxidase diluído 200 vezes foi adicionado após o ciclo de lavagem e foi incubado por 30 min à temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato TMB (Tetrametilbenzidine) após o 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 450-570 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.

3.6. Análises histológicas

3.6.1. Histologia das amostras de tumor

As análises histopatológicas foram feitas em colaboração com o laboratório da Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos do departamento de Patologia da FMRP-USP. As amostras de tumor foram retiradas do animal preservando-se todo o microambiente ao seu redor.

Imediatamente após a coleta, as mesmas foram fixadas em uma solução de formol tamponado por 24-48 h antes de dar início ao processamento histológico. As amostras foram em um primeiro momento desidratadas segundo a seguinte bateria de incubações: álcool 80%, álcool 100% (4 vezes) e xilol (3 vezes).

Após a terceira passagem em xilol, as amostras foram deixadas em repouso para a eliminação do xilol restante e logo passaram por três incubações em parafina para a inclusão na mesma.

Os blocos de parafina foram deixados em repouso a -20°C por 24 h para assegurar sua solidificação. Transcorrido esse período, os mesmos foram cortados em micrótomo de Minot em cortes de 5 μm que foram fixados em lâminas de vidro.

Para a coloração dos cortes foi utilizado o protocolo de Hematoxilina-Eosina (H&E) desidratadas seguindo outra bateria de incubações assim descritas: xilol (3 vezes), álcool 100%, álcool 95%, álcool 80%, água corrente, Hematoxilina filtrada, álcool ácido (3 vezes), Solução de Scott, álcool 80% (3 vezes), álcool 95%, Eosina, álcool 80%, álcool 85%, álcool 100% (3 vezes), xilol (3 vezes), posteriormente, fez-se a montagem das lâminas acrescentando-se Bálsamo do Canadá para fixação das lamínulas.

Depois de secas, as lâminas foram analisadas para a identificação da presença de vasos e células em processo de mitose. Para a análise quantitativa desses componentes, foram selecionados 10 campos diferentes de grande aumento de cada amostra (para a contagem de vasos, $A=10\times20$ e para a contagem de células em processo de mitose, $A=10\times40$). Obteve-se uma média dos valores obtidos em cada campo e esta foi representada graficamente utilizando-se o programa *Graph Prism*.

3.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por teste *t* de student e *one way* ANOVA com o auxílio do programa *Graph Prism*.

4. RESULTADOS

4.1. Modelo *in vitro*

4.1.1. Análise da expressão de RNAm dos componentes do SCC em células de melanoma murino B16F10

Avaliamos a expressão do RNAm dos receptores clássicos, B1 e B2, do SCC, bem como a expressão das enzimas ECA e CPM na linhagem de melanoma B16F10 por reação de PCR semi-quantitativo (Figura 5). Podemos notar que o receptor B1, normalmente expresso apenas em condições após indução é expresso nas células tumorais B16F10, enquanto que o receptor B2 e a ECA não apresentaram níveis de expressão detectáveis. Nesta linhagem também constatamos a expressão de CPM, sendo esta a enzima responsável pela geração do peptídeo agonista do receptor B1 de cininas. Dessa forma, mostramos que as células B16F10 apresentam um SCC funcional para a via do receptor B1.

Figura 5: Análise da expressão do RNA mensageiro por PCR semi-quantitativo do receptor B1, receptor B2, enzima conversora de angiotensina (ECA) e carboxipeptidase M (CPM) na linhagem celular de melanoma murino, B16F10. Como controle positivo (C+), utilizou-se amostra de cDNA de coração de animais com melanoma; C-: Controle negativo; P: Padrão de peso molecular (*1kb plus – Invitrogen*).

4.1.2. Análise da funcionalidade do receptor B1 em células de melanoma murino B16F10 através da ativação de ERK1/2

Embora tivesse sido comprovada a expressão do RNAm do receptor B1 em células B16F10, também verificamos se esse receptor estava ou não funcional nestas células. Para isso, avaliamos a ativação de ERK1/2 através de western blotting para as proteínas ERK1/2

fosforiladas. Após o estímulo com o agonista do receptor B1, observamos na Figura 6 que o receptor B1 está funcional em células B16F10, onde obtivemos um pico de ativação de ERK1/2 com o tempo de 10 minutos. A ativação desta quinase se reduz pela metade após 30 minutos não se mantendo sustentada após 3 horas de tratamento.

Figura 6: Avaliação da ativação de ERK1/2 em diferentes tempos após o estímulo com 1 µM do peptídeo agonista do receptor B1, desAgr⁹-BK (DABK). Painel superior: quantificação gráfica de três experimentos independentes; os valores foram obtidos em relação ao controle (células que não receberam DABK). Painel inferior: imagens representativas de western blotting de ERK1/2 na sua forma fosforilada e ERK1/2 total.

4.1.3. Análise do efeito da ativação do receptor B1 na migração de células de melanoma murino B16F10

Uma vez que a capacidade de migração das células é uma característica de extrema importância para o desenvolvimento tumoral, analisou-se esse efeito em células de melanoma B16F10 após serem estimuladas com DABK. A figura 7 mostra fotografias de culturas de células B16F10 nos tempos zero e 24 horas após o estímulo com 1µM de DABK. Estes dados mostram a diminuição de aproximadamente 15% da capacidade de migração das células que tiveram o receptor B1 ativado em relação ao grupo controle.

Figura 7: Efeito da ativação do receptor B1 na migração de células da linhagem B16F10. A) Imagens representativas das células nos tempos 0 e 24 horas após o tratamento com 1 μ M de DABK durante 24 horas (Objetiva=10x). B) Quantificação da porcentagem de fechamento da lesão em três experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: teste *t* de student. * $p < 0,05$. DABK: desArg⁹-BK;.

Para confirmar os resultados, um segundo experimento foi realizado, agora tratando as células previamente com um peptídeo antagonista do receptor B1. Incubamos as células com 10 μ M de DALBK durante 30 min antes do estímulo com DABK e fotografamos as células nos tempos 0 e 24 h como realizado anteriormente (Figura 8).

Figura 8: Efeito da ativação do receptor B1 na migração de células da linhagem B16F10. A) Imagens representativas das células nos tempos 0 e 24 h após o tratamento com 1 μ M de DABK ou das células previamente tratados com 10 μ M de DALBK durante 30 min antes do tratamento com 1 μ M de DABK, 24 horas (DALBK + DABK) (Objetiva=10). B) Quantificação da porcentagem de fechamento da lesão em três experimentos independentes realizados em triplicata. Análise estatística: one way ANOVA * $p < 0,05$. DABK: desArg⁹-BK; DALBK: desArg⁹[Leu⁸]-BK.

4.1.4. Análise da viabilidade das células B16F10 após tratamento com 1 μ M de DABK

Uma pergunta que nos ocorreu após a execução do experimento de migração celular foi se a diminuição da capacidade de migração das células B16F10 tratadas com DABK poderia ser devido à sua perda de viabilidade por causa do tratamento com DABK. Através de um experimento de viabilidade celular, concluímos que a perda da capacidade de migração é um efeito direto do tratamento com o agonista do receptor B1 e independente de efeitos na viabilidade celular. Analisamos a viabilidade das células 24, 48 e 72 h após o tratamento com DABK através do ensaio de viabilidade celular por MTT. Os resultados estão mostrados nas Figuras 9 e como podemos constatar, as células continuam viáveis mesmo após o tratamento com DABK em diferentes tempos. Os resultados estão expressos em relação ao controle que são células submetidas às mesmas condições experimentais, porém não receberam tratamento com o agonista do receptor B1.

Figura 9: Análise da viabilidade celular por MTT após o tratamento com 1 μ M de DABK em três experimentos independentes.

4.2. Modelo *in vivo*

4.2.1. Indução de melanoma a partir da injeção de células B16F10 em camundongos C57/BL6 selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-})

Para os ensaios *in vivo*, induzimos melanoma em camundongos C57/BL6 que pesavam aproximadamente 25 g através da injeção subcutânea de células de melanoma murino no dorso dos animais. Os animais foram divididos em dois grupos, n = 18 animais cada: o primeiro grupo correspondeu aos animais selvagens que receberam a injeção de $3,0 \times 10^5$ células B16F10 no dorso, e o segundo grupo correspondeu aos animais *knockout* para o receptor B1 que receberam essas células nas mesmas condições. Os animais foram monitorados diariamente com relação ao peso corporal, aparecimento e crescimento do tumor. Decorridos 22 dias após a implantação do tumor, os animais foram eutanasiados e os tumores foram removidos e armazenados para as análises moleculares e histológicas. A escolha do número de dias necessários para a remoção dos tumores foi baseada em experimentos prévios realizados no laboratório, nos quais foram avaliadas as diferentes fases do desenvolvimento tumoral de acordo com os dias decorridos da implantação de células B16F10 (Figura 10). De acordo com os limites estabelecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais com relação ao tamanho do tumor, optamos por realizar a eutanásia desses animais no 22º dia após a implantação das células tumorais, período em que o volume dos tumores não ultrapassavam 2000 mm³.

Anterior ao início das análises, realizou-se um controle para verificar se os animais *knockout* para o receptor B1 de fato não apresentariam a expressão gênica desse receptor. Para isso, analisamos a expressão do RNAm de coração e rim de animais selvagens e *knockout* para o receptor B1 e não foi encontrada a expressão desse receptor em amostras de animais *knockout*.

Figura 10: Curva de crescimento tumoral nos camundongos C57/BL6 (média da progressão entre as linhagens selvagem e $B1^{-/-}$) que sofreram indução de melanoma a partir da injeção subcutânea de células de melanoma murino, B16F10.

4.2.2. Monitoramento do peso corporal e do desenvolvimento do tumor após a implantação de células B16F10 em animais selvagens e animais $B1^{-/-}$

O peso dos animais e o desenvolvimento dos tumores foram monitorados diariamente após a implantação de 3×10^5 células B16F10 no dorso desses animais e como mostrado nas Figuras 11 e 12, não houve diferença significativa no peso corporal e tamanho do tumor entre as linhagens selvagem e $B1^{-/-}$.

Seguidos 22 dias após a implantação das células B16/F10 nos camundongos, os animais foram eutanasiados e os tumores foram removidos e pesados antes de serem armazenados para as análises posteriores. Confirmando os resultados obtidos no período de monitoramento do crescimento tumoral, observamos que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos com relação ao peso dos tumores (Figura 13).

