



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Andreza Maia Vieira

**Efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-Lipoxina A<sub>4</sub>, em células endoteliais moduladas pela interação com células de melanoma humano**

Rio de Janeiro

2014

Andreza Maia Vieira

**Efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-Lipoxina A<sub>4</sub>, em células endoteliais moduladas pela interação com células de melanoma humano**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra Verônica Maria Morandi da Silva

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Iolanda Margherita Fierro

Prof. Dr. Edward Helal Neto

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V657 Vieira, Andreza Maia.

Efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-Lipoxina A4, em células endoteliais moduladas pela interação com células de melanoma humano / Andreza Maia Vieira. – 2014.

142 f.

Orientadora: Verônica Maria Morandi da Silva.

Coorientadores: Iolanda Margherita Fierro. Edward Helal Neto.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Melanoma – Teses. 2. Matriz extracelular – Teses. 3. Células endoteliais – Teses. 4. Endotélio Vascular - Crescimento & desenvolvimento. I. Silva, Verônica Maria Morandi da. II. Fierro, Iolanda Margherita. III. Helal Neto, Edward. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. V. Título.

CDU 615.739.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Andreza Maia Vieira

**Efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-Lipoxina A4, em células endoteliais moduladas pela interação com células de melanoma humano**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de março de 2014.

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Iolanda Margherita Fierro

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Edward Helal Neto

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Maria Morandi da Silva (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela de Castro Resende  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz  
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

---

Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Junior  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de todas as coisas!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Verônica Morandi por me orientar e dar a oportunidade de trabalhar e desenvolver este projeto em seu laboratório, além de toda a paciência e atenção.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iolanda Fierro, que me orienta desde a iniciação científica, seus conselhos e críticas ajudaram a construir a profissional que sou hoje, você é meu exemplo. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Edward Helal Neto, que me acompanhou durante todo o desenvolvimento deste projeto e sempre acreditou no meu potencial. Tenho um imenso carinho por sua pessoa!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thereza Christina Barja-Fidalgo, por aceitar ser a revisora da tese e por permitir que parte deste trabalho fosse realizado em seu laboratório.

À equipe da Anatomia Patológica do Hospital Maternidade Carmela Dutra, pela cessão dos cordões umbilicais.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro.

Aos amigos do laboratório LFCM, Rafael, Pedro, João, Mariana, Carol, Simone, Cristiane, Rafael Amendola, Gabriele, Genilson, Renata, Fernanda, Natália, Antônio, Roberta, Vany, Mariele, Hayandra, Thais, Marta e Paula pela contribuição acadêmica em nossas reuniões, pelos momentos de descontração, enfim, obrigada!

Aos amigos do laboratório LabAngio, Aline, Viviane, Laila, Chico, Fernanda, Marcella, Marcela Marques e Antônio, podem ter certeza que esses quatro anos foram muito melhores com vocês por perto!

Ao Marcos Temperini, por toda sua seriedade e profissionalismo com a cultura de HUVEC, obrigada pelos vários garrafões "de última hora". E à tia Mariléia pelo apoio logístico.

A Renatinha e ao Rafael Amendola, pessoas mais que queridas por mim, sempre "quebrando" meus galhos, ouvindo minhas reclamações. Obrigada!

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais, em especial Cristiane Aguiar, Grazielle, Lenize, Vivi, Isabelle e Ana; adorei ter vocês como vizinhas!

Aos meus amigos Amanda, Paola, Cris, Bruno, Rafael e Junior, vocês estiveram presentes em todos os momentos importantes da minha vida, que esses laços nunca se dissolvam. Muito obrigada!

Ao Marcelo e a Márcia, que sempre me recebem com carinho quando eu preciso de um refúgio, além de colocarem o Pedro na minha vida, esse pequeno de dois anos que roubou meu coração, adoro ouvir seu tia Dezaaaaa!!

Ao Luiz Junior, por ser meu companheiro, nossa relação é um bem muito precioso para mim. Você me completa! E também aos seus pais Ângela e Luiz, que me acolhem sempre que preciso. Muito, muito obrigada!

E finalmente, minha família, meus pais Eva e José, irmãos Simone, Aderson, Gabriel e Anne, minha sobrinha Gabi e o pequeno Papu. Vocês são a minha base, me conhecem como ninguém, não imagino a minha vida sem vocês.

AMO vocês!

Se você eliminar todas as respostas possíveis, então o impossível é a resposta.

*Sherlock Holmes*

## RESUMO

VIEIRA, Andreza Maia. **Efeito do ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-Lipoxina A4, em células endoteliais moduladas pela interação com células de melanoma humano.** 2014. 142f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Tumores surgem a partir de um distúrbio patológico caracterizado pela proliferação celular excessiva, e se sustentam pela criação de um microambiente favorável. O melanoma é um tumor altamente metastático originado a partir de melanócitos. A angiogênese é necessária para o crescimento de tumores e metástases. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o principal agente pró-angiogênico e permeabilizante. O microambiente tumoral apresenta características de uma inflamação crônica com a presença de uma matriz extracelular (MEC) ativada. As lipoxinas (LX) e 15-epi-LX são lipídeos com potentes efeitos anti-inflamatórios e antiangiogênicos em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. Contudo, seus efeitos nas células endoteliais (CE) em um microambiente tumoral são desconhecidos. No presente estudo foi investigada a modulação de CE pelo ATL-1, um análogo sintético de 15-epi-LX, em um modelo que mimetiza o microambiente tumoral. Inicialmente, foi caracterizado o efeito inibitório do ATL-1 sobre a permeabilidade endotelial induzida pelo VEGF. Este efeito ocorre por meio de mecanismos relacionados à estabilização de VE-caderina e redução da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina. Além disso, em ensaios de co-cultura, o pré-tratamento da CE primária (HUVEC) com ATL-1 reduziu a migração transendotelial de células de melanoma altamente metastáticas (MV3), mas não a migração de melanócitos normais (NGM). A secreção de VEGF em HUVEC, NGM e MV3 foi determinada por ELISA. A MV3 secreta grandes quantidades de VEGF de maneira tempo-dependente e o ATL-1 não alterou esta ação. A correlação entre a eficiência da MV3 em atravessar a monocamada endotelial e o acúmulo de VEGF foi feita em ensaio onde a monocamada endotelial foi estimulada com uma concentração de VEGF exógeno, em níveis comparáveis aos secretados pelas células MV3. Neste ensaio, observamos o aumento na migração de ambas as linhagens, MV3 e NGM. O ATL-1 inibiu a passagem de ambas as células. A influência do estroma alterado sobre o endotélio também foi avaliada utilizando a MEC extraída de melanoma. A matriz tumoral suporta o crescimento endotelial tornando a monocamada mais permeável, com níveis de expressão genética aumentada do principal receptor do VEGF, o VEGFR-2, bem como da citocina pró-angiogênica IL-8 e seu receptor, o CXCR-2. Além disso, a MEC tumoral induziu no endotélio um perfil inflamado, caracterizado pela produção de óxido nítrico e pela expressão gênica e proteica da molécula de adesão VCAM-1, que foi acompanhada pela maior adesão de mononucleares ativadas. Estas ações foram inibidas pelo tratamento das CE com o ATL-1, assim como a maior capacidade tubulogênica apresentada pelo endotélio em contato com a matriz. Estes resultados sugerem uma intrínseca relação entre o endotélio e a MEC tumoral e sua importância na progressão e metástase do melanoma. Além disso, neste cenário, o ATL-1 surge como uma poderosa ferramenta anti-inflamatória e antimetastática.

Palavras-chave: Célula Endotelial. Melanoma. Matriz Extracelular. VEGF. ATL-1.

## ABSTRACT

VIEIRA, Andreza Maia. **Effect of ATL-1, a synthetic analogue of 15-epi-Lipoxin A<sub>4</sub>, in endothelial cells modulated by interaction with human melanoma cells**. 2014. 142f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Tumors arise from a pathological disorder characterized by excessive cell proliferation and are supported by the establishment of a favorable microenvironment. Melanoma has a metastatic profile and originates from melanocytes. Angiogenesis is necessary for tumor growth and metastasis. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main pro-angiogenic and permeable factor. Tumor microenvironment presents a chronic inflammation profile and an activated extracellular matrix (ECM). Lipoxins (LX) and 15-epi-LX are lipids with potent anti-inflammatory and antiangiogenic effects in different models *in vivo* and *in vitro*. However, their effects on endothelial cell (EC) in the tumor microenvironment are unknown. In the present study we investigated the effect of ATL-1, a synthetic analog of 15-epi-LX, on EC, in a model that mimics the tumor microenvironment. Initially, the inhibitory effect of ATL-1 on VEGF-induced endothelial permeability was characterized. This action was related to the stabilization of VE-cadherin and reduction of  $\beta$ -catenin nuclear translocation. Additionally, in co-culture assays, the pretreatment of EC (HUVEC) with ATL-1 reduced the transendothelial migration of highly metastatic melanoma cells (MV3), but not normal melanocytes (NGM). The secretion of VEGF by HUVEC, MV3 and NGM was determined by ELISA. The MV3 cells secreted large amounts of VEGF in a time-dependent manner and ATL-1 did not alter this action. The correlation between the efficiency of MV3 cells to migrate through an endothelial monolayer and the accumulation of VEGF was observed in an assay where the endothelial monolayer was stimulated with exogenous VEGF, in a concentration comparable to levels secreted by MV3 cells. In this test, we observed an increase in cell migration of both cells which was inhibited by ATL-1. The influence of the reactive stroma of the endothelium was also evaluated using the ECM extracted from melanoma. Tumor matrix supports endothelial growth inducing HUVEC monolayer permeability, increasing VEGFR-2, the pro-angiogenic cytokine IL-8 and its receptor, CXCR-2, gene expression. Also, tumor-derived ECM induced a pro-inflammatory profile in HUVEC characterized by the production of nitric oxide and the adhesion molecule VCAM-1 gene and protein expression, which was followed by an increased adhesion of activated mononuclear cells. These actions were inhibited by the treatment of endothelial cells with ATL-1. The increase in the tubulogenic capacity presented by endothelium in contact with the matrix was also inhibited by ATL-1. Taken together, these data suggest an intrinsic relation between endothelium and melanoma-derived ECM and a role in melanoma progression and metastasis. Moreover, in this scenario, ATL-1 appears as a powerful anti-inflammatory and anti-metastatic tool.

Keywords: Endothelial cell. Melanoma. Matrix extracelular. VEGF. ATL-1.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização das junções célula-célula endoteliais.....	19
Figura 2 -	Estrutura e função das caderinas.....	20
Figura 3 -	Organização molecular da VE-caderina.....	22
Figura 4 -	Sítios de fosforilação da VE-caderina em tirosina e serina.....	23
Figura 5 -	Esquema representativo dos eventos da angiogênese.....	26
Figura 6 -	Interação dos membros da família VEGF com seus respectivos receptores.....	30
Figura 7 -	Sítios de fosforilação em tirosina e de transdução de sinais do VEGFR-2..	32
Figura 8 -	Representação esquemática das duas primeiras camadas da derme.....	36
Figura 9 -	Microambiente tumoral.....	38
Figura 10 -	Etapas da disseminação metastática.....	40
Figura 11 -	Biossíntese das lipoxinas e 15-epi-lipoxinas ( <i>aspirin-triggered-lipoxins-ATL</i> ).....	43
Figura 12 -	Interação das LX e ATL com seus receptores.....	45
Figura 13 -	A matriz produzida por células de melanoma altera a permeabilidade endotelial.....	87
Figura 14 -	Aumento da expressão de VEGFR-2 induzido pela matriz tumoral.....	88
Figura 15 -	Secreção de IL-8 por HUVEC e MV3.....	89
Figura 16 -	O contato com a matriz tumoral induz a expressão de IL-8 e CXCR-2 em células endoteliais.....	90
Figura 17 -	ATL-1 inibe a produção de óxido nítrico em HUVECs estimuladas pela matriz tumoral.....	92
Figura 18 -	A interação com a matriz do melanoma induz a expressão de VCAM-1...	94
Figura 19 -	ATL-1 inibe a expressão de VCAM-1 em HUVECs em contato com a matriz tumoral.....	95
Figura 20 -	Adesão de células mononucleares à monocamada endotelial.....	96
Figura 21 -	O tratamento da monocamada endotelial com ATL-1 inibiu a tubulogênese <i>in vitro</i> induzida pela interação com a matriz tumoral.....	98