Figura 11: Variação do peso corporal de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados em porcentagem de variação do peso corporal de cada grupo e são referentes a três grupos independentes com 6 animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

Figura 12: Análise da progressão tumoral de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados representam uma média dos volumes de tumores de três grupos independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

Figura 13: Análise do peso do tumor de animais selvagens (WT) e knockout para o receptor B1 (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados por indivíduo. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

Outra característica relacionada à agressividade de um tumor está na sua capacidade em invadir ou romper tecidos vizinhos. Sendo assim, anterior à remoção dos tumores observamos as características da pele dos animais na região onde o tumor se desenvolveu subcutaneamente e constatamos que mais de 50% dos animais B1^{-/-} apresentaram um rompimento da pele na região em que o tumor se desenvolveu. Nos animais selvagens, apenas 15% apresentaram essa característica de rompimento da pele na área tumoral (Figura 14).

Figura 14: Porcentagem de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}) que apresentaram rompimento da pele na região em que o melanoma primário de células B16F10 foi implantado. Gráfico representativo de três experimentos independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. * $p < 0,05$.

4.2.3. Análise da expressão gênica do receptor B1 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

Realizamos um PCR semi-quantitativo para verificar se o RNAm do receptor B1 estava sendo expresso na massa tumoral. Como mostra a Figura 15, o receptor B1 está cerca de duas vezes mais expresso em tumores desenvolvidos em animais selvagens comparado aos animais B1^{-/-}. Isso pode ser devido à contribuição de outros tipos celulares para a composição da massa tumoral, no caso dos animais KO, estes não possuem o receptor B1.

Figura 15: Análise da expressão gênica do receptor B1 em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram analisados como expressão relativa do receptor B1/Ciclofilina B de três grupos experimentais diferentes, com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. **p*<0,05.

4.2.4. Análise da expressão gênica da Enzima conversora de angiotensina I nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

Realizamos também um PCR semi-quantitativo para verificar se o RNAm da Enzima conversora de angiotensina I estava sendo expresso nesses tumores apesar de não ter sido detectada sua expressão em células B16F10. Como pode ser verificado pela Figura 16, o RNAm da ECA foi expresso em ambas as amostras de tumores. Além disso, nas amostras de tumores de animais selvagens houve uma expressão de RNAm da ECA significativamente maior quando comparado aos tumores desenvolvidos em animais selvagens. A ECA participa da degradação de cininas em metabólitos inativos, e dessa forma pode contribuir para uma menor ativação dos receptores B1 presentes nos tumores implantados nos animais B1^{-/-}.

Figura 16: Análise da expressão do RNAm da enzima conversora de angiotensina I (ECA) em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm da ECA/Ciclofilina B de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. **p*<0,05.

4.2.5. Análise da expressão de RNAm da carboxipeptidase M nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

Sabemos que a carboxipeptidase M é uma enzima responsável por retirar a arginina terminal da bradicinina, gerando DABK, um peptídeo capaz de ativar o receptor B1, sendo assim, para verificar se essa enzima estava sendo modulada nos diferentes grupos, fizemos a análise da expressão de seu RNAm por PCR semi-quantitativo e podemos verificar que não houve diferença significativa de sua expressão nos tumores de animais selvagens e B1^{-/-} (Figura 17).

Figura 17: Análise da expressão gênica da carboxipeptidase M (CPM) em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm da CPM/Ciclofilina B de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.6. Análise da expressão de RNAm do receptor AT1 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A ECA, atua tanto na inativação da bradicinina quanto na conversão de angiotensina I em angiotensina II que desencadeia a sinalização dois receptores acoplados à proteína G denominados AT1 e AT2. Essa ação da ECA é responsável pela interligação entre o SCC e o Sistema Renina-Angiotensina (Campbell et al., 1993). A angiotensina II é conhecida mediadora nos processos de hipertensão, aterosclerose, diabetes, doenças cardíacas e doenças renais. Grande parte desses processos são controlados pelo receptor AT2 que é expresso na maioria das células (Yayama et al., 2008). Verificamos, portanto, se tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} apresentariam alguma diferença quanto à expressão gênica dos receptores AT1 e AT2.

Nossos resultados mostram uma maior expressão do receptor AT1 em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} (Figura 18), com relação à expressão do receptor AT2, não obtivemos amplificação das amostras nos testes de PCR.

Figura 18: Análise da expressão gênica do receptor AT1 em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm do receptor AT1/Ciclofilina B de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p < 0,05$.

4.2.7. Análise da expressão de RNAm do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$

A proteína VEGF estimula a proliferação e sobrevivência de células endoteliais e promove a angiogênese e permeabilidade vascular (Zhao et al., 2010). Devido ao fato dos tumores serem dependentes de angiogênese para se desenvolver, buscamos analisar a expressão do RNAm de VEGF no melanoma desenvolvido nos grupos de animais. Observamos que não houve diferença significativa na expressão de VEGF entre os tumores de animais selvagens e $B1^{-/-}$. A análise da expressão gênica de VEGF primeiramente foi realizada por PCR semi-quantitativo Figura 19 (A) e posteriormente realizou-se essa análise pela técnica de qPCR Figura 19 (B). O resultado foi reproduzido.

Figura 19: Análise da expressão gênica do fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 ($B1^{-/-}$) por PCR semi-quantitativo (A) e qPCR (B). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de VEGF/Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes, com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.8. Análise histológica dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$ quanto à presença de vasos sanguíneos

Com o intuito de analisar mais profundamente o potencial de vascularização dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$, realizamos uma análise histológica contando-se o número de vasos presentes nesses tumores. Contamos o número de vasos em 10 campos diferentes de cada lâmina, $N=6$. Notamos que os vasos dos tumores desenvolvidos em animais selvagens são de menor calibre comparando-se com os vasos de tumores de animais $B1^{-/-}$; entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada com relação à quantidade de vasos presentes nos dois grupos (Figura 20).

A

B

Figura 20: Análise da vascularização do tumor. A: análise histológica de tumores desenvolvidos a partir da injeção subcutânea de 3×10^5 células de melanoma em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 ($B1^{-/-}$). Cortes de 5 μ m do tumor foram corados com H&E e fotografados em microscópio ($A=20 \times 10$). As setas apontam os vasos. B: média do número de vasos contados em cada campo do tumor; foram contados 10 campos diferentes em cada amostra de tumor com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.9. Análise da expressão de interleucina 6 (IL-6) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A IL-6 é uma citocina produzida em sítios de inflamação agudo e crônico e é secretada no plasma sanguíneo induzindo uma resposta inflamatória. Os níveis desta citocina encontram-se aumentados em patologias como câncer, diabetes e artrite reumatóide (McGreal et al., 2010). Verificamos os níveis de expressão transcritos para IL-6 em tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} e não foram encontradas diferenças significativas na expressão deste RNAm (Figura 21).

Figura 21: Análise da expressão gênica de IL-6 em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de IL-6/Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.10. Análise da expressão de IL-6 em plasma de animais selvagens e B1^{-/-} que desenvolveram melanoma através da injeção subcutânea de células B16F10

Avaliamos também os níveis de IL-6 no plasma sanguíneo de animais selvagens e B1^{-/-} que desenvolveram melanoma através da injeção subcutânea de células B16F10. A Figura 22 mostra os baixos níveis encontrados para esta citocina em escala de picogramas/mL de plasma. Pode-se observar também que não houve diferença significativa entre os animais selvagens e B1^{-/-}.

Figura 22: Avaliação por ELISA da secreção de IL-6 nas amostras de plasma de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Foram analisados três grupos experimentais diferentes com três animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.11. Análise da expressão de interleucina-10 (IL-10) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A IL-10 é uma citocina imunossupressora que medeia reações imunes nas células. Essa proteína contribui para a sobrevivência de células B, proliferação celular e produção de anticorpos. A função da IL-10 vem sendo estudada e ainda causa controvérsias uma vez que esta citocina pode atuar como pró-inflamatória ou anti-inflamatória (Boyman et al., 2007). No caso do desenvolvimento tumoral, a super expressão de IL-10 em um microambiente tumoral pode diminuir o reconhecimento do tumor pelo sistema imune permitindo o escape

do tumor (Mosser e Zhang, 2008). Sendo assim avaliamos a expressão de IL-10 por PCR quantitativo e como mostrado na Figura 23, tumores desenvolvidos em animais $B1^{-/-}$ expressam mais IL-10 que tumores desenvolvidos em animais selvagens.

Figura 23: Análise da expressão gênica de IL-10 em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 ($B1^{-/-}$). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de IL-10/Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. * $p < 0,05$.

4.2.12. Análise da expressão de IL-10 em plasma de animais selvagens e $B1^{-/-}$ que desenvolveram melanoma através da injeção subcutânea de células B16F10

Para verificar os níveis de IL-10 no plasma desses animais realizamos um ensaio de ELISA e como no caso da IL-6, a citocina IL-10 apresentou-se também em níveis baixos, em escala de picogramas/mL de plasma. Além disso, podemos notar que não houve diferença significativa na secreção de IL-10 no plasma dos animais selvagens e $B1^{-/-}$ (Figura 24). No entanto, devemos levar em consideração que, nesse estágio, o efeito da presença do tumor possa se refletir somente em seu microambiente, não sendo possível ainda induzir a produção de níveis mais altos dessa citocina que pudessem ser detectados no ensaio de ELISA em amostras de plasma.

Figura 24: Avaliação por ELISA da secreção de IL-10 nas amostras de plasma de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Foram analisados três grupos experimentais diferentes com três animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.13. Análise da expressão de RNAm do fator de necrose tumoral - α (TNF- α) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória sendo citotóxica pra uma variedade de células tumorais (Estevam et al., 2005). Também é um fator essencial na mediação de doenças auto-imune e inflamação (Tsianos e Katsanos, 2009). Verificamos a expressão do RNAm de TNF- α nos tumores e não encontramos diferenças significativas na expressão gênica de TNF- α entre os tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} (Figura 25).

Figura 25: Análise da expressão de TNF- α em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de TNF- α /Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.14. Análise da expressão de RNAm do fator de transformação de crescimento- β (TGF- β) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$

TGF- β é uma citocina envolvida em diversas respostas biológicas como transformações fenotípicas de fibroblastos, proliferação celular, síntese e deposição da matriz extracelular e também no desenvolvimento tumoral (Zhang et al., 2010). Nesse último caso, TGF- β pode agir como um supressor tumoral através do seu potencial antiproliferativo ou como um promotor tumoral por mediar a supressão da resposta imune em tumores (Yang et al., 2010). Em melanoma, as células geralmente induzidas por TGF- β de melanócitos normais, conseguem escapar do sinal de parada do ciclo celular (Javelaud et al., 2008). Avaliamos então os níveis de expressão gênica de TGF- β nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$ e não encontramos diferenças significativas entre esses dois grupos; mas podemos verificar uma tendência de maior expressão em tumores de animais $B1^{-/-}$ (Figura 26).

Figura 26: Análise da expressão gênica de TGF- β em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 ($B1^{-/-}$). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de TGF- β /Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.15. Análise da expressão de RNAm do interferon- γ (IFN- γ) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

O IFN- γ é uma citocina que regula a expressão de MHC de classe I e o processamento e apresentação de antígenos nas células. Tipicamente exibe respostas antivirais, antiproliferativas, imunomodulatórias e antitumorais. Além disso, IFN- γ medeia o crescimento e divisão de células somáticas e modula processos apoptóticos influenciando a sobrevivência celular (Maher et al., 2007). Avaliamos a expressão gênica dessa citocina nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} e como mostra a Figura 27, não houve diferença significativa entre os tumores de animais selvagens e B1^{-/-}.

Figura 27: Análise da expressão gênica de IFN- γ em tumores desenvolvidos a partir da injeção de B16F10 em animais selvagens (WT) e animais *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}). Os dados foram plotados como expressão relativa do RNAm de IFN- γ /Ciclofilina B, a partir do cálculo $\Delta\Delta CT$, de três grupos experimentais independentes com seis animais cada. Análise estatística: teste *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.16. Análise da ativação do fator de transcrição, p53, nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

O supressor tumoral p53 é um fator de transcrição envolvido em várias respostas celulares como apoptose, autofagia, parada do ciclo celular e envelhecimento. Danos no DNA levam à sua ativação que é controlada em níveis pós traducionais por fosforilação ou acetilação (Farnebo et al., 2010). Sendo assim, avaliamos a ativação de p53 nos tumores de animais selvagens e B1^{-/-}, a partir da medida de seu nível de fosforilação. Tumores provenientes de animais B1^{-/-} apresentaram uma maior ativação de p53 quando comparados aos tumores desenvolvidos em animais selvagens (Figura 28).

Figura 28: Análise, por western blotting, da ativação de p53 em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3x10⁵ células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão da forma fosforilada em relação à forma total da proteína. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. *p<0,05.

4.2.17. Análise da clivagem de caspase 3 em células de tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

Certas vias apoptóticas liberam proteínas da mitocôndria (Ravindran et al., 2010). O citocromo *c* se liga ao fator ativador de protease 1 induzindo sua mudança conformacional levando à ativação do apoptosomo. O apoptosomo recruta, dimeriza e ativa uma caspase iniciadora, caspase 9, que é clivada gerando caspase 7 e 3 (Tait e Green, 2010). Verificamos então a via apoptótica envolvendo a caspase 3 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}. Como podemos observar na Figura 29, não houve diferença significativa com relação à clivagem da caspase entre os dois grupos, podemos observar apenas uma tendência em haver uma maior clivagem nos tumores desenvolvidos em animais selvagens, o que representaria um maior índice de apoptose em tumores desenvolvidos nesses animais.

Figura 29: Análise, por western blotting, da expressão de caspase 3 em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão caspase 3 em relação à β -actina. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. $p > 0,05$.

4.2.18. Análise da ativação de p38 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) é ativada por estímulos pró-inflamatórios e também em situações de estresse celular permitindo que a célula reconheça sinais externos e ative vias específicas respondendo adequadamente a essas anormalidades (Lee et al., 2010). Além disso, a p38 MAPK está envolvida em várias outras respostas biológicas como proliferação, diferenciação, e apoptose, sugerindo uma participação não só em situações de inflamação, mas também em câncer (Yong et al., 2009). Sendo assim, verificamos a ativação de p38 MAPK nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}. Como mostra a Figura 30, tumores desenvolvidos em animais selvagens apresentam uma ativação de p38 MAPK duas vezes maior quando comparadas com tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}.

Figura 30: Análise, por western blotting, da ativação de p38 em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3x10⁵ células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão da forma fosforilada de p38 em relação à forma total da proteína. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. *p<0,05.

4.2.19. Análise da ativação de c-Jun N-terminal kinases (JNK) nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A via da JNK, assim como a via da p38 é estimulada principalmente por citocinas inflamatórias e estresse no microambiente (Lee et al., 2010). O papel da JNK na tumorigênese é evidenciado pelos altos níveis de atividade de JNK encontrados em diversas linhagens celulares de câncer (Russo et al., 2010). Verificamos como estava o nível de ativação dessa proteína nos tumores dos diferentes grupos. Não foi observada diferença significativa quanto a expressão de JNK nos diferentes grupos (figura 31).

Figura 31: Análise, por western blotting, da expressão de JNK em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão de JNK em relação à β-actina. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. $p > 0,05$

4.2.20. Análise da ativação de Akt nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A via de sinalização PI3K/Akt é responsável por regular a sinalização de múltiplos processos biológicos sendo frequentemente desregulada em câncer. A ativação dessa via acarreta diferentes respostas celulares como crescimento, migração e diferenciação (Martelli et al., 2009). Avaliamos, então, os níveis de fosforilação de Akt nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}. Podemos observar que tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} apresentaram maiores índices de fosforilação de Akt quando comparados com tumores de animais selvagens (Figura 32).

Figura 32: Análise, por western blotting, da ativação de Akt em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão da forma fosforilada da proteína Akt em relação à forma total da proteína. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. * $p < 0,05$.

4.2.21. Análise da ativação de ERK1/2 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}

A proteína ERK1/2 é um componente da cascata das MAPKs e sua ativação via fosforilação está envolvida na regulação de proliferação celular, sobrevivência e diferenciação (Gudermann, 2001). A análise dos níveis de fosforilação de ERK1/2 em tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} nos mostrou um aumento de mais de duas vezes na fosforilação de ERK1/2 em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} quando comparados com animais selvagens (Figura 33).

Figura 33: Análise, por western blotting, da ativação de ERK1/2 em tumores de animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor B1 (B1^{-/-}) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Os dados estão representados pela razão de expressão da forma fosforilada de ERK1/2 em relação à forma total da proteína. O painel inferior mostra imagens representativas de 3 experimentos independentes com quatro animais cada. A análise estatística foi feita pelo test *t* de student. **p*<0,05.

4.2.22. Análise histológica dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$ quanto à presença de células em processo de mitose

Para verificar esses resultados de aumento na proliferação celular em tumores desenvolvidos em animais $B1^{-/-}$, comparamos o número de células em mitose a partir de um análise histológica em tumores desenvolvidos em animais selvagens e $B1^{-/-}$. A Figura 34 confirma esses resultados mostrando que os tumores desenvolvidos em animais $B1^{-/-}$ apresentam um maior número de células em mitose quando comparados aos tumores desenvolvidos em animais selvagens, reforçando os dados que tumores de animais $B1^{-/-}$ apresentam maior índice de proliferação celular.

Figura 34: Análise da proliferação celular no tumor. A) Análise histológica de tumores desenvolvidos em animais selvagens (WT) e *knockout* para o receptor ($B1^{-/-}$) inoculados com 3×10^5 células B16F10. Cortes de 5 μ m corados em solução de H&E foram fotografados em microscópio, (Objetiva = 40x). As setas indicam células em processo de divisão. B) Número de células em mitose em cada campo do tumor, número de campos = 10 para cada amostra, foram analisadas amostras de seis animais. Análise estatística: teste *t*. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Recentemente, vários estudos têm mostrado a participação do SCC em diferentes patologias e não somente em eventos vasculares e inflamatórios como se acreditou por muitos anos (Costa-Neto et al., 2008; Kakoki et al., 2009; Pruneau et al., 2010).

No caso de neoplasias, existem alguns estudos mostrando o envolvimento do SCC em modelos de câncer de próstata (Taub et al., 2003), câncer de pulmão (Chee et al., 2008) e em diversas linhagens de tumores epiteliais humanos (Herman et al., 1999).

Atualmente, é bem estabelecido que as cininas são rapidamente geradas após uma lesão tecidual e que estas possuem um papel crucial no desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório (Kaplan et al., 2010). Além do mais, tanto a ativação do receptor B1 de cininas quanto a do receptor B2, são importantes no processo de inflamação aguda e crônica (Regoli et al., 1993). No caso de inflamação crônica, o receptor B1 possui um papel importante potencializando ou substituindo as ações do receptor B2 (Costa-Neto et al., 2008).

Considerando os relatos da relação estreita entre inflamação crônica e desenvolvimento de câncer (Millas *et al.* 1987; Duff *et al.* 2003), e que o receptor B1 possui sua expressão induzida em situações de inflamação ou lesão tecidual, hipotetizamos que o SCC poderia ter um papel relevante no desenvolvimento tumoral. Sendo assim, o nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar o efeito do receptor B1 de cininas no desenvolvimento tumoral a partir de um modelo de melanoma murino. Escolhemos esse modelo pelos seguintes motivos: 1. as células de melanoma murino B16F10 constitutivamente expressam o receptor B1 e como mostrado pelo ensaio de ativação de ERK1/2 (Figura 7), o receptor é funcional nessas células, 2. o melanoma é um tipo de câncer com poucas chances de cura em estágios avançados, não existindo atualmente, nenhuma terapia eficiente para o tratamento dessa doença que apresenta um índice de mortalidade bastante alto (Chen et al., 2010), 3. não há registros na literatura focando o SCC no desenvolvimento de melanoma.

Nossos primeiros resultados *in vitro* mostraram a expressão do receptor B1 e da enzima CPM, (responsável pela formação de peptídeos agonistas do receptor B1 a partir da clivagem de peptídeos agonistas do receptor B2) (Zhang et al., 2008), em células de melanoma murino B16F10. Com relação à ECA, enzima que conecta o SCC com o sistema renina-angiotensina, e é responsável pela degradação dos agonistas dos receptores B1 e B2 em peptídeos inativos, não houve um nível de expressão detectável nessas células. Quanto à presença do receptor B2, pouco podemos inferir sobre a sua expressão nessas células pois não conseguimos uma detecção razoável nem mesmo no controle positivo. A presença da enzima CPM nessas células poderia estar contribuindo para a expressão do receptor B1. Além disso, a ausência da ECA nestas células também contribuiria para manter o nível de expressão dos

agonistas do receptor B1, uma vez que estes não seriam degradados. Uma vez detectado o RNAm do receptor B1 nessas células, fomos verificar se esse receptor estava funcional. O receptor B1 quando estimulado por seu agonista, leva à ativação de ERK1/2 (Yeagle et al., 2003). Assim, para confirmar a funcionalidade do receptor B1, células B16F10 foram estimuladas com 1 μ M de DABK em diferentes tempos (0, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h e 3 h) e posteriormente os níveis de fosforilação de ERK1/2 dessas células foram avaliados. Verificamos que o receptor estava funcional, embora não fosse capaz de manter uma ativação sustentada de ERK1/2. A maior ativação de ERK1/2 ocorreu no tempo de 10 minutos e caiu pela metade após 30 minutos de estímulo.