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Membros da superfamília de caderinas.....	21
Tabela 2 –	Fatores indutores da permeabilidade (PIF) e os seus mecanismos de ação propostos.....	24
Tabela 3 –	Alvos terapêuticos no microambiente.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ALX	Receptor da lipoxina A <sub>4</sub>
AKT	Quinase serina/treonina
ATL	<i>Aspirin triggered lipoxins</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Células endoteliais
ConA	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenase
CXCR-2	Receptor 2 para IL-8
EC	<i>Extracellular cadherin repeats</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAK	Quinase de adesão focal
SFB	Soro fetal bovino
FGF	Fator de crescimento para fibroblasto
FN	Fibronectina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSK-3 $\beta$	Glicogênio sintase quinase-3 beta
HIF	Fator induzido por hipóxia
HUVEC	Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL	Interleucina
INF	Interferon
JA	Junção aderente
JO	Junção oclusiva
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarideo

LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
M199	Meio 199 para cultivo de células endoteliais
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NRP	Neuropilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador de plaqueta
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adesão célula endotelial/plaqueta-1
PG	Prostaglandina
PI3-K	Fosfatidil inositol-3 quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
PL	Fosfolipase
PMN	Polimorfonuclear
PTK	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
rpm	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SHP	Fosfatase com domínios homólogos à Src
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TSP	Trombospondina
Tyr	Tirosina
VCAM-1	Molécula de adesão ao endotélio vascular

VE-caderina	Caderina do endotélio vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor para fator de crescimento do endotélio vascular
VPF	Fator de permeabilidade vascular

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Endotélio</b> .....	16
1.2	<b>Junções intercelulares</b> .....	17
1.2.1	<u>VE-caderina</u> .....	21
1.3	<b>Angiogênese</b> .....	25
1.3.1	<u>Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)</u> .....	27
1.3.1.1	Receptores para VEGF.....	29
1.3.1.2	Sinalização pelo VEGFR-2.....	31
1.4	<b>Matriz extracelular</b> .....	32
1.5	<b>Câncer</b> .....	34
1.5.1	<u>Melanoma</u> .....	35
1.5.2	<u>Microambiente tumoral</u> .....	37
1.6	<b>Lipoxinas</b> .....	42
1.6.1	<u>Biossíntese e Receptores de Lipoxinas</u> .....	42
1.6.2	<u>Ações biológicas</u> .....	45
2	<b>OBJETIVO</b> .....	48
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	48
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	48
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
3.1	<b>Reagentes</b> .....	49
3.2	<b>Cultura de células</b> .....	50
3.3	<b>Obtenção de matrizes extracelulares nativas</b> .....	51
3.4	<b>Ensaio de permeabilidade</b> .....	52
3.5	<b>Ensaio de tubulogênese <i>in vitro</i></b> .....	52
3.6	<b>Detecção da citocina IL-8 em meios condicionados</b> .....	53
3.7	<b>Imunocitoquímica</b> .....	54
3.8	<b>Análise da expressão molecular (qRT-PCR)</b> .....	55

3.9	<b>Obtenção de células mononucleares.....</b>	55
3.10	<b>Adesão de mononucleares à monocamada endotelial.....</b>	56
3.11	<b>Análise da produção de óxido nítrico.....</b>	56
3.12	<b>Análise estatística.....</b>	57
4	<b>RESULTADOS.....</b>	58
4.1	<b>Artigo: ATL-1, a synthetic analog of lipoxin modulates endothelial permeability and interaction with tumor cells through a VEGF-dependent mechanism.....</b>	58
4.2	<b>A matriz produzida por células de melanoma altera a permeabilidade endotelial.....</b>	86
4.3	<b>A matriz tumoral induz a expressão de fatores permeabilizantes em HUVECs.....</b>	87
4.4	<b>ATL-1 inibe a produção de óxido nítrico em HUVECs estimuladas pela matriz tumoral.....</b>	91
4.5	<b>A expressão de moléculas de adesão induzida pela matriz tumoral é inibida pelo ATL-1.....</b>	93
4.6	<b>O tratamento da monocamada endotelial com ATL-1 inibiu a tubulogênese <i>in vitro</i> induzida pela interação com a matriz tumoral.....</b>	97
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	99
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	111
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	112
	<b>APÊNDICE - ATL-1 não inibe a fosforilação de GSK-3<math>\beta</math> induzida pelo VEGF.....</b>	141
	<b>ANEXO - Caracterização das proteínas da MEC derivadas de MV3 e NGM.....</b>	142

## INTRODUÇÃO

Os tumores representam um distúrbio patológico do crescimento, caracterizado por uma proliferação excessiva e incessante de células. Há uma enorme variedade de tumores, que se originam, basicamente, de todos os tipos de células humanas. O crescimento tumoral é um processo complexo regulado por interações entre as células tumorais e componentes da matriz extracelular (MEC) além de células do sistema imune, fibroblastos e células endoteliais (L Addison, 2006).

O microambiente tumoral é determinante para o seu desenvolvimento. Enquanto o estroma normal pode retardar a tumorigênese, alterações em seus componentes promovem crescimento tumoral (Bissell e Radisky, 2001). Da mesma forma, a composição da MEC na massa tumoral é diferente da do tecido normal e favorece a proliferação e migração celular estimulando, conseqüentemente, a progressão tumoral. Os efeitos da MEC, produzida por células tumorais, sobre a ativação e modulação de células endoteliais constituiria, assim, um alvo terapêutico importante no tratamento de diversos tipos de tumores.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Endotélio

Os vasos sanguíneos formam uma rede de tubos que transportam sangue do coração em direção a outros tecidos e de volta para o coração. Estruturalmente, os vasos são divididos em três camadas: (1) a túnica externa é composta, basicamente, de tecido conjuntivo e de pequenos filetes nervosos e vasculares; (2) a túnica média é composta por fibras musculares lisas e pouco tecido conjuntivo elástico; (3) a túnica íntima forra internamente e sem interrupções as artérias e capilares, e é constituída por células endoteliais (CE) unidas lateralmente por firmes junções célula-célula (Dejana e col., 2008).

Mesmo tendo sua origem mesodérmica, funcionalmente o endotélio é classificado como um epitélio simples pavimentoso (Junqueira e Carneiro, 2008). O endotélio atua como uma interface entre o sangue e os tecidos subjacentes, fornecendo uma superfície não trombogênica para os componentes sanguíneos, além de distribuir nutrientes e oxigênio por todo corpo (Mehta e Malik, 2006). Adicionalmente, as CE funcionam como uma barreira seletiva, controlando a passagem de proteínas plasmáticas e células circulantes do sangue para o interstício (Dejana e col., 2008).

As CE se originam de sucessivas diferenciações das células do mesoderma, que levam à formação das primeiras estruturas vasculares, as ilhas de sangue primitivas. As células do centro das ilhas darão origem às células hematopoiéticas, enquanto as da periferia diferenciam-se em angioblastos, os precursores das CE maduras. Este processo é denominado vasculogênese (Risau e Flame, 1995). Marcadores específicos como fator de Von Willebrand (fator VII), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a molécula de adesão célula endotelial/plaqueta (PECAM-1 ou CD31) são encontrados no endotélio.

As CE encontram-se aderidas sobre uma lâmina basal composta por diferentes moléculas de colágeno, fibrina, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas (Junqueira e Carneiro, 2008). Após a formação completa dos vasos, em condições normais, as CE maduras apresentam um perfil quiescente, com baixa capacidade proliferativa e uma prolongada longevidade. Contudo, sob condições rigorosamente controladas, como durante o ciclo ovariano ou na cicatrização de feridas, as CE podem formar novos vasos a partir da uma rede

vascular já existente, processo denominado angiogênese (Folkman e Shing, 1992; Rissau, 1997; Conway e col., 2001; Otrrock e col., 2007).

Proteínas sanguíneas, bem como leucócitos, podem passar através da barreira endotelial por duas maneiras: diretamente através do corpo da CE (rota transcelular) ou ainda entre as CE, o que requer a abertura dos contatos célula-célula (rota paracelular) (Vestweber e col., 2010). Ambas as vias podem ocorrer sinergicamente durante a regulação da homeostase vascular (Vestweber e col., 2010).

A passagem através da rota transcelular requer fenestrações celulares ou um sistema de transporte de vesículas complexo, enquanto, a passagem paracelular é processo rápido e regulado por abertura e fechamento de junções célula-célula (Harris e Nelson, 2010).

Diferentes mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, tais como trombina, histamina, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , bradicinina, fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), além de lipopolissacarídeos (LPS) podem aumentar a permeabilidade vascular (Vestweber e col., 2009). Contudo, a permeabilidade deve ser finamente controlada, a fim de manter a integridade endotelial.

A desestabilização do endotélio vascular está frequentemente associada a condições patológicas, e a perda da homeostase tecidual leva a estados trombóticos e a graves disfunções dos órgãos (Dejana e col., 2008).

## 1.2 Junções intercelulares

As junções intercelulares são estruturas determinantes para a manutenção da permeabilidade endotelial, sendo vitais para a formação e integridade dos vasos (Dejana e col., 1995). Estas estruturas são formadas por proteínas adesivas transmembranares ligadas a uma rede de proteínas citoplasmáticas que, por sua vez, se conectam ao citoesqueleto (Dejana e col., 1995; Wallez e Huber, 2008).

Agentes como a histamina ou a trombina aumentam de maneira muito rápida a permeabilidade, aumento rapidamente reversível uma vez que os agentes são removidos. Por outro lado, citocinas inflamatórias necessitam de várias horas para aumentar a permeabilidade vascular, porém seus efeitos são sustentados por até 24 ou 48 horas. Essas observações

sugerem que o mecanismo de ação e as implicações funcionais do aumento da permeabilidade podem variar (Esser e col., 1998; Andriopoulou e col., 1999).

A organização e a quantidade das junções endoteliais variam ao longo do leito vascular em função das condições específicas às quais os vasos estão expostos (Bazzoni e Dejana, 2004). Por exemplo, na barreira hematoencefálica, onde se faz necessário um controle rigoroso da permeabilidade, as junções são altamente desenvolvidas e bem organizadas (Rubin e Staddon, 1999). Em contraste, nas vênulas pós-capilares, principal local onde ocorre o extravasamento de leucócitos, as junções encontram-se fracamente estruturadas (Simionescu e Simionescu, 1991).

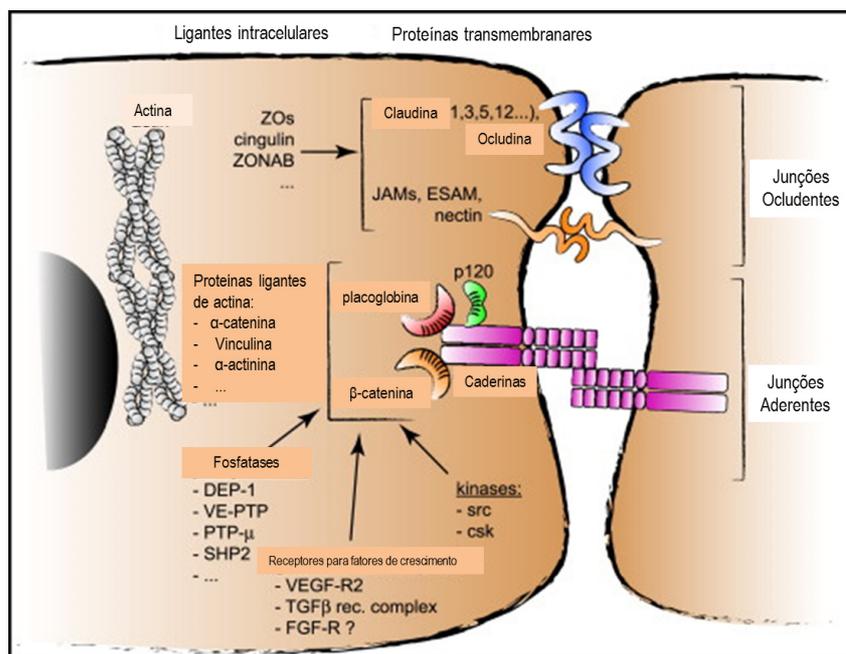
Contudo, uma característica comum das junções endoteliais é a sua organização dinâmica. As CE são capazes de alterar rapidamente a arquitetura de suas junções para permitir a passagem dos constituintes do plasma e células sanguíneas da circulação. Na maioria dos casos, este efeito é rapidamente revertido, sendo o endotélio capaz de desorganizar e reorganizar suas junções intercelulares em questão de minutos (Caveda e col., 1994, Dejana e col., 1995).