Um outro ensaio de funcionalidade do receptor B1 em células B16F10 que realizamos, agora levando em consideração uma das características tumorais destas células, foi o experimento de migração celular.

Existe uma semelhança entre a fase normal de embriogênese e a regeneração de órgãos com o processo de invasão tumoral. Em uma lesão tecidual, algumas células se desprendem de suas vizinhanças e se tornam *anoiks*, uma forma apoptótica de morte celular que ocorre quando as células perdem a adesão com a matriz extracelular. Entretanto, algumas dessas células ainda podem sobreviver e passam a se dividir e proliferar, colonizando a região lesada e restabelecendo o tecido (Frisch et al., 2001; Lu et al., 2008 e Zaret et al., 2008). Isso pode ocorrer também em eventos patológicos como por exemplo, o de invasão tumoral. Nesse caso, as células mais externas se soltam dos contatos intercelulares e infiltram as regiões adjacentes. Algumas células conseguem, então, sair da fase latente e iniciar uma reorganização ocasionando danos em órgãos adultos e também se tornando competentes para desencadear o processo de metástase (Yang e Weinberg, 2008).

Taub e colaboradores (2003) realizaram um experimento no qual avaliavam o potencial de células de câncer de próstata em se desassociar da matriz extracelular e migrar para uma região lesionada. Nesse estudo, os autores viram que quando essas células eram estimuladas com DABK, agonista do receptor B1, a sua capacidade de migração era aumentada, ao passo que quando essas mesmas células eram previamente tratadas com DALBK, antagonista do receptor B1, e posteriormente estimuladas com DABK, esse efeito era revertido.

No presente estudo, realizamos o mesmo experimento utilizando as células de melanoma murino, B16F10. Entretanto, vimos um efeito contrário ao encontrado por Taub e colaboradores. Quando estimulamos as células B16F10 com DABK, o fechamento da lesão realizada na monocamada das células, que aqui estamos considerando como a capacidade de

migração das mesmas, diminuiu em média 15%. Esse efeito foi revertido quando tratamos as células previamente com DALBK. Em outro trabalho realizado em nosso laboratório (dados ainda não publicados) verificamos que quando células de uma outra linhagem de melanoma murino, TM5, eram estimuladas com DABK, a migração dessas células era inibida em aproximadamente 50%. Isso nos leva a propor que o receptor B1 possa atuar na sinalização de diferentes vias de maneira célula-específica, e que no caso de células de melanoma B16F10 e TM5, a ativação desse receptor desencadeia um efeito inibitório da migração de células tumorais.

Complementando o estudo, para mostrar que esse efeito inibitório na migração celular não era consequência de perda da viabilidade celular após tratamento com DABK, realizamos um ensaio de viabilidade celular, utilizando-se o reagente MTT. Os resultados obtidos mostraram que após o estímulo das células com DABK, as células continuavam viáveis com perfil semelhante ao controle. Ou seja, o efeito de diminuição da migração não teria sido causado pela perda de viabilidade das células e sim pelo estímulo do receptor B1.

Com todas essas evidências da participação do receptor B1 no desenvolvimento de melanoma, partimos então para o estudo *in vivo* desse tumor. O estudo *in vivo* se baseou na implantação de células de melanoma B16F10 em animais selvagens e *knockout* para o receptor B1. Após a implantação das células, monitoramos os animais diariamente quanto ao peso corporal bem como quanto ao aparecimento e volume do tumor. Passados 22 dias da implantação das células, removemos e armazenamos os tumores para a extração de RNA, proteínas e para processamento para as análises histológicas. Amostras de plasma desses animais também foram coletadas e armazenadas.

Os animais selvagens e B1^{-/-} não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso corporal e quanto ao volume e peso do tumor. Entretanto, no período analisado, os tumores estavam em um estágio de desenvolvimento bastante controlado, apresentando ainda uma característica encapsulada; assim, não podemos afirmar se essa semelhança entre os diferentes grupos se manteria caso os tumores estivessem em um estágio mais avançado. Adicionalmente, uma característica bastante importante foi observada anterior à remoção dos tumores: notamos que 50% dos animais B1^{-/-} apresentavam a pele rompida na região onde o tumor se desenvolveu, enquanto que apenas 15% dos animais selvagens apresentaram essa característica.

Uma das hipóteses para esse fato seria de que animais B1^{-/-} poderiam ser mais sensíveis e a ausência desse receptor poderia acarretar em uma menor resistência da pele, levando assim o rompimento da mesma por um estímulo mecânico (tumor). A segunda

hipótese seria de que animais B1^{-/-} apresentariam um microambiente mais propício ao desenvolvimento de metástase uma vez que o tumor desenvolvido nestes animais foi agressivo a ponto de romper um órgão, no caso a pele, com mais facilidade que tumores desenvolvidos em animais selvagens.

A segunda hipótese citada anteriormente é sustentada pelo fato de que a expressão do RNAm do receptor B1 estava diminuída em 50% nos tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}. É importante ressaltar que as células inoculadas nos dois grupos de animais foram exatamente as mesmas, o que indica claramente a influência do microambiente nesses tumores. Sendo assim, duas considerações importantes devem ser feitas a partir de agora: uma leva-se em conta o animal que não possui o receptor B1 e portanto diferentes respostas do hospedeiro como sinalização de vias de sobrevivência e apoptose poderiam ser desencadeadas com relação à tumorigênese e ao crescimento de melanoma. A outra consideração diz respeito aos próprios tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, os quais expressam o receptor B1 em menor quantidade; assim, o tumor também pode estar desencadeando diferentes respostas, seja com relação ao sistema imunológico ou mesmo com relação às vias de sinalização envolvidas no seu desenvolvimento.

Em busca de uma maior compreensão do SCC e da sua ligação com o Sistema Renina-Angiotensina com relação ao desenvolvimento de melanoma, e para, finalmente, podermos relacionar os dados obtidos *in vitro* com os resultados obtidos *in vivo*, analisamos também a expressão do RNAm do receptor B2 de cininas e do receptor AT1 de angiotensina II, bem como a expressão das enzimas CPM e ECA nesses tumores.

A ECA é a enzima que conecta os sistema renina angiotensina e o SCC. Essa enzima converte BK e DABK em peptídeos inativos e também é responsável pela clivagem de angiotensina I em angiotensina II, agonista dos receptores AT1 e AT2 (Erdös et al, 2010).

Em nosso trabalho, verificamos que a expressão gênica de ECA está aumentada cerca de 2 vezes em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} comparados aos animais selvagens. A expressão do receptor AT1 também está aumentada nesses animais. A angiotensina II além de controlar a pressão sanguínea e a homeostase hidroeletrolítica, também age como um fator mitogênico através de seu receptor AT1 em células de músculo liso e miócitos (Nguyen e Contrepas, 2008). De fato, bloqueadores do receptor AT1, uma classe de agentes anti-hipertensivos, mostraram suprimir as vias de sinalização mediadas por fatores de crescimento ou citocinas (Uemura, 2006; Dolley-Hitze, 2010; Feng, 2010). Além do mais, a ausência da ECA contribuiria também para uma menor ativação dos receptores B1 presentes nos tumores implantados nos animais B1^{-/-}. Esses dados, em conjunto, reforçam a nossa hipótese de que o

aumento da expressão gênica do receptor AT1 e da ECA, aliado à diminuição da expressão do receptor B1, podem estar contribuindo para o caráter mais agressivo do tumor desenvolvido em animais B1^{-/-}.

Quanto à CPM, não observamos diferenças significativas em sua expressão gênica nos diferentes grupos de animais. Também realizamos experimentos para verificar a expressão dos receptores B2 e AT2, mas não obtivemos sucesso na amplificação das reações com os primers utilizados.

Com relação às vias de sinalização, sabemos que um estímulo particular pode ditar diferentes respostas dependendo do tipo de célula e o microambiente também apresenta um papel fundamental para o desencadeamento das respostas celulares.

As células eucarióticas possuem diversas proteínas quinases como ERK1/2, Akt, p38, JNK, p53 etc. Em resposta a danos do DNA, essas células ativam um complexo de proteínas quinases para controlar a progressão do ciclo celular (Reinhardt e Yaffe, 2009). As proteínas quinases referidas como MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) estão envolvidas na maioria das vias de transdução de sinal e controlam diversas respostas celulares como localização de proteínas, transcrição de genes, embriogênese, diferenciação e apoptose. (Cuadrado e Nebreda, 2010; Reinhardt, 2010). Sendo que a desregulação de sinalização dessas MAPKs podem levar à doenças como câncer (Keshet e Seger, 2010; Murphy et al., 2010). Desta maneira, realizamos o estudo de algumas vias das MAPKs que poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de melanoma.

A via da p38 MAPK além de ser ativada em situações de estresse celular, também tem uma importante participação nos processos de resposta imune, regulação da sobrevivência celular e diferenciação (Lee et al., 2010). Estudos mostram que ratos com deficiência de p38 α , um dos mais frequentes membros da família p38, são mais suscetíveis a tumorigênese de pulmão e fígado, confirmando a hipótese de p38 α funcionar como um supressor tumoral (Ventura et al., 2007).

A p38 é ativada em situações de estresse celular e é responsável por desencadear cascatas de sinalização que tentam reverter esse processo (Cuadrado e Nebreda, 2010). Em nosso trabalho, verificamos que tumores desenvolvidos em animais selvagens apresentaram uma maior ativação de p38. Levando-se em consideração o microambiente no qual o tumor foi desenvolvido, a presença do receptor B1 (animais selvagens), permitiu a ativação mais eficiente da via de sinalização p38 MAPK. Ainda, nos tumores desenvolvidos em animais selvagens, o RNAm do receptor B1 está mais expresso que em tumores desenvolvidos em

animais B1^{-/-}. Assim, o receptor B1 poderia participar do processo de ativação de p38 contribuindo para uma tentativa de controle do ciclo celular da massa tumoral.

A via da JNK, também uma MAPK, assim como a via da p38 é estimulada principalmente por citocinas inflamatórias e estresse no microambiente (Lee et al., 2010). O papel da JNK na tumorigênese é evidenciado pelos altos níveis de atividade de JNK encontrados em diversas linhagens celulares de câncer; entretanto esse papel no desenvolvimento tumoral ainda é controverso (Kennedy e Davis, 2003). Nateri e seus colaboradores (2005) mostraram, através de um modelo de câncer de intestino em camundongos, que a diminuição da fosforilação de JNK reduziu o número e o tamanho dos tumores, aumentando a sobrevivência desses animais. Em contraste, Kennedy e Davis (2003) mostraram um mecanismo de supressão tumoral mediado por JNK e sugeriram que esse mecanismo pudesse ser mediado pelos efeitos pró-apoptóticos da ativação de JNK. Com isso, podemos inferir que a via da JNK desempenha um papel contexto-dependente no desenvolvimento tumoral. Nossos resultados mostram que não houve diferenças significativas na ativação de JNK em tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}.

A proteína ERK1/2 também é um membro importante da família das MAPKs sendo um fator chave na transmissão de sinais (Keshet e Seger, 2010). A ativação de ERK1/2, que se dá através de cascatas de fosforilações sequenciais, pode desencadear processos de sobrevivência e proliferação celular (Gudermann, 2001). Além disso, tem sido mostrado que ERK1/2 possui um papel importante em diferentes tipos de câncer (Lawrence et al., 2008). A sinalização ERK1/2 é responsável, em parte, pela oncogênese. A via de ERK1/2 também é conhecidamente importante para a ativação do Fator Nuclear Kappa- β (NF-KB). O NF-KB por sua vez está envolvido na regulação de proliferação celular, apoptose e oncogênese (Zhang *et al.* 2008).

Alguns estudos mostram que ERK1/2 pode estar envolvida no processo de transição epitélio-mesênquima facilitando a migração celular, mesmo sem uma ativação sustentada por longos períodos de tempo em tumores (McCawley et al., 1999 e Glading, et al., 2004). Algumas serino-proteases transmembrana do tipo II estão reguladas em diversos tipos de câncer, promovendo crescimento tumoral, invasão, transição epitélio-mesênquima e metástase (Mathias et al., 2010). Estudos recentes mostram que essa transição epitélio-mesênquima induzida por serino-proteases também conta com a ativação de ERK 1/2 (revisão de Choi et al., 2008).

Matsubayashi e colaboradores (2004) mostraram, através de experimentos de cicatrização celular, que a quinase ERK 1/2 está ativada em células que migram para a região

lesionada. Essas células com maiores concentrações de ERK1/2 fosforilada, mostraram maiores níveis de mobilidade e um formato mais alongado. A inibição da fosforilação de ERK 1/2 resultou na diminuição da migração das células para a região lesionada.

Nossos resultados mostraram uma ativação de ERK 1/2 duas vezes maior em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, fortalecendo a hipótese de uma maior agressividade desses tumores quando comparados com tumores desenvolvidos em um microambiente com a presença do receptor B1. Nos tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, uma via de proliferação celular mais ativada, poderia desencadear não somente sinais de proliferação, mas também favorecer processos de migração e/ou invasão celular.

Ainda com relação às vias de proliferação, a via PI3K/Akt também desempenha um importante papel nesse processo. A ativação de Akt pode ser estimulada através de fatores de crescimento e estresse oxidativo (Hu et al., 2010). Entre os alvos de Akt, estão diversas moléculas pró-apoptóticas que são inativadas quando fosforiladas por Akt. A ativação de Akt conhecidamente inibe vias apoptóticas e/ou ativa vias de proliferação indicando que a mesma pode agir como um fator de sobrevivência celular (para revisão, ver Matheny Jr e Adamo, 2009).

Em 2000 Wang e seus colaboradores realizaram um estudo para verificar o papel da via PI3-K/Akt durante a resposta celular ao estresse oxidativo. Nesse estudo, os autores trataram células com H₂O₂ e constataram a ativação de Akt nas células tratadas com doses biologicamente relevantes de H₂O₂. Ainda, os autores mostraram que essa ativação ocorria via EGFR/PI3-K, e resultou na sobrevivência celular e na proteção da célula contra o estresse oxidativo.

As vias de sinalização MEK/ERK e PI3-K/Akt são frequentemente reguladas em câncer e são potentes inibidores de apoptose (Hersey e Zhang, 2009). Uma das funções mais conhecidas da Akt é o seu papel na promoção do crescimento celular, levando a um aumento na massa tumoral (Martelli et al., 2009). Esse mecanismo pode ocorrer através da ativação do complexo mTOR, o qual é regulado tanto por nutrientes quanto pela sinalização de fatores de crescimento (Manning e Cantley 2007) .

Quando analisamos a ativação de Akt em melanoma desenvolvido em animais selvagens e animais B1^{-/-}, verificamos que há um aumento significativo na ativação de Akt em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, isto é, essa via de proliferação celular está mais ativada em tumores que apresentam menor expressão do RNAm do receptor B1. Nossos resultados mostram que as vias envolvidas em proliferação, em especial, ativação de ERK1/2 e Akt, estão mais ativadas nos tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}.

Corroborando esses dados, a análise histológica dos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-} corados em H&E, nos mostrou que os tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} apresentam um número significativo maior de células em processo de mitose quando comparados com os tumores desenvolvidos em animais selvagens.

Como mencionado anteriormente, essa maior ativação das vias de proliferação e sobrevivência celular em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} pode ser devido ao microambiente que não possui esse receptor. A ausência do receptor, poderia de alguma forma afetar o sistema imune e intermediar o escape do tumor do sistema imunológico do animal, facilitando então a proliferação dessas células. Ou ainda, essas vias poderiam estar mais ativadas pelo fato desses tumores apresentarem uma menor expressão do receptor B1. Assim, nossos resultados mostram que a diminuição do receptor B1 no hospedeiro, no microambiente tumoral ou no próprio tumor contribui para um aumento na proliferação celular em melanoma murino.

Um outro fator que devemos levar em consideração é a conexão entre as vias de sinalização. Um exemplo de interligação entre as vias das MAPKs é a inibição de ERK1/2 pela p38 MAPK. Em células normais, a sinalização de p38 causa uma rápida inativação da via de ERK1/2, mediada por PP2A (Proteína fosfatase 2) (Wang et al., 2003). Além disso, a interação direta entre ERK1/2 e p38 MAPKs também pode inibir a fosforilação de ERK1/2 (Junttila *et al.*, 2008). De fato, nossos resultados mostraram uma maior ativação de p38 em tumores desenvolvidos em animais selvagens e ao mesmo tempo uma diminuição na fosforilação de ERK1/2 nesses tumores quando comparados com tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}.

Uma conversa cruzada entre JNK e p38 já foi vista em modelos *in vivo* e *in vitro* de câncer. Múltiplos estímulos podem simultaneamente ativar ambas as vias; entretanto, a ativação de JNK e p38, em muitos casos, podem desencadear respostas antagônicas (Suzuki et al., 2008).

A proteína supressora tumoral p53 é um fator de transcrição e seus níveis de expressão variam de acordo com o tipo e o estágio de desenvolvimento de um determinado tecido (Farnebo et al., 2010). Em células normais, a proteína p53 biologicamente funcional possui uma meia vida curta e dificilmente é detectável experimentalmente (Gudkov e Komarova, 2007).

Nossos resultados demonstraram que a proteína p53 está significativamente mais ativada em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}. Em um primeiro momento, poderíamos pensar que haveria um maior número de células em apoptose se levássemos em consideração

a função clássica da ativação de p53. Esse aumento do número de células em apoptose nos tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} corroboraria com os resultados de volume e peso do tumor, que não apresentaram diferenças significativas nos grupos de animais. Ou seja, ao mesmo tempo que haveria uma maior ativação das vias de proliferação em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, também estaria havendo uma maior ativação de vias apoptóticas desses tumores, não ocorrendo portanto, grandes alterações no volume e peso dos tumores desenvolvidos nesses animais quando comparados com animais selvagens.

Entretanto, sinais de estresse como danos no DNA induzidos por quimioterapia ou radiação, hipóxia, depleção de nucleotídeos ou expressão de oncogenes podem induzir o acúmulo de p53 em células normais acarretando na transcrição de diferentes categorias de genes alvos de p53 como aqueles que regulam a parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (Watanabe et al., 2010). Assim, a ativação de p53 pode determinar sinais tanto para a sobrevivência quanto para a morte celular (Bykov *et al.*, 2003; Lu e El-Deiry, 2009)

Desta maneira, a ativação de p53 e as respostas subsequentes depende de um contexto específico. Assim, a maior ativação de p53 em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} poderia significar também um sinal de maior estresse celular. Ou seja, em tumores que possuem menor expressão do receptor B1, poderia haver uma maior instabilidade genômica, mas essa instabilidade poderia não ser suficiente, ainda, para desencadear processos apoptóticos.

Ainda com relação aos processos apoptóticos, as caspases são cisteína proteases que desencadeiam apoptose. Essas proteases são ordenadas em uma cascata de caspases iniciadoras capazes de clivar e ativar caspases efetoras levando a célula à apoptose. Sabe-se que seu mecanismo de ação é desencadeado por danos ao DNA ou clivagem de proteínas que estão envolvidas na manutenção da arquitetura celular (Chang e Schimmer, 2007).

Nos vertebrados, a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria leva à liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranas da mitocôndria. Este é o evento crucial para iniciar a ativação de caspases e consequentemente a apoptose. Com essa liberação de proteínas da mitocôndria, o citocromo *c* se liga ao fator ativador de protease 1 induzindo sua mudança conformacional e ativação do apoptossomo. O apoptossomo recruta, dimeriza e ativa uma caspase iniciadora, a caspase 9 que é clivada gerando caspase 7 e 3. Assim, a liberação do citocromo *c* da mitocôndria e/ou a presença de caspase 3 nas células é um indicativo de apoptose (Revisado por Tait e Green, 2010).

Alguns estudos mostraram que células de câncer de mama possuem uma deficiência funcional na caspase 3 e que essa deficiência poderia ser responsável pela ineficiência do

tratamento com Tamoxifen, um indutor de morte celular, em alguns cânceres de mama (Jänicke et al., 1998 e Fazi et al., 2008).

Assim, com o intuito de analisar outras vias apoptóticas, que não a via da proteína p53, que poderiam estar agindo no desenvolvimento de melanoma murino, verificamos a presença de pró-caspase e de caspase 3 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}, podendo assim, verificar se a caspase está sendo clivada nos diferentes grupos.

Nossos resultados mostraram que não há diferença significativa na expressão de pró-caspase e de caspase 3 nos tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}. Entretanto, podemos verificar que tumores desenvolvidos em animais selvagens, apresentam uma maior tendência em clivar a pró-caspase e consequentemente uma maior tendência em ter mais células em processo de apoptose quando comparados com animais knockout para o receptor B1. Em suma, nossos dados mostram que os tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} possuem vias de proliferação mais ativadas que os tumores desenvolvidos em animais selvagens. Porém, com relação às vias apoptóticas estudadas, esses tumores, no estágio de desenvolvimento analisado, ainda se apresentam equiparadas.