As junções célula-célula também funcionam como estruturas de sinalização que comunicam a posição celular, limitam o crescimento, a apoptose e regulam a homeostase vascular em geral (Dejana, 2004). Os complexos juncionais desencadeiam a sinalização intracelular de diferentes maneiras. Eles podem fazê-lo diretamente, através do envolvimento de proteínas de sinalização ou de receptores para fatores de crescimento, ou indiretamente, por aprisionar fatores de transcrição na membrana celular, limitando assim sua translocação nuclear (Braga, 2002; Wheelock e Johnson, 2003; Matter e Balda 2003, Yoshihara e col., 2010). Os principais tipos de complexos adesivos que medeiam às interações célula-célula no endotélio são as junções aderentes (JA) e as junções ocludentes (JO) (Dejana, 2004; Wallez e Huber, 2008, Harris e Nelson, 2010) (Fig. 1).

Essas junções são formadas por diferentes moléculas, entretanto apresentam características semelhantes. São proteínas transmembranares adesivas que promovem ligações ao longo de toda borda celular (Balda e Matter, 2000; Bazzoni e Dejana, 2004; Dejana e col., 2008).

As JO, também chamadas de junções bloqueadoras, formam um complexo juncional intercelular estreito entre as CE adjacentes (Gumbiner, 1993) e regulam o movimento de íons e solutos entre as células, impedindo a troca de proteínas presentes nas membranas apical e basolateral, contribuindo para a polaridade celular (Hartsock e Nelson, 2008).

Figura 1 – Organização das junções célula-célula endoteliais



Legenda: As junções ocludentes são mediadas principalmente por claudinas, ocludinas, membros das famílias de moléculas de adesão juncional (JAM). Os componentes citoplasmáticos de junções ocludentes são as proteínas ZO, cingulina, ZONAB, entre outros. Nas junções aderentes, a adesão é promovida pelas caderinas (VE-caderina e N-caderina) que se ligam diretamente às proteínas citoplasmáticas p120, β-catenina e placoglobina.

Fonte: Adaptada de Dejana e col., 2009.

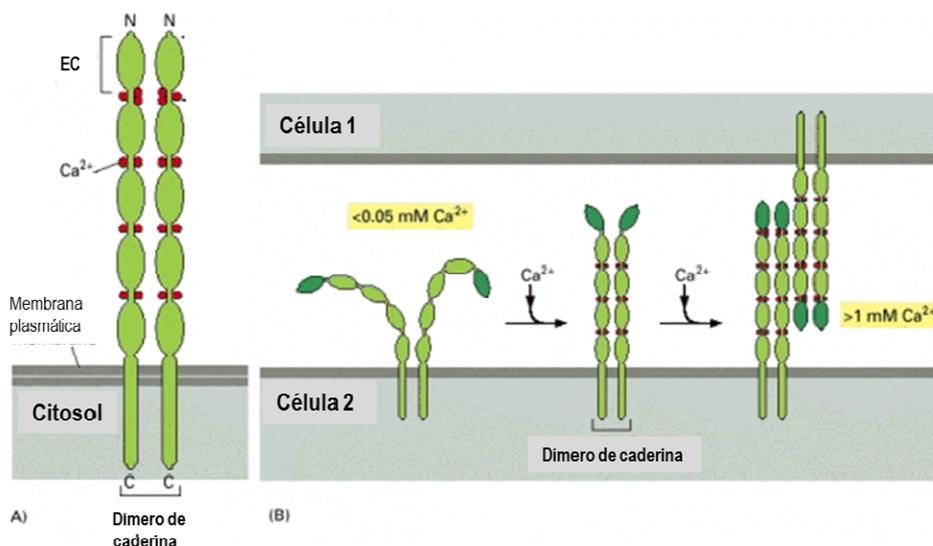
Nas JO, a adesão é mediada por membros da família das claudinas (1, 5- específica para o endotélio e 12), ocludinas e moléculas de adesão juncional (JAM - do inglês *junctional adhesion molecule*). Estas proteínas integrais se ligam a proteínas citoplasmáticas, como as zônulas ocludentes (ZO)-1, ZO-2 e ZO-3, e estes complexos medeiam a ligação ao citoesqueleto de actina (Dejana e col., 2009).

As JA são zonas de contato formadas por glicoproteínas da superfamília das caderinas. As caderinas são proteínas transmembranares de cadeia simples que possuem uma região citoplasmática altamente conservada e um domínio extracelular que apresenta um ou mais domínios repetidos de caderina (EC – do inglês *extracellular cadherin repeats*). Entre os EC existem sítios de ligação para íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que, uma vez ligados, promovem a transformação da estrutura em uma haste rígida, permitindo seu ancoramento à célula vizinha (Patel e col., 2003; Gonzalez-Mariscal e col., 2008) (Fig. 2).

As caderinas promovem um reconhecimento homofílico e  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente, sendo expressas em todos os tecidos sólidos do organismo (Komarova e Malik, 2010). A

superfamília das caderinas pode ser subdividida em caderinas clássicas e caderinas não clássicas (Ivanov e col., 2001) (Tabela 1).

Figura 2 - Estrutura e função das caderinas



Legenda: (A) Uma molécula de caderina clássica. A proteína é um homodímero, com a parte extracelular de cada polipeptídeo dobrada em cinco EC. Existem sítios de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$  entre cada par domínio repetido. (B) A influência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.

Fonte: Adaptada de Molecular Biology of the Cell. 4th edition, 2002.

As caderinas medeiam as junções celulares através da interação entre os domínios extracelulares idênticos localizados nas membranas das células adjacentes. A estabilidade destas junções é assegurada pela ligação do domínio intracelular das caderinas com o citoesqueleto de actina (Ivanov e col., 2001). Esta adesão célula-célula é altamente específica e desempenha um papel chave no tecido, no desenvolvimento de órgãos durante a embriogênese e na manutenção da estrutura normal dos tecidos no organismo adulto (Gumbiner, 2005; Komarova e Malik, 2010). Assim sendo, mudanças na composição ou função das JA poderiam ter efeitos complexos sobre a homeostase vascular geral.

A expressão de caderina no endotélio vascular (VE-caderina) é exclusiva e específica para o endotélio (Lampugnani e col., 1992). Embora outro membro da superfamília de caderina, a caderina neuronal (N-caderina), seja encontrada nos vasos, apenas a VE-caderina é capaz de iniciar a montagem das JA (Komarova e Malik, 2010).

Tabela 1 - Membros da superfamília de caderinas

NOME	PRINCIPAL LOCALIZAÇÃO	ASSOCIAÇÃO COM JUNÇÃO	FENÓTIPO QUANDO INATIVADO EM CAMUNDONGOS
<i>Caderinas clássicas</i>			
Caderina-E	Muitos epitélios	Junções aderentes	Morte em estágio de blastocisto; embriões não fazem compactação
Caderina-N	Neurônios, coração, músculo esquelético, lente e fibroblastos	Junções aderentes e sinapses químicas	Embriões morrem por defeitos cardíacos
Caderina-P	Placenta, epiderme e epitélio da mama	Junções aderentes	Desenvolvimento anormal da glândula mamária
Caderina-VE	Células endoteliais	Junções aderentes	Desenvolvimento vascular anormal (apoptose de células endoteliais)
<i>Caderinas não-clássicas</i>			
Desmocolina	Pele	Desmossomos	Bolhas na pele
Desmogleína	Pele	Desmossomos	Doença de bolhas na pele devido à perda da adesão célula-célula dos queratinócitos
Caderina-T	Neurônios, músculo e coração	Nenhuma	Desconhecido
Caderina 23	Ouvido interno e outros epitélios	Ligação entre os estereocílios e as células pilosas sensoriais	Surdez
Fat (em <i>Drosophila</i> )	Epitélio e sistema nervoso central	Junção sinalizadora (polaridade planar celular)	Discos marginais aumentados e tumores, rompimento da polaridade planar celular
Fat 1 (em mamíferos)	Vários epitélios e sistema nervoso central	Fenda do diafragma no glomérulo renal e outras junções celulares	Perda da fenda do diafragma; mal formação do prosencéfalo e dos olhos
Protocaderinas $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$	Neurônios	Sinapses químicas e outras membranas não-sinápticas	Degeneração neuronal
Flamingo	Epitélios sensorial e outros	Junções célula-célula	Rompimento da polaridade planar celular e defeitos no tubo neural

Fonte: Biologia Molecular da Célula, 5º Ed. 2010.

### 1.2.1 VE-caderina

A VE-caderina foi identificada pela primeira vez em 1991 por Suzuki e colaboradores, que clonaram o cDNA de oito novos membros da família de caderinas, dos quais apenas um, o clone 5, era encontrado somente nas CE.

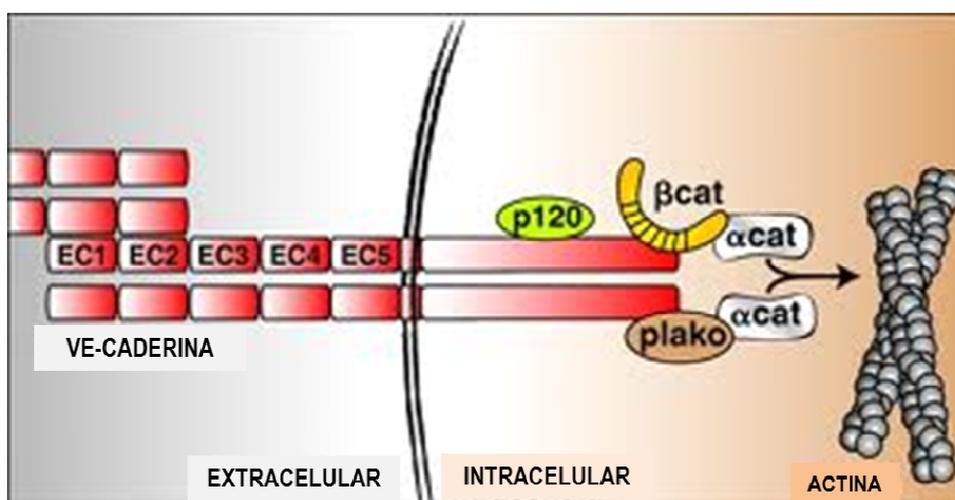
Esta molécula de adesão desempenha funções fundamentais na permeabilidade microvascular, assim como em eventos morfogênicos e proliferativos associados à angiogênese (Dejana e col., 1999, 2001). A VE-caderina está presente nas CE de todos os tipos de vasos e sua importância é evidenciada à medida que anticorpos que bloqueiam sua função adesiva levam à dissociação da camada de CE *in vitro* (Breviario e col., 1995), aumentam o extravasamento de neutrófilos (Gotsch e col., 1997) e permeabilidade vascular (Corada e col., 1999) *in vivo*.

Tal como as outras caderinas clássicas, a VE-caderina apresenta cinco domínios EC e medeia uma adesão homofílica  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente funcionando como um ponto de ligação entre

a membrana plasmática e o citoesqueleto (Angst e col., 2001). A VE-caderina se liga através de seu domínio citoplasmático a proteínas citosólicas, como as cateninas. A catenina p120 se liga na região justamembranar, recrutando a  $\beta$ -catenina e a placoglobina (também chamada  $\gamma$ -catenina). Estas podem, por sua vez, se ligar à  $\alpha$ -catenina, que ancora todo o complexo ao citoesqueleto de actina (Vestweber, 2008) (Fig. 3).

A interação das caderinas com o citoesqueleto é um requisito importante para o controle da estabilidade do contato celular. Além disso, a  $\beta$ -catenina, sob determinadas condições, e também a placoglobina, podem translocar para o núcleo e modular atividades transcricionais (Dejana e Giampietro, 2012).