Uma observação relevante é que esses tumores, quando removidos para estudo, ainda estavam encapsulados e bastante contidos. Seria interessante estudos com tumores em estágios mais avançados para maior elucidação das vias apoptóticas envolvidas em tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}.

Um outro fator importante para o desenvolvimento tumoral é o processo de angiogênese. Para suprir a necessidade de nutrientes e oxigênio e manter o seu crescimento, o tumor requer a formação de novos vasos (Bussolino et al., 2009). Um balanço entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos regulam a angiogênese, e a perda do balanço normal entre esses fatores, conhecida como troca angiogênica, frequentemente é necessária para o crescimento de tumores acima de 1 mm³ (Italiano Jr. et al., 2002).

O VEGF é um dos fatores chave na regulação de angiogênese (Dvorak et al., 2002); esse fator estimula células endoteliais quiescentes a se dividirem e formarem novos vasos sanguíneos. A cascata de sinalização de VEGF ocorre através de receptores, e é responsável por regular mitogênese de células endoteliais, migração, indução de proteinases acarretando o remodelamento da matriz extracelular, aumento da permeabilidade vascular, manutenção e sobrevivência de novos vasos e melhora na quimiotaxia de progenitores da medula óssea para o estabelecimento de um nicho metastático (Zwaans e Bielenberg, 2007).

Apesar de o crescimento tumoral ser dependente de angiogênese, na ausência de VEGF, o tumor pode explorar uma vascularização pré-existente em um processo chamado de co-

opção (Dome et al., 2002). Um estudo em modelo de glioblastoma em camundongos, no qual a angiogênese foi inibida, mostrou que a adaptação do tumor foi capaz de aumentar os seus níveis de infiltração e da co-opção pela vascularização pré-existente (Rubenstein, 2000). Um outro estudo, utilizando células de melanoma humano em cérebro de camundongos, mostrou que a angiogênese poderia ser bloqueada por uma terapia anti-VEGF; no entanto, em órgãos densamente vascularizados, esse bloqueio resulta em uma progressão tumoral sustentada, ao invés de senescência tumoral, via o processo de co-opção (Leenders et al., 2004).

Nossos resultados mostram que não há diferenças significativas na expressão gênica de VEGF entre os diferentes grupos. Também realizamos uma análise histológica dos tumores quanto à presença de vasos e verificamos, novamente, que não houve diferenças significativas entre a quantidade de vasos presentes em tumores desenvolvidos em animais $B1^{-/-}$ e animais selvagens. Entretanto, uma característica que chamou bastante a nossa atenção durante a avaliação histológica dos tumores foi a estrutura desses vasos. Notamos que os vasos dos tumores desenvolvidos em animais selvagens eram menores e possuíam uma borda mais definida quando comparados com os animais $B1^{-/-}$.

Uma vascularização normal é caracterizada por uma vascularização simétrica, enquanto que a vascularização tumoral é desorganizada, possui diversas ramificações e os seus diâmetros bastante indefinidos (Chang et al., 2000; di Tomaso et al., 2005). Além disso, a estrutura da parede dos vasos em tumores também é anormal, apresenta grandes junções inter-endoteliais, aumento do número de vesículas e a falta de uma membrana definida (Dvorak et al., 2002). Essas características provavelmente decorrem de uma combinação de fatores mecânicos e moleculares.

Considerando algumas das etapas do processo metastático como entrada das células tumorais nos vasos sanguíneos ou linfonodos, sobrevivência dessas células nos vasos, extravasamento para fora dos vasos e reestabelecimento em um órgão mais distante, a falta de uma membrana mais espessa e definida, a presença de ramificações e o grande número de vesículas poderiam facilitar o processo metastático. Ainda, quanto mais acentuadas essas características, maiores são as chances de escape das células do seu nicho primário e restabelecimento em um nicho distante, desencadeando então a metástase (Revisão de Hanahan, 2001).

Como citamos anteriormente, os vasos presentes em tumores desenvolvidos em animais $B1^{-/-}$ apresentaram uma membrana menos definida com maiores ramificações, o que poderia facilitar o processo metastático. Assim, o fato de não haver diferenças significativas entre a expressão gênica de VEGF entre os dois grupos e não haver diferenças significativas

entre o número de vasos, a análise qualitativa desses vasos mostrou que os tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} possuem um maior potencial metastático do que tumores desenvolvidos em animais selvagens. Contudo, outros fatores de vascularização ainda necessitam ser estudados para conclusões mais sólidas.

A hipótese da imunoedição combina dois conceitos fundamentais da imunologia dos tumores: imunosobrevivência e escape imune, para assim gerar um microambiente tolerante ao crescimento de células malignas (Pennington et al., 2010). O desenvolvimento desse microambiente tolerante ao tumor é alcançado através de uma variedade de mecanismos imunossupressores que funcionam em conjunto para não reconhecimento e não rejeição da malignidade pelo sistema imune.

As citocinas exibem um amplo espectro de atividades nas células alvo, regulando importantes funções celulares e respostas biológicas (Lopez et al., 2010). Diferentes citocinas exibem atividades opostas em células alvo e um balanço entre essas ações é necessário para a regulação de diferentes respostas imunológicas e biológicas como crescimento, diferenciação e morte celular (Kroczynska et al., 2009).

Sendo assim, selecionamos algumas citocinas de grande importância para a regulação do crescimento tumoral, entre elas, TGF- β , IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10; e realizamos uma análise da sua expressão gênica nos tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} e animais selvagens.

O provável papel da IL-10 é atuar como uma citocina com propriedades anti-inflamatórias e imunossupressivas capazes de desviar a resposta imune anti-tumoral do hospedeiro através da inibição da função de macrófagos e células dendríticas (Yigit et al., 2010). A IL-10 pode agir como um fator de crescimento para certos tipos de tumores como melanomas, mielomas e linfomas e algumas evidências mostram que IL-10 também pode contribuir para a sobrevivência de células malignas através da geração de um microambiente permissivo para o crescimento tumoral e metástase (Zeng et al., 2010). De fato, a alta expressão de IL-10 em cânceres humanos está correlacionada com um prognóstico ruim (O'Garra et al., 2008). Além disso, Inoue e colaboradores (2006) sugeriram que a eliminação de células B poderia terapeuticamente melhorar respostas imunes anti-tumorais através da diminuição da produção de IL-10.

Em nossos resultados, verificamos que a expressão de IL-10 está aumentada em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}, sugerindo que um microambiente sem o receptor B1 pode contribuir para um aumento nos níveis de expressão dessa citocina imunossupressora, e facilitar o escape da resposta imunológica do hospedeiro pelo tumor. Este aumento na

expressão de IL-10 pode ter ocorrido não somente devido ao microambiente mas também pelo fato de os tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-} apresentarem uma menor expressão desse receptor. Assim, hipotetizamos que a ausência do receptor B1 estimularia a produção de IL-10 e desencadearia outras vias de sinalização e/ou o escape do sistema imune que de alguma forma contribuiriam para o avanço do desenvolvimento tumoral, à medida que há um aumento de uma citocina imunossupressora em tumores desenvolvidos em animais B1^{-/-}.

A sinalização de TGF- β pode controlar diversas respostas celulares como proliferação, diferenciação e remodelamento da matriz extracelular (Yang et al., 2010). Conseqüentemente, a sinalização de TGF- β tem grande importância na patogênese de diversas doenças incluindo câncer, doenças autoimunes e fibróticas (Shi e Massague, 2003).

Quando TGF- β foi deletado do compartimento estromal ou epitelial das células, ocorreu um aumento da reação inflamatória promovendo desenvolvimento e progressão tumoral. Entretanto, a super expressão de TGF- β 1 em epitélio de cabeça e pescoço resultou em inflamação, angiogênese e hiperproliferação epitelial (Yang et al., 2010). Esse contraste entre as funções do TGF- β no desenvolvimento tumoral ainda não é bem claro e não se sabe se existem diferentes mecanismos de citocinas ou de receptores de citocinas envolvidos na deleção ou superexpressão de TGF- β .

Os IFNs são reconhecidos como mediadores transcricionais em diversos processos biológicos incluindo respostas imune adaptativa e inata, crescimento celular, apoptose e desenvolvimento hematopoiético (Maher et al., 2007). Um microambiente com altos níveis de IFN- γ está associado com a eliminação dos tumores, enquanto que a eliminação de IFN- γ parece contribuir para a progressão dos tumores (Ostrand-Rosenberg, 2008). Células NK medeiam a imunidade antitumoral através da produção de IL-2 e IFN- γ (Yang, 2010).

A proteína TNF- α se liga e ativa seu receptor TNFR que participa na regulação de processos inflamatórios (Deng, 2007). TNFR pode desencadear respostas tanto de sobrevivência celular, via NF- κ B ou de apoptose, via caspase 8 (Balkwill, 2006). Sendo assim, dependendo do microambiente, TNF- α pode potencialmente agir como um promotor do desenvolvimento tumoral ou como um auxiliar na resposta anti-tumor. Em altas doses, TNF- α pode promover necrose tumoral hemorrágica através da destruição seletiva de vasos do tumor ativando células T que atacam e eliminam células tumorais; entretanto os níveis de TNF- α requeridos para esse processo são extremamente tóxicos (Estevam et al., 2005). Já em situações em que a expressão de TNF- α não é extremamente alta, pode ocorrer o crescimento tumoral e até mesmo metástase (Szlosarek et al., 2006).

A IL-6 atua na transição entre inflamação aguda e crônica, modulando a expressão de citocinas e moléculas de adesão, bem como apoptose através da supressão da infiltração de neutrófilos e acúmulo de leucócitos mononucleares (Jones, 2005). O papel da IL-6 na tumorigênese ainda não é claro. Entretanto, pelo fato de ser uma citocina pró-inflamatória, acredita-se que esta possa contribuir com o sistema imune para o reconhecimento da transformação maligna, dificultando a evasão das células tumorais da resposta imune (McGreal et al., 2010).

Nossos resultados não mostraram diferenças significativas na expressão dessas citocinas em tumores desenvolvidos em animais selvagens e B1^{-/-}. Pode ser que a expressão gênica dessas citocinas de fato não esteja sendo regulada. Uma outra possibilidade é que, pelo fato de o tumor ainda não estar em um estágio avançado, não houve tempo suficiente para promover respostas de modulação, em níveis detectáveis, dessas citocinas.