Figura 3 - Organização molecular da VE-caderina

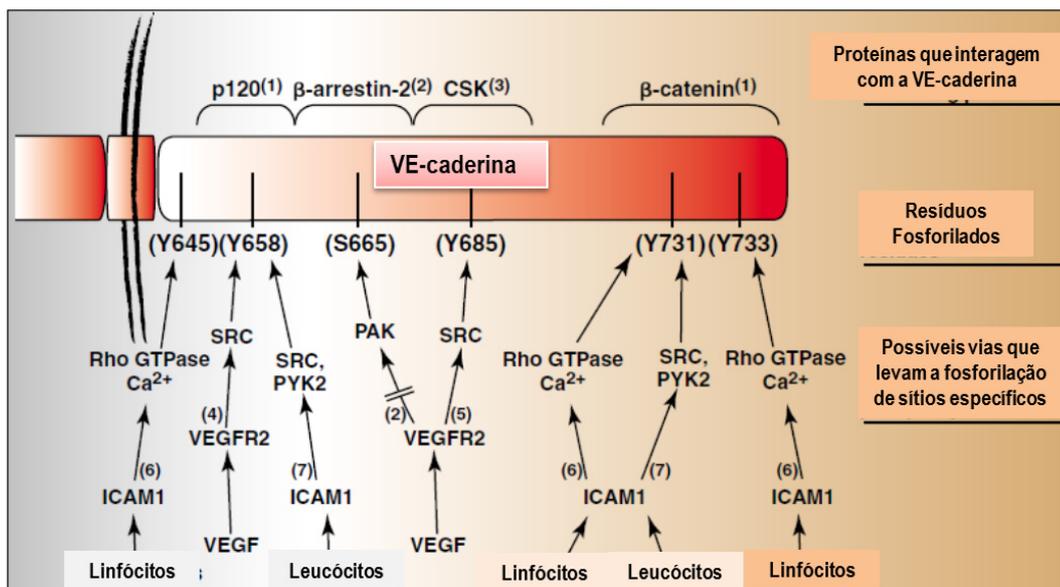


Legenda: A VE-caderina é representada como um dímero. EC1 - EC5 são os cinco domínios extracelulares homólogos de VE-caderina. O *clustering* de VE-caderina em contatos célula-célula promove a formação de complexos multimoleculares. As proteínas que são bem conhecidas por interagirem com VE-caderina são a catenina p120,  $\beta$ -catenina ( $\beta$ cat) e placoglobina (plako). A  $\beta$ -catenina e a placoglobina se associam diretamente com VE-caderina e a  $\alpha$ -catenina ( $\alpha$ cat).

Fonte: Adaptada de Dejana e col., 2008.

Vias endógenas que aumentam a permeabilidade vascular afetam a função e a organização da VE-caderina de diversas maneiras. O aumento da fosforilação, a endocitose, a S-nitrosilação ou a clivagem de proteínas gerados pela ativação de receptores para fatores de crescimento são exemplos de vias que facilitam a rompimento da barreira endotelial (Dejana e col., 2009; Harris e Nelson, 2010; Chen e col., 2012). Todavia, é largamente aceito que a fosforilação em resíduos de tirosina leva a um comprometimento da barreira endotelial (Potter e col., 2005; Vestweber, 2007; Dejana e col., 2008) (Fig. 4).

Figura 4 - Sítios de fosforilação da VE-caderina em tirosina e serina



Legenda: Sítios de fosforilação em tirosina (Y) e serina (S). A interação da VE-caderina com proteínas individuais pode ser positivamente (CSK, β-arrestina-2) ou negativamente (p120, β-catenina), regulada pela sua fosforilação em resíduos de aminoácidos específicos. Algumas vias que conduzem à fosforilação de locais específicos são mostradas na figura.

Fonte: Adaptada de Dejana e col., 2008.

Por exemplo, a histamina (Andriopoulou e col., 1999), o LPS (Gong e col., 2008) e o VEGF (Wallez e col., 2007) induzem a fosforilação em tirosina da VE-caderina, que é acompanhada por um aumento da permeabilidade vascular e diapedese de leucócitos (Esser e col., 1998). Estes indutores variam no seu modo de ação e o entendimento de suas vias de sinalização tem sido um intenso campo de investigação (Tabela 2).

Adicionalmente, proteínas tirosina quinases (PTK), como as da família Src, são necessárias para propagar estes sinais e fosforilar a cauda citoplasmática da VE-caderina (Fig. 4). Esta importância foi demonstrada em experimentos onde a permeabilidade induzida pelo VEGF, na derme e no cérebro, foi inibida em camundongos nocautes para Src (Eliceiri e col., 1999).

A fosforilação da cauda citoplasmática da VE-caderina também pode ser regulada por fosfatases, tais como a proteína tirosina fosfatase (PTP) do endotélio vascular (VE-PTP) (Nawroth e col., 2002).

A fosforilação da VE-caderina não só desfaz as interações homofílicas, mas também pode resultar na sua endocitose e remoção da superfície celular (Gavard e Gutkind, 2006). A internalização de VE-caderina é um processo que ocorre dependentemente de clatrin (Xiao e col., 2005), e, neste contexto, a fosforilação da VE-caderina em um resíduo de serina, e não

de tirosina, seria o requisito crucial para o aumento da permeabilidade (Gavard e Gutkind, 2006) (Fig. 4). Em células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC), o VEGF foi capaz de aumentar a permeabilidade da monocamada através da fosforilação em tirosina da VE-caderina,  $\beta$ -catenina e placoglobina, embora os cursos temporais de ambos os eventos sejam distintos (Esser e col., 1998).

A partir do conhecimento de como a organização da JA pode ser modulada, é possível formular estratégias farmacológicas para controlar a função endotelial e, assim, tentar prevenir o edema encontrado em diversas enfermidades.

Tabela 2 - Fatores indutores da permeabilidade (PIF) e os seus mecanismos de ação propostos

PIF	Efeitos sobre a VE-caderina	Vias de sinalização propostas
<b>VEGF</b>	Fosforilação Internalização Dissociação da catenina	Src Rac/PAK Ca <sup>2+</sup> /PKC
<b>Trombina</b>	Dissociação da catenina Fosforilação	Ca <sup>2+</sup> /PKC Rho Rac/PAK MAPK
<b>Histamina</b>	Fosforilação Dissociação da catenina Internalização	Ca <sup>2+</sup> /PKC Rho Rac/PAK
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fosforilação	Ca <sup>2+</sup> /PKC Rho Rac/PAK
<b>LPS</b>	Fosforilação	Rho Indiretas Src
<b>ROS</b>	Fosforilação Dissociação da catenina	Rac/PAK Src Ca <sup>2+</sup> /PKC

Fonte: Adaptada de Gavard, 2009.

### 1.3 Angiogênese

A angiogênese é um evento dinâmico e complexo, que requer a atividade coordenada de múltiplas vias de sinalização, como VEGF e angiopoetinas, além de fragmentos pró- e anti-angiogênicos liberados pela matriz extracelular (MEC) (Yancopoulos e col., 2000; Karamysheva, 2008).

A ativação das CE por moléculas pró-angiogênicas induz o remodelamento das junções célula-célula (VE-caderina, ZO-1, entre outras) e da MEC, simultaneamente com o desprendimento das células murais (pericitos). Assim, CE especiais denominadas células líderes (do inglês *tip cells*) podem migrar em direção ao estímulo (Welti e col., 2013) (Fig. 5).

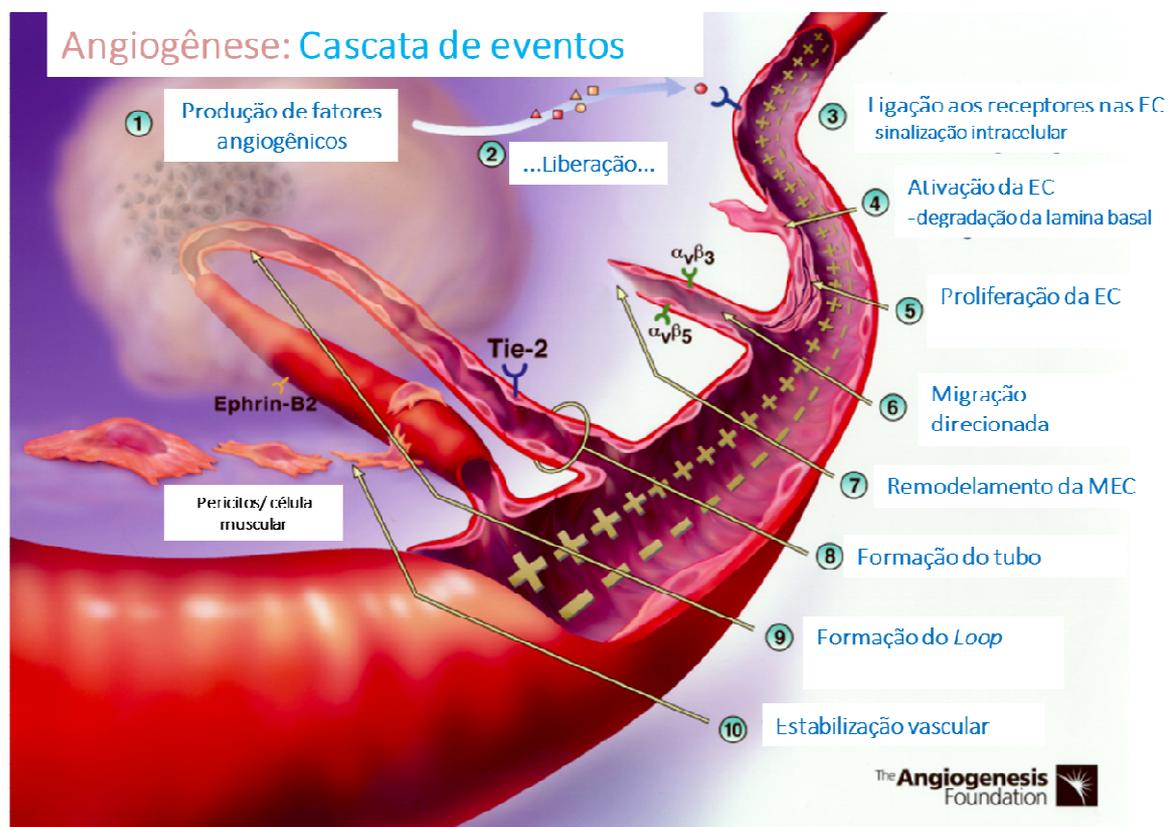
Trabalhos demonstram a participação da via de sinalização de Notch neste processo, visto que, após a ativação das *tip cells* pelo VEGF, ocorre a expressão e ativação de Notch e seu ligante Dll-4 (do inglês *Delta-like 4*) (Adams e Alitalo, 2007; Welti e col., 2013).

Uma vez as células líderes selecionadas, o vaso em formação se alonga através da proliferação de CE denominadas células do tronco vascular (do inglês *stalk cells*), que também estimuladas pelo VEGF, formam o lúmen e recrutam pericitos para estabilização vascular (Gerhardt e col., 2003, Welti e col., 2013). A formação do lúmen também contribui para a estabilidade dos neovasos, visto que o fornecimento de oxigênio promove a diminuição local de fatores angiogênicos induzidos pela hipóxia.

Em indivíduos adultos os novos vasos surgem principalmente por angiogênese, embora a vasculogênese também possa ocorrer. Neste caso, pelo recrutamento de células semelhantes aos angioblastos, as chamadas células progenitoras endoteliais (EPC) da medula óssea (Conway e col., 2001).

A angiogênese é regulada por um balanço homeostático entre fatores pró- e anti-angiogênicos (Carmeliet e Jain, 2000; Distler e col., 2003). Ela é ativada em situações fisiológicas restritas, como as que ocorrem no sistema reprodutor feminino, durante a formação do corpo lúteo e proliferação endometrial; na embriogênese pelo remodelamento da vasculatura formada durante a vasculogênese; ou mesmo em situações onde a cicatrização se faz necessária (Folkman e Shing, 1992; Otrrock e col., 2007). Entretanto, a angiogênese também ocorre durante o desenvolvimento de muitos processos patogênicos, tais como a inflamação crônica, aterosclerose, artrite reumatóide, diabetes, obesidade e durante o desenvolvimento tumoral (Folkman, 1995; Otrrock e cols., 2007).

Figura 5 - Esquema representativo dos eventos da angiogênese



Legenda: A angiogênese é um evento dinâmico de várias etapas, que envolvem a ativação do endotélio e vasodilatação, retração das células periendothelias, liberação de proteases pelas CE ativadas, degradação da MEC que circula o vaso pré-existente, migração e proliferação das CE em favor do gradiente quimiotático liberado pela fonte do estímulo angiogênico, formação de estruturas semelhantes a tubos, recrutamento de células de suporte, fusão dos vasos recém formados e início do fluxo sanguíneo.

Fonte: Adaptada de *Angiogenesis foundation*.

Diferente da vasculatura normal, a angiogênese tumoral produz vasos altamente desestruturados e sinuosos, com junções endoteliais frouxas e MEC descontínua. Estes vasos apresentam hiperpermeabilidade que leva ao aumento da pressão intersticial facilitando o intravasamento das células tumorais (Carmeliet e Jain, 2000). Sendo assim, durante o desenvolvimento tumoral, a angiogênese não é importante apenas para crescimento e suplemento sanguíneo do tumor, mas também para a metástase para focos secundários (Gomes e col., 2013).

### 1.3.1 Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)

O VEGF foi inicialmente descrito como fator de permeabilidade vascular (VPF), secretado pelas células tumorais, que estimula o aumento rápido e reversível da permeabilidade microvascular sem dano para as CE (Senger e col., 1983). Mais tarde, esta glicoproteína mostrou-se um fator de crescimento altamente seletivo e notavelmente potente para as CE (Connolly e col., 1989; Ferrara, 2000).

A ação mais proeminente do VEGF é o aumento da permeabilidade vascular. Seu efeito torna-se evidente dentro de um ou dois minutos após a injeção na derme e persiste por aproximadamente 20 minutos. A permeabilidade induzida pelo VEGF não é bloqueada por anti-inflamatórios, incluindo os que bloqueiam a histamina, a trombina e o fator de ativação de plaquetas (PAF). Adicionalmente, a hiperpermeabilidade apresentada em vasos tumorais está diretamente atribuída à produção de VEGF pelas células tumorais (Roberts e Palade, 1997; Feng e col., 1999; Cross e col., 2003).

O VEGF é um dímero proteico, secretado com ação parácrina, que ativa receptores transmembranares específicos expressos principalmente em CE, promovendo a migração, crescimento e sobrevivência celular (Ferrara, 1999). Em mamíferos, a família VEGF inclui cinco membros conhecidos: o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (Senger e col., 1983; Koch e col., 2011).

O VEGF-A é o membro da família mais estudado e melhor caracterizado, o gene que o codifica está localizado no braço curto do cromossomo 6. Através do *splicing* alternativo de seu RNA mensageiro (RNAm) há produção de pelo menos quatro isoformas diferentes: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub> contendo, respectivamente, 121, 165, 189 e 206 aminoácidos (Houck e col., 1991; Tischer, 1991; Distler e col., 2003; Koch e col., 2011).

O *splicing* alternativo pode regular a interação do VEGF com componentes da MEC, uma vez que isoformas maiores tem a capacidade de ligação ao heparan-sulfato, resultando no acúmulo na MEC, enquanto a isoforma menor, solúvel, difunde-se livremente (Koch e col., 2011). As isoformas associadas à MEC podem funcionar ainda como reservatórios e, quando necessário, serem liberadas através de clivagem na região C-terminal (Lee e col., 2005; Karamysheva, 2008).

O VEGF<sub>165</sub> é a isoforma mais frequentemente encontrada e sua expressão é aumentada em diversos tumores sólidos. É um homodímero com 45 kDa secretado, que tem, contudo, sua

maior parte imobilizada na MEC (Koch e col., 2011; Vempati e col., 2013), podendo ainda ser processado por metaloproteinases de matriz e voltar a sua forma solúvel (Lee e col., 2005).

A difusão diferenciada do VEGF devido à sua ligação a MEC afeta a distribuição temporal, espacial e a sinalização disparada por seu receptor, além de modula-la qualitativamente, por exemplo, pelo recrutamento de integrinas para o complexo de sinalização (Chen e col., 2010).

O VEGF desempenha um papel central na vasculogênese e na angiogênese, e sua expressão desregulada contribui para o crescimento de tumores sólidos (Folkman, 1975). A expressão do VEGF pode ser aumentada por diversas moléculas, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator transformador de crescimento (TGF)- $\alpha$  e  $\beta$ , o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, o fator de crescimento para fibroblasto (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), espécies reativas de oxigênio (ROS- do inglês *Reactive oxygen species*), angiotensina II e hipoglicemia, entre outros (Lamallice e col., 2007; Karamysheva, 2008).

Contudo, uma característica intrínseca ao VEGF é sua resposta à hipóxia. Fatores induzidos por hipóxia (HIF) são poderosos reguladores de sua expressão em tecidos em crescimento, seja em condições fisiológicas ou patogênicas (Shweiki e col., 1992; Carmeliet e Jain, 2000).

Adicionalmente, estudos demonstraram que condições de hipóxia aumentam a expressão do RNAm do VEGF (Olsson e col., 2006) que fornece um mecanismo para re-oxigenação tecidual por estimular a angiogênese (Bergers e Benjamin, 2003).

Através da indução da síntese de metaloproteinase de matriz (MMP)-1, o VEGF facilita o remodelamento da matriz perivascular (Peppe e col., 1991). Além disso, ativa a quinase de adesão focal (FAK) e vias de sinalização complementares que culminam com a mobilização do citoesqueleto de actina e a migração das CE (Ferrara e col., 1996; Carmeliet e col., 1996; Le Boeuf e col., 2004). A sinalização disparada pelo VEGF influencia também na sobrevivência celular pela ativação de fosfatidil inositol-3 quinase (PI3-K) além da quinase antiapoptótica Akt/proteína quinase B (PKB) que vai inibir as proteínas pró-apoptóticas Bad e caspase 9 e, com isso, a morte celular por apoptose (Ferrara e col., 2003).

O VEGF também pode induzir a expressão de quimiocinas capazes de interferir com o processo inflamatório e angiogênico (Poher e Sessa, 2007). Baker e colaboradores (2009)

mostraram que o VEGF induz um aumento na secreção das interleucinas (IL)-10, IL-8, IL-6, interferon (INF)- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

A neovascularização contribui também para promoção de doenças humanas que são caracterizadas por uma angiogênese anormal e hiperpermeabilidade vascular. Em adultos, a expressão desregulada do VEGF está envolvida em uma variedade de patologias, que vão desde a inflamação, edema e reações trombóticas, até câncer e metástases (Weis e Cheresh, 2005).

### 1.3.1.1 Receptores para VEGF

Existem três receptores específicos identificados para o VEGF, o VEGFR-1 (Flt-1 – *fms-like tyrosine kinase-1*), o VEGFR-2 (Flk1 - *fetal liver kinase-1* ou KDR - *kinase insert domain-containing receptor*) e o VEGFR-3 (Flt4), homólogos e membros da superfamília de receptores acoplados à tirosina-quinase (RTK) ativados através de homo- ou heterodimerização induzida pelo ligante (deVries e col., 1992; Millauer e col., 1993; Cross e col., 2003). Além disso, co-receptores para o VEGF, que não possuem a atividade catalítica intrínseca, indiretamente modulam a resposta ao ligante, o que contribui para o efeito biológico final (Koch e col., 2011).

O VEGF-A, VEGF-B e PlGF (Fig. 6) possuem alta afinidade pelo VEGFR-1, que é encontrado distribuído na superfície das CE, células tronco hematopoiéticas, macrófagos e monócitos (Cross e col., 2003), podendo também ser encontrado na forma solúvel, produzida por *splicing* alternativo, sVEGFR-1 (Shybuya e Claesson-Welsh, 2006).

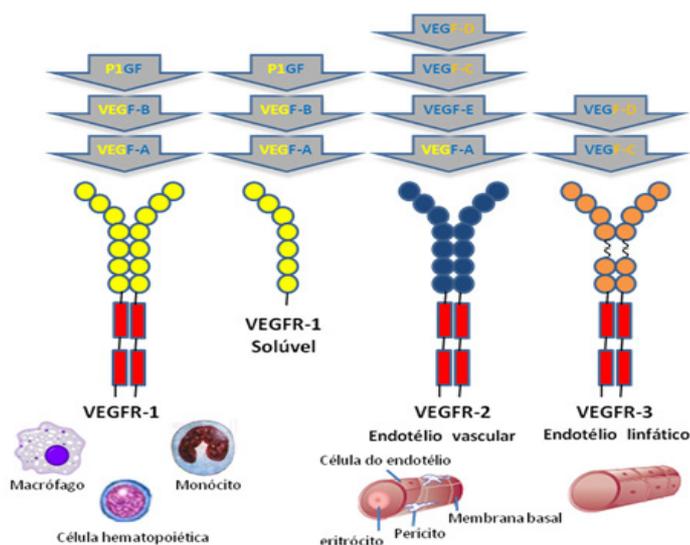
A alta afinidade do VEGF-A pelo VEGFR-1 não reflete, contudo, seus efeitos biológicos, haja vista a fraca fosforilação induzida por esta ligação (Seetharam e col., 1995). Especula-se que este receptor apresente uma função moduladora. Experimentos demonstraram que animais nocautes para VEGFR-1 morrem por volta do oitavo dia embrionário, em consequência de uma proliferação excessiva das CE e um desenvolvimento desordenado da rede vascular (Hiratsuka e col., 1998). Adicionalmente, a forma solúvel do receptor, que não possui o domínio tirosina quinase, mas mantém uma alta afinidade por seu ligante, funciona como um sequestrador das moléculas de VEGF, impedindo sua ligação ao VEGFR-2 (Karamysheva, 2008).

O VEGFR-3 é sintetizado como uma proteína precursora que sofre proteólise, gerando um peptídeo na região N-terminal que permanece ligado à proteína mãe através de ponte dissulfeto (Koch e col., 2011). Este receptor está largamente distribuído em vasos linfáticos, sendo um regulador crítico para a função linfo-endotelial. Trabalhos mostram que este receptor pode ainda formar heterodímeros com o VEGFR-2, sendo ativado pelo VEGF-C e VEGF-D (Koch e col., 2011) (Fig. 6).

Ainda, uma classe diferente de receptores com os quais o VEGF pode interagir foi encontrada na superfície de alguns tumores e CE. Esses receptores diferem dos VEGFR por não possuírem o domínio tirosina quinase (Soker e col., 1998). As neuropilinas (NRP1 e NRP2) foram inicialmente identificadas como receptores para membros da família semaforina/colapsina envolvidos na regulação de células do sistema nervoso (Klagsbrun e col., 2002).

As NRP atuam como co-receptores para formas específicas do VEGF aumentando a afinidade do ligante por seu receptor (Koch e col., 2011). A NRP1 pode modular a sinalização disparada pelo VEGFR-2 levando ao aumento da migração (Wang e col., 2003), além de influenciar a permeabilidade vascular (Becker e col., 2005). Já a NRP2 está associada com o *sprouting* de vasos linfáticos estimulados pela ligação do VEGF-C ao VEGFR-3 (Xu e col., 2010).

Figura 6 - Interação dos membros da família VEGF com seus respectivos receptores



Legenda: VEGFR-1 e os seus ligantes estão em amarelo, o VEGFR-2 e os seus ligantes estão em azul e o VEGFR-3 e os seus ligantes estão em verde. Ligantes sombreados em duas cores se ligam a mais de um tipo de receptor. O VEGFR-1 é expresso em células hematopoiéticas estaminais, macrófagos e monócitos, bem como no endotélio vascular. O VEGFR-2 é expresso nos endotélios vascular e linfático, ao passo que o VEGFR-3 é majoritariamente expresso no endotélio linfático.

Fonte: Adaptada Cross e col., 2003.

### 1.3.1.2 Sinalização pelo VEGFR-2

O VEGFR-2 é uma glicoproteína de 210-230 kDa à qual se ligam, além do VEGF-A, os VEGF-C e VEGF-D (Fig. 6). Uma forma solúvel do VEGFR-2 (sVEGFR-2) pode ser produzida por processamento transcricional alternativo, sendo encontrada em diferentes tecidos, bem como no plasma (Koch e col., 2011). O sVEGFR-2 é capaz de regular a migração de células murais, contribuindo para a maturação dos vasos (Lorquet e col., 2010) ou, ainda, se ligar ao VEGF-C impedindo sua ligação ao VEGFR-3 e reduzindo a proliferação das CE linfáticas (Albuquerque e col., 2009).