Nossos experimentos de ELISA para dosagem plasmática de citocinas de animais selvagens e B1^{-/-} que desenvolveram melanoma não apresentaram níveis detectáveis de IL-6, IL-10 e TNF- α . Este resultado provavelmente se deve ao fato do tumor ainda estar encapsulado e atuar somente no microambiente ao seu redor, não interferindo na liberação de citocinas no plasma desses animais. Acreditamos que talvez se os tumores estivessem em um estágio mais avançado, encontraríamos níveis detectáveis dessas citocinas no plasma dos animais e/ou diferenças na expressão das mesmas nos tumores analisados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo nos mostrou que a ativação do receptor B1 em células de melanoma murino, B16F10, diminuiu a capacidade de migração das mesmas, resultando em um fenótipo menos agressivo. Nossas análises de vias de sinalização mostraram o envolvimento do receptor B1 de cininas no desenvolvimento de melanoma, provavelmente através da modulação de vias de proliferação celular, em especial ERK1/2 e Akt. Também vimos que o microambiente está diretamente envolvido no desenvolvimento tumoral influenciando nas respostas célula-hospedeiro, e que, animais com deficiência no receptor B1 desenvolvem melanoma com características mais agressivas, tais como maior ativação de vias de proliferação, rompimento da pele na região do tumor, vascularização anormal e maior instabilidade genética. Portanto, nossos resultados sugerem que a ativação do receptor B1 e a presença desse receptor no microambiente tumoral e no hospedeiro tenha um papel protetor durante o desenvolvimento de melanoma murino. Assim, é provável que tumores desenvolvidos em animais com deficiência no receptor B1 estão mais propensos a desencadear metástase quando comparados com tumores desenvolvidos em animais selvagens. Para confirmar essa hipótese, avaliação de metástase será conduzida na próxima etapa de estudos. Considerando o efeito protetor do receptor B1 de cininas contra a progressão de melanoma encontrado em nosso trabalho, podemos sugerir que, futuramente, agonistas desse receptor possam atuar como drogas alvos para a supressão de melanoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allavena P, Garlanda C, Grazia Borrello MG, Sica A, Mantovani A (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18:3–10;

Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, 357: 539-545;

Balkwill F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25: 409–416;

Bertram CM, Svetlana Baltic S, Misso NL, Bhoola KD, Foster PS, Thompson PJ, Fogel-Petrovic M (2007). Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca² and cell migration. *Journal of Leukocyte Biology*, 81:1445-54;

Bianchini F, Massi D, Marconi C, Franchi A, Baroni G, Santucci M, Mannini A, Mugnaia G, Calorini L (2007). Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 83:320–328;

Bockmann S, Paegelow I (2000) Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 68: 587-592;

Boissonnas RA, Guttmann S, Jaquenoud PA, Konzett H, Stuermer E. (2006). Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia*, 16:326;

Borgoño CA, Diamandis EP (2004) The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4: 876-890;

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;

Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol*. Jun;19(3):320-6. Review.

Bussolino F, Caccavari F, Valdembri D, Serini G. (2009). Angiogenesis: a balancing act between integrin activation and inhibition? *Eur Cytokine Netw*. 2009 Dec;20(4):191-6. Review;

Bykov VJN, Selivanova G, Wiman KG. (2003). Small molecules that reactivate mutant p53. *European Journal of Cancer* 39 1828–1834;

Calder PC (2001). Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, 36:1007–24;

Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM (2004) Kinin B₁ receptor: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British Journal of Pharmacology*, 143: 803-818;

Campbell DJ, Kladis A, Duncan A. (1993). Nephrectomy, converting enzyme inhibition and angiotensin peptides. *Hypertension* 22: 513-22;

Chan W, White, P. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. (1999). ISBN 13: 9780199637249. Editora: Oxford University Press;

Chang, Y.S., et al., 2000. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14608–14613;

Chang H, Schimmer AD. (2007). Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy. *Mol Cancer Ther.* Jan;6(1):24-30. Review;

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. *Biol Chem*, 389: 1225–1233;

Choi SY, Shin HC, Kim SY, Park YW. (2008). Role of TMPRSS4 during cancer progression. *Drug News Perspect.* Oct;21(8):417-23. Review;

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, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, Souza PP (2008). Participation of kallikrein-Kinin system in different pathologies. *Intern. Immunopharmacology*, 8:135-142;

Crowther M, Brown NJ, Bishop ET (2001) Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*, 70:478;

Cuadrado A, Nebreda AR. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. Aug 1;429(3):403-17;

Deng GM. (2007). Tumor necrosis factor receptor pre-ligand assembly domain is an important therapeutic target in inflammatory arthritis. *BioDrugs*. 2007;21(1):23-9. Review;

de Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Groemberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7:256-269;

di Tomaso E. (2005). Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res*. 65, 5740–5749;

Dolley-Hitze T, Jouan F, Martin B, Mottier S, Edeline J, Moranne O, Le Pogamp P, Belaud-Rotureau MA, Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Vigneau C. (2010). Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer*. Nov 23;103(11):1698-705;

Dome B, Paku S, Somlai B, Timar J. (2002). Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*. 197:355–62;

Duff M, Maddali S, Yan ZP, Stapleton P, Daly JM (2007). Analysis of Gene Expression in the Tumor-Associated Macrophage. *Journal of Surgical Research*, 142:119–128;

Duff M, Mestre JR, Smyth GP (2003). COX-2 inhibition improves macrophage function and reduces tumor growth in a murine model of melanoma. *Ann Surg Oncol*, 10:305;

Dvorak HF. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 20:4368–80;

Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*, 64:275–90;

Elliot DF, Horton EW, Lewis GP. (1960). Actions of pure bradykinin. *The journal of Physiology*, 153:473-480;

Erdős EG, Tan F, Skidgel RA.(2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension*. 2010 Feb;55(2):214-20;

Estevam FR, Augusto SF, Rodrigues SA, Pinheiro MR, Monteiro AF. (2005). Apoptosis and production of TNF-alpha by tumor-associated inflammatory cells in histological grade III breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* Jul;54(7):671-6;

Evans R (1982). Macrophages and neoplasms: New insights and their implication in tumor immunobiology. *Cancer Metastasis Rev*,1:227;

Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG. (2010). The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* May 21;396(1):85-9. Review;

Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L. (2008). Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* 4 (4), 435–441;

Feng Y, Wan H, Liu J, Zhang R, Ma Q, Han B, Xiang Y, Che J, Cao H, Fei X, Qiu W. (2010). The angiotensin-converting enzyme 2 in tumor growth and tumor-associated angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* Apr;23(4):941-8;

Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev*, 3:1–6;

Flomenberg N, Howell A, Lin Z, Caro J, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. (2010). The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle.* Nov; 9(21):4297-306;

Freshney, R. (1987) Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York;

Frisch SM, Screaton RA. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 555–562;

Fukunaga-Kalabis M, Santiago-Walker A, Herlyn M. Matricellular proteins produced by melanocytes and melanomas: in search for functions. *Cancer Microenviron.* (2008) Dec;1(1):93-102;

Funk CD (2001). Prostaglandin and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294:1871–4;

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313:1960–1964;

Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ. (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 24:2499-2512;

Greene EL, Velarde V, Jaffa AA. (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension.* Apr;35(4):942-7;

Gudermann T. (2001). Multiple pathways of ERK activation by G protein-coupled receptors. *Novartis Found Symp.* 2001;239:68-79; discussion 80-4, 150-9. Review;

Gudkov A.V., Komarova E. A. (2007). Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target. *Human Molecular Genetics.* Vol. 16, Review Issue 1;

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70;

Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4;144(5):646-74.

Hayashi N e Cunha GR. (1991). Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Research.* 51:4924-4930.

Hecker M, Mülsch A, Busse R. (1994). Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem.* Apr;62(4):1524-9;

Hecker M, Porsti I, Busse R (1994). Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE-inhibitors. *Braz J Med Biol Res*, 27:1917-21;

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;

Hersey P, Zhang XD. (2009). Treatment combinations targeting apoptosis to improve immunotherapy of melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1749–1759;

Hsu MY, Meier F, Herlyn M (2004). Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation*, 70:522–36;

Hu ZX, Geng JM, Liang DM, Luo M, Li ML. (2010). Hepatocyte growth factor protects human embryonic stem cell derived-neural progenitors from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol.* Oct 25;645(1-3):23-31;

Inoue S, Leitner W.W, Golding B, Scott D. (2006). Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Research*, 66, 7741–7747;

Italiano Jr JE, Richardson JL, Patel-Hett S. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and anti-angiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 111:1227–33;

Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357–9360;

Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. (2008). Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* Apr;21(2):123-32. Review;

Jones SA. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175: 3463–3468;

Junttila, M. R., Li, S. P. and Westermarck, J. (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22,954–965;

Kakoki M, Smithies O. (2009). The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney Int.* 2009 May;75(10):1019-30. Review;

Kaplan AP, Ghebrehiwet B. (2010). The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* Aug;47(13):2161-9. Review;

Kennedy NJ, Davis RJ. (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle.* 2:199-201;

Keshet Y, Seger R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 661:3-38;

Kroczyńska B, Kaur S, Platanias LC. (2009). Growth suppressive cytokines and the AKT/mTOR pathway. *Cytokine.* Oct-Nov;48(1-2):138-43;

Larrivée JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Huot J, Marceau F. (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol.* Feb 1;160(3):1419-26.

Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnest S, Chen W, Cobb MH. (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res.* Apr;18(4):436-42. Review;

Lee SH, Park Y, Yoon SK, Yoon JB. (2010). Osmotic Stress Inhibits Proteasome by p38 MAPK-dependent Phosphorylation. *J Biol Chem.* Dec 31;285(53):41280-9;

Lee SY, Lee YG, Byeon SE, Han S, Choi SS, Kim AR, Lee J, Lee SJ, Hong S, Cho JY. (2010). Mitogen activated protein kinases are prime signalling enzymes in nitric oxide production induced by soluble β -glucan from *Sparassis crispa*. *Arch Pharm Res.* Nov;33(11):1753-60;

Leek RD, Harris AL (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7:177;

Leenders WP, Kusters B, Verrijp K, (2004). Antiangiogenic therapy of cerebral melanoma metastases results in sustained tumor progression via vessel co-option. *Clin Cancer Res.* 10:6222–30;

Lewis CE, Pollard JW (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66:605–12;

Li ZW, Dalton WS. (2006). Tumor microenvironment and drug resistance in hematologic malignancies. *Blood Rev.* Nov;20(6):333-42. Review;

Liotta LA & Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature*, 411: 375-379;

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.* Dec;25(4):402-8;

Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, Ramshaw HS, Stomski F, Perugini M, D'Andrea R, Grimbaldeston M, Parker MW. (2010). Molecular basis of cytokine receptor activation. *IUBMB Life.* Jul;62(7):509-18. Review;

Lu P, Werb Z. (2008). Patterning mechanisms of branched organs. *Science* 322, 1506–1509;

Lu C., El-Deiry W. S. (2009). Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity Apoptosis 14:597–606;

Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. (2007). Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem*. 14(12):1279-89. Review;