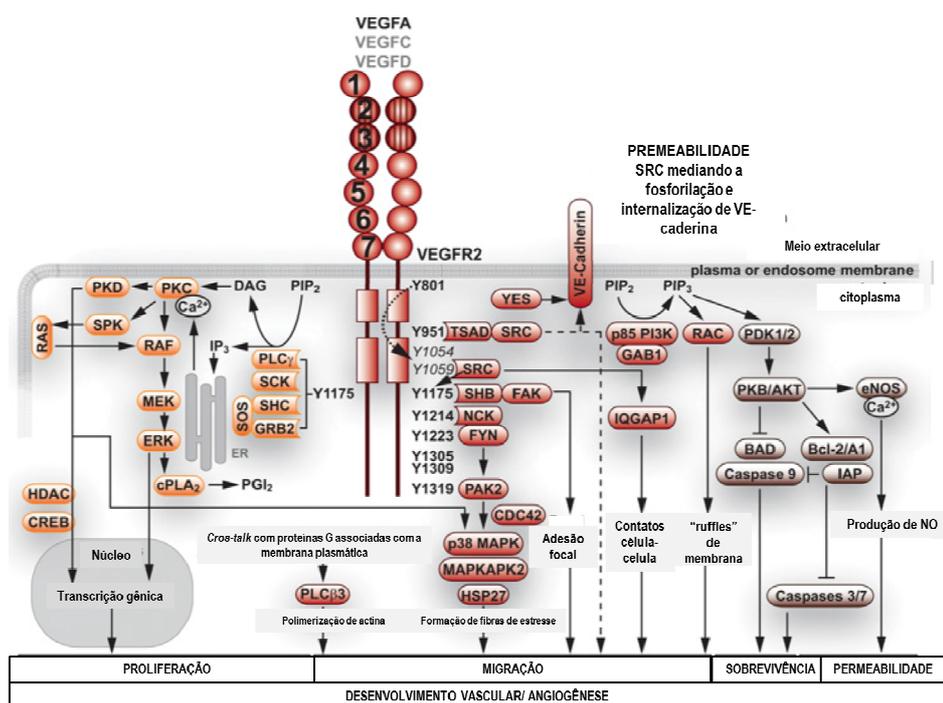
A expressão do VEGFR-2 é induzida por angiogênese em condições fisiológicas ou não, e ainda em células tumorais de melanoma e doenças hematológicas malignas (Youssofian e col., 2007). Ainda que a afinidade do VEGF pelo VEGFR-2 seja dez vezes menor que pelo VEGFR-1, suas principais ações são decorrentes da ligação a este receptor (Shinkai e col., 1998).

A sobrevivência, proliferação, migração e formação de tubo vascular induzidos pelo VEGF são resultantes da fosforilação do VEGFR-2 em diferentes resíduos. Os principais sítios de fosforilação do VEGFR-2 são em tirosina (Tyr)<sup>951</sup>, Tyr<sup>1054</sup>, Tyr<sup>1059</sup>, Tyr<sup>1175</sup> e Tyr<sup>1214</sup> (Koch e col., 2011) (Fig. 7).

Dados mostram que o enfraquecimento das JA e aumento da permeabilidade induzidos pelo VEGF se dão pela fosforilação no resíduo Tyr<sup>951</sup> do VEGFR-2, que em CE quiescentes encontra-se inativado e fosforilado durante a resposta angiogênica (Matsumoto e col., 2005). Esta fosforilação leva ao recrutamento da proteína adaptadora específica para célula T (TSA<sub>d</sub>) que ativa a c-Src (Sun e col., 2012). Uma vez ativada, a c-Src induz a fosforilação de VE-caderina em múltiplos sítios, incluindo a Tyr<sup>658</sup> (Adam e col., 2010), que resulta na dissociação da catenina p120 da VE-caderina.

Adicionalmente, a fosforilação no resíduo Tyr<sup>1059</sup> também leva à ativação de Src, que vai fosforilar outros resíduos no VEGFR-2, como a Tyr<sup>1175</sup>, assim como proteínas da cascata de sinalização à jusante, como a proteína ligadora de actina IQGAP1 (do inglês - *IQ-motif-containing GTPase-activating protein 1*). A IQGAP1 tem sido correlacionada à regulação de contatos célula-célula, proliferação e migração (Yamaoka-Tojo e col., 2006; Meyer e col., 2008).

Figura 7 - Sítios de fosforilação em tirosina e de transdução de sinais do VEGFR-2



Legenda: Após a ligação do VEGF-A aos domínios *Ig-like* 2 e 3 do VEGFR-2 moléculas sinalizadoras se ligam aos respectivos sítios de tirosinas fosforiladas no domínio intracelular e ativam cascatas de sinalização. As tirosinas (Tyr)<sup>1059</sup> e Tyr<sup>1054</sup> são cruciais para a atividade quinase do VEGFR-2. A rede complexa de vias de sinalização resulta em resposta biológicas como proliferação, migração, sobrevivência e permeabilidade, que são todas necessárias para o arranjo coordenado das CE para formar e manter os vasos.

Fonte: Adaptada de Koch e col., 2011.

#### 1.4 Matriz extracelular

A MEC corresponde a um conjunto de macromoléculas de diferentes naturezas produzidas e secretadas pelas células que modulam estruturalmente os tecidos. Entretanto, a MEC pode regular respostas das células ao seu microambiente (Marastoni e col., 2008) modulando, por exemplo, o crescimento, diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência das CE durante a angiogênese (Pilorget e col., 2007).

A MEC é composta por um conjunto de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos com diferentes propriedades físicas e bioquímicas (Ozbek e col., 2010). Estruturalmente, estes componentes formam tanto a lamina basal, presente em tecidos formadores de barreira, como os epitélios e o endotélio, fornecendo suporte mecânico às

células aderidas e referencial para o estabelecimento da polaridade tecidual, quanto a matriz intersticial, que é produzida principalmente por células do estroma (Lu e col., 2012).

A membrana basal é uma MEC especializada, mais compacta e menos porosa do que matriz intersticial. Ele tem uma composição distinta, contendo colágeno tipo IV, proteoglicano de heparan sulfato perlecan, lamininas, fibronectina e proteínas como nidogênio (ou entactina), que ligam colágenos com outros componentes protéicos. Em contraste, a matriz intersticial é rica em colágenos fibrilares, proteoglicanos e várias glicoproteínas, como a tenascina C e fibronectina, e é, conseqüentemente, altamente carregada, hidratada (Danley e col., 2008; Egeblad e col., 2010; Lu e col., 2012).

A síntese ou degradação alterada de um ou mais componentes da MEC levam a modificações em sua composição, bem como uma organização desconfigurada leva a mudanças na arquitetura, resultando em mudanças dinâmicas na MEC (Lu e col., 2011).

As células respondem às mudanças da MEC, principalmente, através de integrinas. As integrinas são proteínas transmembranas heterodiméricas formadas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$  (Hynes, 2002).

A dinâmica da MEC deve ser finamente regulada para assegurar o desenvolvimento normal dos tecidos. Isto é conseguido graças a mecanismos redundantes que modulam a expressão e função de enzimas difundidas na matriz. Quando esses mecanismos de controle estão corrompidos, a dinâmica da MEC torna-se desregulada, levando a diferentes estados patogênicos, incluindo câncer (Lu e col., 2011; Willis e col., 2013).

Adicionalmente, estudos prévios têm mostrado que a composição da MEC em tumores é mais reativa quando comparada à MEC de tecidos normais. Proteínas como colágenos I e III, fibronectina, vitronectina e tenascina-C estão super-expressas, enquanto colágeno tipo IV e laminina tiveram sua expressão diminuída em tecidos neoplásicos (Tabela 3) (L Adison, 2006). Ainda, o aumento de fibronectina, colágeno IV e tenascina na MEC de pacientes com câncer de pulmão em células pequenas foi correlacionado com uma menor sobrevida (Sethi e col., 1999), sugerindo que a modulação da composição da MEC pode contribuir ou atuar como um marcador para a agressividade da doença.

Adicionalmente, estudos realizados por Barcellos-Hoff e Ravani (2000) demonstraram que agentes cancerígenos não só podem induzir mudanças genéticas nas células, mas também alterar a composição da MEC. Uma vez modificado, este estroma expõe fatores de crescimento com atividade alterada, influenciando a adesão, migração, diferenciação e morte celular, além da expressão alterada de receptores que medeiam as interações célula-célula

(Barcellos-Hoff e Ravani, 2000), e célula-matriz, especialmente a integrina  $\beta 1$  (Ruoslahti, 1999). Juntos, esses estudos apontam a contribuição das alterações estromais para a tumorigênese.

## 1.5 Câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA). Os tumores correspondem ao aumento de volume observado em qualquer parte do corpo. Quando o tumor se dá por crescimento do número de células ele pode ser benigno ou maligno. Os tumores benignos são geralmente autolimitados em seu crescimento e não invasivos, já os malignos apresentam a capacidade de invadir outros tecidos através da manifestação de algumas alterações essenciais na fisiologia celular. Estes representam um distúrbio patológico do crescimento, caracterizado por uma proliferação excessiva e incessante de células (Hanahan e Weinberg, 2011).

Evidências indicam que a tumorigênese em seres humanos é um processo multifatorial e que reflete alterações genéticas que levam à transformação progressiva de células normais em células altamente malignas (King e Cidlowski, 1998; Hanahan e Weinberg, 2000).

As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco que podem ser externos, como tabagismo, alcoolismo, alimentos, exposição à radiação (solar ou radioatividade) e fatores intrínsecos, como mutações herdadas e condições imunes. Esses fatores podem agir associados ou sequencialmente para iniciar o processo de carcinogênese. De todos os casos de câncer aproximadamente 80% estão associados a fatores externos (Jemal e col., 2007; Garcia e col., 2007).

Em 2000, Hanahan e Weinberg descreveram que as manifestações de algumas alterações essenciais na fisiologia celular podem induzir um fenótipo celular maligno. Resumidamente, estas características são descritas como capacidades adquiridas de um crescimento celular autossustentável, dessensibilização a sinais de inibição do crescimento, escape da apoptose, potencial de replicação ilimitados, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase.

Em 2011 essa lista foi estendida (Hanahan e Weinberg, 2011) com a inclusão de mais alterações como instabilidade genômica e cromossomal, inflamação crônica local, utilização de vias metabólicas alteradas para obtenção de energia e evasão do sistema imune. Dessa forma, a progressão tumoral cria um microambiente que favorece a plasticidade, migração, invasão das células neoplásicas (Hendrix e col., 2003).

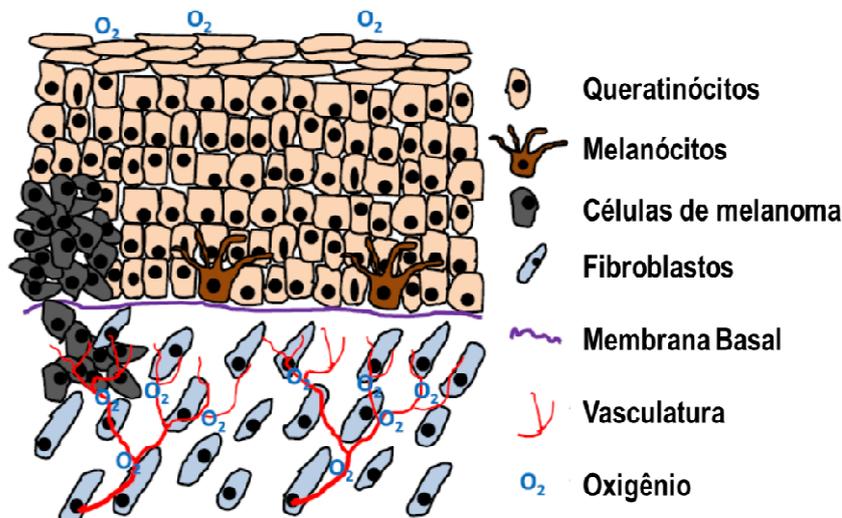
Há uma enorme variedade de tumores que se originam, basicamente, de todos os tipos de células humanas, o que representa um grande problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas.

### 1.5.1 Melanoma

A pele é composta de duas camadas principais: a derme e a epiderme. A derme contém vasos sanguíneos e linfáticos, folículos pilosos, glândulas e nervos. É um tecido altamente elástico devido a uma extensa rede de fibras de colágeno e elastina. A epiderme é a camada mais externa da pele e atua como uma barreira física, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Ela é constituída principalmente por queratinócitos (Fig. 8), que aderem fortemente uns aos outros através dos desmossomos, o que proporciona impermeabilidade ao tecido (Chatelain e col., 2011).

A pele é protegida de danos provocados pelo sol pelos melanócitos, que estão localizados na camada basal da epiderme e fornecem melanina para os queratinócitos através de organelas conhecidas como melanossomas, que absorvem e espalham a radiação solar (Jimbow e col., 1993). Os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele. O crescimento dos melanócitos é controlado pelos queratinócitos, através de comunicação extracelular via fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e sistemas de adesão célula-célula dependente de E-caderina (Haass e col., 2005; Lin e Fisher, 2007).

Figura 8 - Representação esquemática das duas primeiras camadas da derme



Legenda: A epiderme é a camada mais externa e é composta principalmente de queratinócitos (90%) e melanócitos (5%) responsáveis pela pigmentação da pele. A epiderme é separada da derme por uma membrana basal. O fornecimento de nutrientes para estas duas camadas é feito por difusão a partir da rede vascular da derme e o oxigênio, a partir da atmosfera. O câncer de pele se origina, em particular, a partir de queratinócitos (não melanoma) e melanócitos (melanoma cutâneo) que proliferam anormalmente e invadem a epiderme e a derme após a penetração através da membrana basal.