Manning BD, Cantley LC. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274;

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23:549–555;

Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. (2009). Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs*. Sep;18(9):1333-49. Review;

Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Chiavarina B, Bonuccelli G, Casey T, Tsigos A, Migneco G, Witkiewicz A, Balliet R, Mercier I, Wang C,

Matheny RW Jr, Adamo ML. (2009). Current perspectives on Akt Akt-ivation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)*.234(11):1264-70. Review;

Mathias RA, Chen YS, Wang B, Ji H, Kapp EA, Moritz RL, Zhu HJ, Simpson RJ. (2010). Extracellular remodelling during oncogenic Ras-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates MDCK cell migration. *J Proteome Res*. Feb 5;9(2):1007-19;

Matsubayashi Y, Ebisuya M, Honjoh S, Nishida E. ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr Biol* 2004;14:731–735;

McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG. Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274:4347-4353;

McGreal EP, Davies PL, Powell W, Rose-John S, Spiller OB, Doull I, Jones SA, Kotecha S. (2010). Inactivation of IL-6 and soluble IL-6 receptor by neutrophil derived serine proteases in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. Jul-Aug;1802(7-8):649-58;

Meier F, Schitteck B, Busch S. (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; 10:2986–3001;

Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms D, Garbe C, Maczey E, Herlyn M, Schitteck B (2007). Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *British Journal of Dermatology*, 156:1204–1213;

Meng J, Dai B, Fang B, Bekele BN, Bornmann WG, Sun D, Peng Z, Herbst RS, Papadimitrakopoulou V, Minna JD, Peyton M, Roth JA. (2010). Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PLoS One*. Nov 29;5(11):14124;

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 R1 bradikinin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:21583-21586;

Milas L, Wike J, Hunter N (1987). Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: Associations with tumor growth parameters and tumor radiocurability. *Cancer Res*, 47:1069;

Mosser DM, Zhang X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. Dec;226:205-18. Review;

Murphy T, Hori S, Sewell J, Gnanapragasam VJ. (2010). Expression and functional role of negative signalling regulators in tumour development and progression. *Int J Cancer*. Dec 1;127(11):2491-9. Review;

Naama HA, McCarter MD, Mack VE (2001). Suppression of macrophage nitric oxide production by melanoma: Mediation by a melanoma-derived product. *Melanoma Res*, 11:229;

Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. (2005). Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*. 437:281-285;

Nguyen G, Contrepas A. (2008). Physiology and pharmacology of the (pro) renin receptor. *Curr Opin Pharmacol*. Apr;8(2):127-32. Review;

Petreaca ML, Yao M, Ware C, Martins-Green MM (2008). Vascular endothelial growth factor promotes macrophage apoptosis through stimulation of tumor necrosis factor superfamily member 14 (TNFSF14/LIGHT). *Wound Repair Regen*. 16(5):602-14;

O'Garra A, Barrat F.J, Castro A.G, Vicari A, Hawrylowicz C. (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Rev*. Vol. 223: 114–131;

Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. (2007). Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett*. Apr 28;249(1):61-79. Epub 2007 Jan 31. Review.

Pennington K, Pulaski H, Pennington M, Liu JR. (2010). Too much of a good thing: suicide prevention promotes chemoresistance in ovarian carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*. Nov 1;10(6):575-83;

Pesquero JB, Araújo RC, Heppenstall PA, Stuck CL, Silva Jr JA, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JJ, 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;

Paliouras M, Borgono C, Diamandis EP. (2007). Human tissue kallikreins: the cancer biomarker family. *Cancer Lett*. 2007 Apr 28;249(1):61-79. Epub 2007 Jan 31. Review;

Pollard JW (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 84;

Pollard JW (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4:71–8;

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 B1 receptors. *J Cell Physiol*. 2002 Dec;193(3):275-86;

Pruneau D, Bélichard P, Sahel JA, Combal JP. (2010). Targeting the kallikrein-kinin system as a new therapeutic approach to diabetic retinopathy. *Curr Opin Investig Drugs*. May;11(5):507-14. Review;

Ravindran J, Gupta N, Agrawal M, Bala Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV. (2010). Modulation of ROS/MAPK signaling pathways by okadaic acid leads to cell death via, mitochondrial mediated caspase-dependent mechanism. *Apoptosis*. Nov 17;

Regoli D, Barabé J (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, 32:01-46;

Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE. (1993). Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol*. Aug;71(8):556-67. Review;

Regoli D, Gobeil F, Nguyen Q (1994). Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sci*, 55:735-49;

Reinhardt HC, Yaffe MB. (2009). Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol*. Apr;21(2):245-55. Review;

Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MA, Wang X, Linding R, Ong SE, Weaver D, Carr SA, Yaffe MB. (2010). DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization. *Mol Cell*. Oct 8;40(1):34-49;

Ricupero DA, Romero JR, Rishikof DC, Goldstein RH. (2000). Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. *J Biol Chem*. Apr 28;275(17):12475-80.

Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949 Feb;156(2):261-73;

Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T. (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia*. 2:306–14;

Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL. (2010). Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 1;80(5):674-82. Review;

Schwartzburd PM. (2003). Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev*. Mar;22(1):95-102. Review.

Shangary S., Wang S. (2009). Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.49: 223–241;

Shi Y, Massague J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700;

Shigematsu H, Yoshida K, Sanada Y, Osada S, Takahashi T, Wada Y, Konishi K, Okada M, Fukushima M. (2010). Rapamycin enhances chemotherapy-induced cytotoxicity by inhibiting the expressions of TS and ERK in gastric cancer cells. *Int J Cancer*. Jun 1;126(11):2716-25;

Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, Zhong H, Han B, Ferris RL (2006). Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev*, 25:333–356;

Sica A, Rubino L, Mancino A, Larghi P, Porta C, Rimoldi M, Solinas G, Locati M, Allavena P, Mantovani A. (2007) Targeting tumor-associated macrophages. *Expert Opin Ther Targets*, 11:1219–1229;

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42:717–27; Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies

Sigalotti L, Covre A, Fratta E, Parisi G, Colizzi F, Rizzo A, Danielli R, Nicolay HJM, Coral S, Maio M. (2010). *Journal of Translational Medicine* 8:56.

Skeggs LT Jr, Lentz KE, Kahn Jr, Shumway NP, Woods KR. (1956). The amino acid sequence of hypertensin. II. *J Exp Med*. Aug 1;104(2):193-7;

Stewart JM (1994). The present and the future of bradykinin antagonists. *Braz J Med Biol Res*, 27:1699-1706;

Stockmann 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*, 456:814-19;

Stout RD, Jiang C, Matta B (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*, 175:342–9;

Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, Zhou YM, Hato F, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S. (2001). Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. *J. Immunol.* 166, 1185–1192;

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. (2006). Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 42: 745–750;

Takagaki Y, Kitamura N, Nakanishi S. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem*. 1985 Jul 5;260(14):8601-9.

Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LM, Madden JF, Daaka Y. (2003). Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res*. May 1;63(9):2037-41.

Tsianos EV, Katsanos K. (2009). Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol*. Feb 7;15(5):521-5. Review;

Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. (2006). Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini Rev Med Chem*. Jul;6(7):835-44;

Vendrell J, Querol E, Avilés FX. (2000). Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta*. Mar 7;1477(1-2):284-98. Review;

Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, Pasparakis M, Nebreda AR. (2007) p38 α MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 39, 750–758;

Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275:14624–14631;

Wang PY, Liu P, Weng J, Sontag E, Anderson R G. (2003). A cholesterol-regulated PP2A/HePTP complex with dual specificity ERK1/2 phosphatase activity. *EMBO J.* 22,2658–2667;

Watanabe M, Naraba H, Sakyo T, Kitagawa T. (2010). DNA damage-induced modulation of GLUT3 expression is mediated through p53-independent extracellular signal-regulated kinase signaling in HeLa cells. *Mol Cancer Res.* 2010 Nov;8(11):1547-57;

Werle E, Trautschold I, Leysath G. (1961). Isolation and structure of kallidine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* Nov 24;326:174-6. German;

Whiteside TL, (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27:5904-12;

Yang HY, Erdös EG, Levin Y. (1971). Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther.* Apr;177(1):291-300;

Yang J, Weinberg RA. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 14, 818–829;

Yang L. (2010). TGF β and cancer metastasis: an inflammation link. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Jun;29(2):263-71. Review;

Yang L, Pang Y, Moses HL. (2010). TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* Jun;31(6):220-7. Review;

Yayama K, Okamoto H. (2008). Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: Role of bradykinin and nitric oxide. *International Immunopharmacology.* 8, 312–318;

- Yigit R, Massuger L.F.A.G, Carl G, Figdor C.G, Torensma R. (2010). Ovarian cancer creates a suppressive microenvironment to escape immune elimination. *Gynecologic Oncology* 117;366–372;
- Young MRY (1994). Eicosanoids and the immunology of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 13:337–48;
- Yong HY, Koh MS, Moon A. (2009). The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. Dec;18(12):1893-905. Review;
- Yeagle PL, Albert AD. (2003). A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry*. Feb 18;42(6):1365-8;
- Tait SW, Green DR. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Sep;11(9):621-32;
- Zaret KS, Grompe M. (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322, 1490–1494;
- Zeng L, O'Connor C, Zhang J, Kaplan AM, Cohen DA. (2010). IL-10 promotes resistance to apoptosis and metastatic potential in lung tumor cell lines. *Cytokine*. 2010 Mar;49(3):294-302;
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN (2003). Intratumoral T cells recurrence and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 348:203–213;
- Zhang X, Tan F, Zhang Y, Skidgel RA. (2008). Carboxypeptidase M and kinin B1 receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. *J Biol Chem*. Mar 21;283(12):7994-8004;
- Zhang L, Chen W, Li X. (2008). A novel anticancer effect of butein: inhibition of invasion through the ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways in bladder cancer cells. *FEBS Lett*. Jun 11;582(13):1821-8;
- Zhang W, Wu K, He W, Gao Y, Huang W, Lin X, Cai L, Fang Z, Zhou Q, Luo Z, Chen ZK, Zhou H. (2010). Transforming growth factor beta 1 plays an important role in inducing CD4(+)CD25(+)forhead box P3(+) regulatory T cells by mast cells. *Clin Exp Immunol*. 2010 Sep;161(3):490-6;

Zhao TT, Trinh D, Addison CL, Dimitroulakos J. (2010). Lovastatin inhibits VEGFR and AKT activation: synergistic cytotoxicity in combination with VEGFR inhibitors. PLoS One. Sep 3;5(9):12563;

Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, Polgar P. (2000). Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. J Cell Biochem. Jun 6;78(3):351-62.

Zwaans BM, Bielenberg DR. (2007). Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. Microvasc Res. 74:145–58.