Fonte: Adaptada Chatelain e col, 2011.

A exposição ao sol (Armstrong e Kricke, 2001) ou infecção por vírus (zur Hausen, 1996) podem causar a desregulação das células epidérmicas que começam a proliferar de forma anormal, levando à invasão descontrolada dos tecidos adjacentes (Chatelain e col, 2011).

A maioria dos tumores de pele é classificada em dois tipos: não melanoma e melanoma de pele. Os cânceres de pele melanoma são originários de melanócitos, por vezes, a partir de lesões pré-existentes benignas denominadas nevi. Os melanomas, geralmente, se desenvolvem passando por uma fase de crescimento radial antes de invadir verticalmente a derme. Eles representam menos de 5%, mas são responsáveis por mais de 75% das mortes por câncer de pele (Chin, 2003; Chatelain e col., 2011). O melanoma é originado de mutações, randômicas ou não, em genes importantes para a diferenciação dos melanócitos (Chin, 2003).

As estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para o ano de 2014 apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer no Brasil, e entre os cânceres mais incidentes na população brasileira está o de pele não melanoma (182 mil). Ainda, segundo as mesmas estimativas, em 2014 estão previstos 5.980 novos casos de melanoma, sendo 2.960 casos em homens e 2.930 casos em mulheres. Em comum com outros tipos de câncer, a incidência aumenta com a idade.

A cirurgia continua a ser a base do tratamento do melanoma e é mais eficaz no estágio inicial da doença. No entanto, melanomas mais espessos, mesmo quando completamente extirpados, estão associados com uma sobrevida de aproximadamente 10 anos (Retsas e col., 2002) e mesmo nos pacientes diagnosticados com melanoma fino (inferior a um milímetro de espessura) 15% morrem dentro de 10 anos (White e col., 2002).

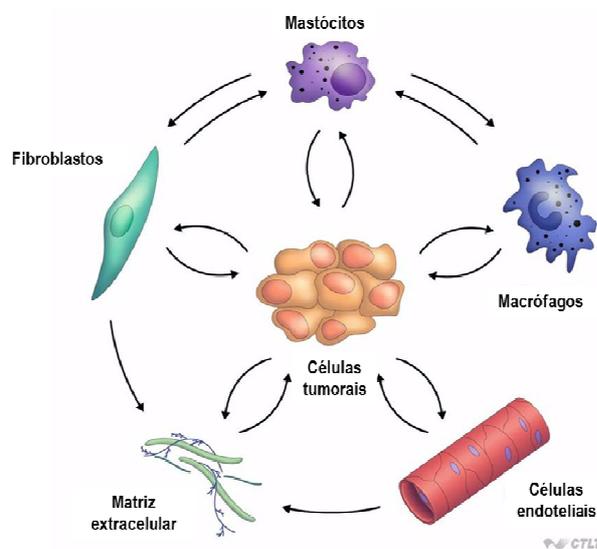
O melanoma apresenta um alto potencial metastático, sua disseminação periférica é mais comumente observada e ocorre através dos vasos linfáticos. Já a disseminação para focos distantes ocorre através da rede vascular. Tanto a quimioterapia convencional quanto a radioterapia têm sido ineficazes em pacientes com doença em estágios metastáticos. Sendo assim, há uma grande necessidade de novos alvos para o tratamento de melanoma (Emmett e col., 2011). O melanoma é um tipo de tumor angiogênico, demonstrando a formação de novos vasos como um passo importante na progressão da doença a partir de melanócitos atípicos (Streit e Detmar, 2003).

### 1.5.2 Microambiente tumoral

Por décadas prevaleceu o conceito de que alterações genéticas em oncogenes e genes supressores de tumor eram suficientes para iniciar e suprir a progressão tumoral (Hanahan e Weinbeg, 2000). A visão contemporânea do câncer entende o crescimento tumoral como um processo complexo regulado por interações entre as células tumorais e componentes do microambiente (Allen e Louise, 2011).

O microambiente tumoral consiste, além das próprias células tumorais, de células não cancerígenas residentes e infiltrantes, como os fibroblastos, as células do sistema imune e inflamatório, as células endoteliais; de componentes da MEC, além dos diversos fatores solúveis, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento (Blankenstein, 2005; Allen e Louise, 2011) (Fig. 9). O microambiente é determinante para o desenvolvimento do tumor. Enquanto o estroma normal pode retardar a tumorigênese, alterações em seus componentes promovem crescimento tumoral (Bissell e Radisky, 2001).

Figura 9 - Microambiente tumoral



Legenda: Células tumorais interagem não apenas com componentes da matriz extracelular, mas igualmente com outros elementos celulares, como fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais e pericitos.

Fonte: Adaptada de "Tumor and Host Microenvironment" from *Fundamentals of Oncology for Public Health Practitioners*.

Da mesma forma, a composição da MEC na massa tumoral é diferente daquela no tecido normal e favorece a proliferação e migração celular estimulando, conseqüentemente, a progressão tumoral. Além disso, a MEC pode modular a capacidade proliferativa das CE, resultando no aumento da angiogênese. Delaney e colaboradores (2006) mostraram que os efeitos pró-apoptóticos e antiproliferativos da endostatina, um peptídeo angiostático derivado do colágeno, eram dependentes da composição da MEC em contato com as CE. A MEC possui uma função crítica para o crescimento e manutenção dos vasos, não só por manter uma base sólida que pode permitir a migração celular, mas também por aprisionar fatores de crescimento importantes que medeiam sinais intracelulares (Conway e cols., 2001).

As células cancerosas podem interagir diretamente, através de integrinas e outros receptores de superfície celular, com a MEC ativada induzindo sinais de crescimento (Lukashev e Werb, 1998; Giancotti e Ruoslahti, 1999). Esta ligação permite ainda a transdução de sinais que influenciam o comportamento celular, que vão desde a quiescência em tecidos normais à motilidade, resistência à apoptose e ativação do ciclo celular. Inversamente, a falha na sinalização das integrinas pode reduzir a motilidade celular, induzir apoptose ou causar arraste do ciclo celular (Giancotti e Ruoslahti, 1999). Os efeitos da MEC,

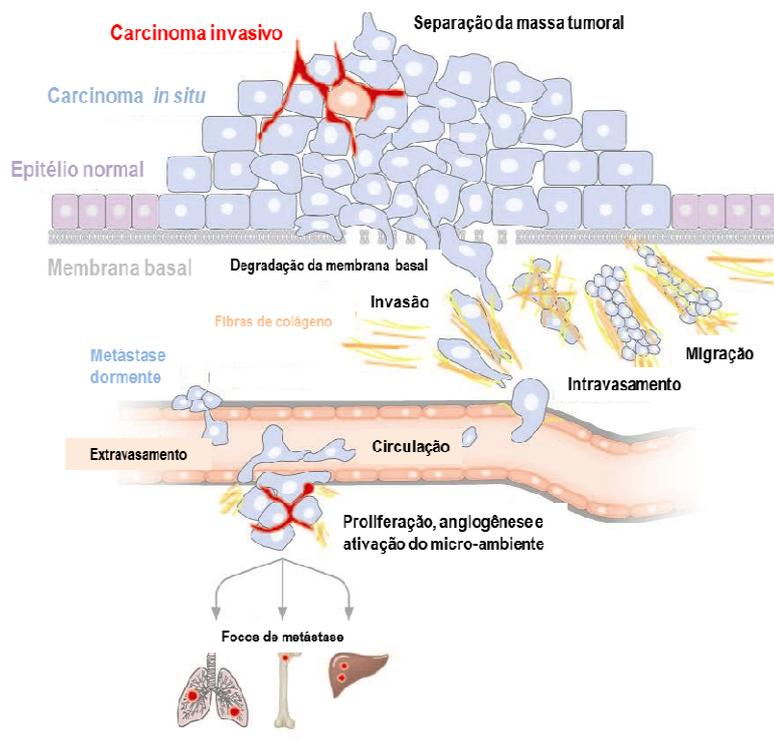
produzida por células tumorais, sobre a ativação e modulação de CE constituiriam, assim, um alvo terapêutico importante no tratamento de diversos tipos de tumores.

Adicionalmente, a interação das células tumorais com mediadores inflamatórios permite a construção de outro paradigma: a contribuição de processos inflamatórios para a carcinogênese. Os diversos componentes do sistema imune encontrados no microambiente tumoral são relativamente deficientes na atividade tumoricida quando comparados aos componentes sistêmicos. Por exemplo, estudos têm demonstrado a estreita ligação entre macrófagos e progressão tumoral (Leek e col., 1999; Pollard, 2004; Tsutsui e col., 2005; Joyce e Pollard, 2006). Os macrófagos formam a maior população de células inflamatórias na maioria dos tumores. Os macrófagos associados a tumores (TAM) são abundantes em tumores sólidos contribuindo para a carcinogênese por induzir a produção de fatores como EGF e VEGF (O'Sullivan e col., 1993; Lewis e col., 2000), a liberação de citocinas e enzimas que promovem a angiogênese, invasão e metástase, como MMP-9 (Mantovani e col., 2006; Lewis e Pollard, 2006) e também por diminuir a expressão de fatores antiangiogênicos, como a IL-12 (Sica e col., 2000; Allen e Louise, 2011).

As células invasivas poderão proliferar no novo ambiente ou se manter em dormência por períodos variáveis (Geho e col., 2005) (Fig. 10). A promoção da angiogênese é a principal via pela qual as células malignas escapam do tumor e entram na circulação estabelecendo metástases (Maeda e col., 2003).

No processo de metástase, as células tumorais adquirem a habilidade de se dissociarem de um tumor primário, ultrapassar a parede dos vasos e invadir tecidos (Kurschat e Mauch, 2000). A metástase é um processo que envolve uma sequência de eventos que compreende: (i) o descolamento das células do tumor primário, facilitado pela perda de expressão da E-caderina; (ii) a migração e invasão no estroma local; (iii) o intravasamento e trânsito – através dos capilares sanguíneos na periferia do tumor, com consequente acesso ao sangue; (iv) a ancoragem no leito vascular no tecido alvo, seguida de extravasamento; (v) migração, adesão e formação de micrometástases.

Figura 10 - Etapas da disseminação metastática



Legenda: A transformação das células epiteliais normais conduz ao carcinoma *in situ*, o que, como resultado da perda de junções aderentes, evolui para a etapa de carcinoma invasivo. Após a degradação da membrana basal, as células tumorais invadem o estroma circundante, migram e intravasam para os vasos sanguíneos ou linfáticos, sendo transportados nos capilares até um órgão distante.

Fonte: Adaptada de Bacac e Stamenkovic, 2008

A importância da angiogênese para a progressão e metástase tumoral levou ao desenvolvimento de terapia com inibidores (Tabela 4). A maioria tem como alvo o VEGF (Allen e Louise, 2011).

Tabela 3 - Alvos terapêuticos no microambiente (\*)

Alvo de micro-ambiente	Alvo Molecular	Molécula	Efeitos
Angiogênese	$\alpha\beta 3$	Cilengitide	Reduz a angiogênese e aumenta a apoptose de CE associada ao tumor <i>in vitro</i> . Na clínica ele tem demonstrado alguns efeitos na redução do crescimento do tumor e na sensibilização de tumores para outros tratamentos.
	$\alpha\beta 5$ $\alpha\beta 1$ HSP70 VEGF PSMA	Abegrin Volociximab 17AAG Bevacizumab Anticorpo (MLN2704)	Inibe a angiogênese Sensibiliza CE para radioterapia Sensibiliza CE para radioterapia Neutraliza o VEGF PSMA expresso em CE associadas ao tumor de muitos tumores sólidos; atrasa a progressão.
	CTGF	FG-3019 DN-9693	Anticorpo bloqueador diminui o crescimento tumoral e a metástase. Inibe a estabilização do RNAm de CTGF mediada pelo VEGF
Inibidores de sinalização	FGFR	<i>In vitro</i>	Inibição da proliferação e do ciclo celular e aumenta a morte das células
	HGF PKB/AKT e mTOR	NK4 siRNA <i>in vitro</i>	Antagonista de HGF Inibe a proliferação induzida por FN
Inibidores de citocina	SDF-1/CXCR4	Briostatín-5	Antagoniza a migração e metástase/ inibe a neovascularização mediada pelo CXCR4
	CD105(endoglin)	SN6j(Ac)	Inibe o antagonismo de CD105 nas funções inibitórias de TGF- $\beta$ e induz a apoptose na hipóxia
Inibidores da degradação de MEC	FAP $\alpha$ (seprase) Tenascina C	Sibrotuzumab 81C6 (Anticorpo marcado com I <sup>131</sup> ITA1(aptamer)	Reduz o crescimento e a invasão
	uPA/uPAR	A6	Atrasa o crescimento tumoral, prolonga a sobrevida
	MMPs	Marimastat(BB-2516) Rebimastat(BMS-275291)	Facilita o transporte de radioisótopos Reduz o crescimento tumoral, metástase e angiogênese Modelos <i>in vitro</i> e xenográfico mostram efeito anti-invasivo, metastático e angiogênicos Não foram encontrados benefícios clínicos conclusivos
Hipóxia	CAIX	WX-G250	Induz toxicidade celular dependente de anticorpo

Legenda: (\*) Moléculas, anticorpos e RNA de interferência atualmente em estudos pré-clínicos e clínicos de fase I-III que tem como alvo diferentes componentes do microambiente. PSMA- antígeno de membrana próstata-específico; CTGF- fator de crescimento de tecido coectivo; SDF-1- fator derivado do estroma 1; FGFR-Receptor de crescimento para fibroblasto; HGF- fator de crescimento de hepatócito; uPA(R)- do inglês uroquinase ativada por plasminogênio (receptor).

Fonte: Adaptada de Allen e Louise, 2011.

## 1.6 Lipoxinas

Ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico (AA), são encontrados esterificados a fosfolípídeos de membrana e podem ser hidrolisados pela fosfolipase A<sub>2</sub> e, em seguida, metabolizados nas CE por diversas enzimas, liberando mediadores lipídicos pró- ou anti-inflamatórios (Kadl e Leitinger, 2005).

As lipoxinas (LX), um acrônimo derivado de *lipox*xygenase *int*eraction products, são caracterizadas como mediadores biologicamente ativos e representam uma distinta classe de metabólitos do AA. Estes metabólitos possuem reconhecidas atividades anti-inflamatória, pró-resolutiva (Serhan, 2007) e antiangiogênica (Fierro, 2002). As lipoxinas podem ser produzidas *in vitro* e *in vivo*, em diferentes espécies, a partir de fontes endógenas de AA (Fierro e Serhan, 2001). As LX, em sítios inflamatórios, estão separadas temporal e espacialmente dos outros eicosanóides pró-inflamatórios, como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), que são sintetizados nas fases iniciais da resposta inflamatória aguda.

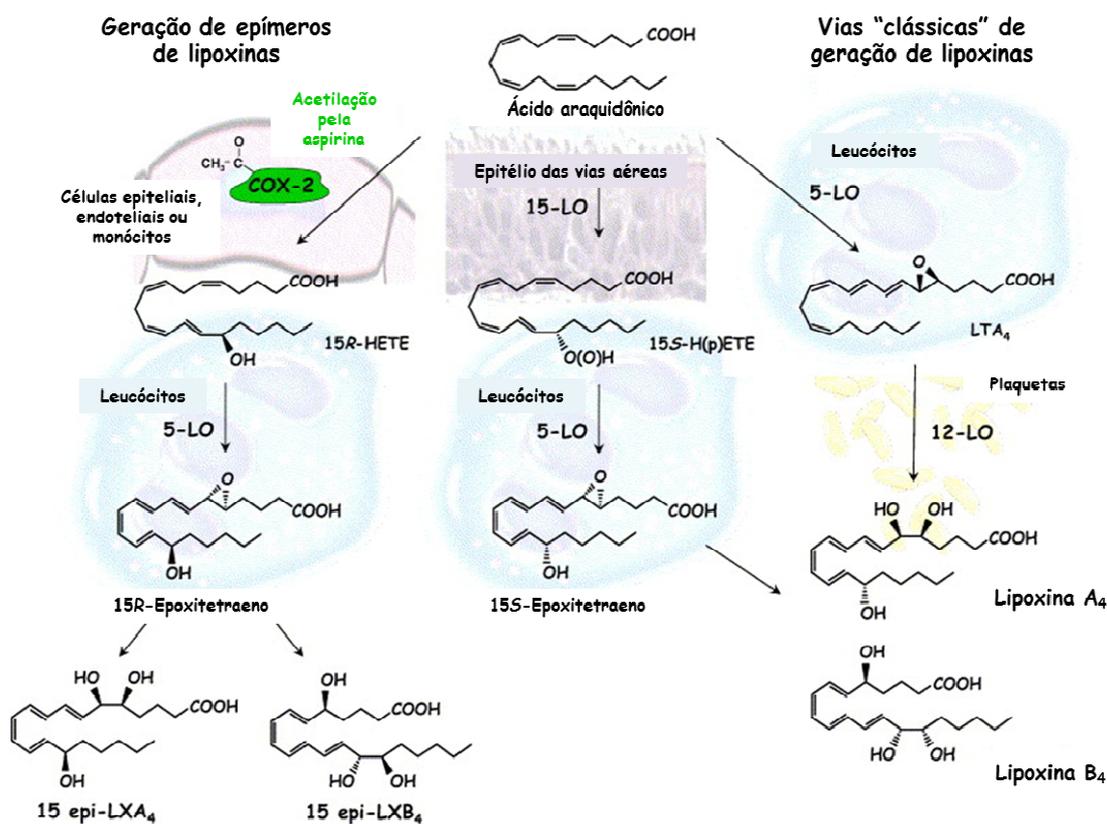
### 1.6.1 Biossíntese e Receptores de Lipoxinas

As duas principais rotas biossintéticas de LX ocorrem durante interações entre isoformas das lipoxigenases (LO) (Fig. 11). Na primeira via descrita, ocorre a inserção do oxigênio molecular no carbono 15 do AA pela 15-LO presente em células epiteliais, gerando o ácido 15S-hidroperoxieicosatetraenóico (15S-H(p)ETE) ou a sua forma álcool reduzida, o ácido 15S-hidroxeicosatetraenóico (15S-HETE) (Serhan e col., 1984). Estes podem servir como substrato para a 5-LO em neutrófilos levando à formação dos trihidroxitetraenos LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub>. A segunda via ocorre, predominantemente, dentro da vasculatura e envolve a interação de leucócitos com plaquetas. A biossíntese é iniciada com a liberação de LTA<sub>4</sub>, formado pela 5-LO a partir do AA em leucócitos ativados, o qual é convertido por plaquetas, via 12-LO, a LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub> (Edenius e col., 1988) (Fig. 11).

A aspirina influencia diretamente a geração de LX pela produção das formas epímeras de LX. As CE e epiteliais expressam a ciclooxigenase (COX)-2 em resposta a diversos estímulos como citocinas, hipóxia e infecções bacterianas, entre outros. A aspirina acetila a

COX-2, de forma irreversível, inibindo sua atividade catalítica para a biossíntese de prostanóides e desviando-a para a conversão do AA em 15R-HETE, que é, em neutrófilos, transformado pela 5-LO nos 15-epímeros de lipoxinas, 15-epi-LXA<sub>4</sub> e 15-epi-LXB<sub>4</sub> (ou ATL, do inglês *aspirin triggered lipoxins*) (Clària e Serhan, 1995) (Fig. 11).

Figura 11 - Biossíntese das lipoxinas e 15-epi-lipoxinas (*aspirin-triggered-lipoxins-ATL*)



Fonte: Adaptada de Chiang e col., 2005.

Circuitos adicionais de produção de ATL foram descritos. A biossíntese pode ser desencadeada pela pioglitazona e atorvastatina em miocárdio de ratos, especialmente com o seu uso combinado, um efeito independente de aspirina (Birnbbaum e col., 2006), ou por lovastatina, via geração do ácido 14,15-epoxieicosatrienoico (14,15-EET) (Planagumà e col., 2010). Estas vias indicam o papel fundamental que as LX podem ter em doenças vasculares, visto que a atorvastatina e a lovastatina possuem potentes ações na redução dos níveis de colesterol.

As LX são biossintetizadas em resposta a diversos estímulos, como injúrias e infecções, têm ação local, e são rapidamente inativadas enzimaticamente. A principal via de inativação das LX é através da desidrogenação no carbono 15 por monócitos que convertem LX em 15-oxo-LXA<sub>4</sub>, seguido por uma redução da dupla adjacente e  $\omega$ -oxidação no carbono 20 (Clish e col., 2000). Devido à rápida transformação e inativação das LX e ATL *in vivo*, foram sintetizados análogos capazes de resistir a esse metabolismo, mantendo a integridade estrutural e ações biológicas (Parkinson, 2006).

As LX, ATL e seus análogos sintéticos exercem suas ações através da ligação a um receptor específico acoplado à proteína G (GPCR), denominado ALX (Fig. 13), que foi inicialmente descrito como um receptor órfão e de alta homologia com o FPR, receptor do formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Fiore e col., 1994) sendo inicialmente denominado FPR-*like-1* (FPRL-1) (Murphy e col., 1992).

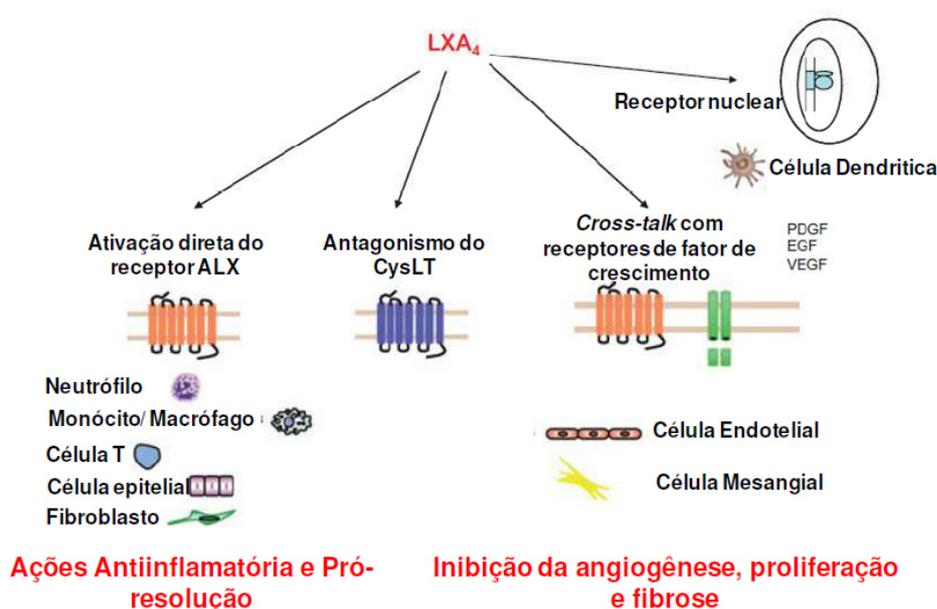
O ALX humano foi clonado e identificado em vários tipos celulares, como leucócitos e células residentes incluindo macrófagos, fibroblastos, células epiteliais do intestino e CE (Chiang e col., 2006). Além de interagir com o ALX, as LX são agonistas parciais da subclasse de receptores do LTD<sub>4</sub> (CysLT1) (Fig. 12), antagonizando o efeito pró-inflamatório deste mediador e somando-se às bioações anti-inflamatórias das LX (Gronert e col., 2001).

Diversos estudos mostram que as LX inibem a proliferação induzida por fatores de crescimento como PDGF, EGF e fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) com um mecanismo que envolve o *cross-talk* entre o ALX e os receptores tirosina-quinase destes fatores (McMahon e col., 2000, 2002; Wu e col., 2006) (Fig. 12). Corroborando estes achados, recentemente nosso grupo observou que a inibição de alguns efeitos do VEGF pelo ATL-1, um análogo sintético da 15-epi-LXA<sub>4</sub>, está relacionada com a associação da proteína SHP (fosfatase com domínios homólogos à Src)-1 ao receptor VEGFR-2 e à subsequente desfosforilação do mesmo (Cezar-de-Mello e col., 2008). Em células dendríticas, tanto a LX quanto seus análogos podem modular a resposta inata através da ligação a um receptor intracelular (Fig. 12) denominado aril hidrocarboneto (AhR) - um fator de transcrição ativado por ligante - e assim inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias via ativação de SOCS (*suppressor of cytokine signaling proteins*)-2 (Machado e cols., 2006).

### 1.6.2 Ações biológicas

As LX, ATL e seus análogos possuem um vasto leque de ações, modulando diferentes tipos celulares (Serhan, 2005), com um potente efeito inibitório nos processos inflamatório e angiogênico, em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, inibindo ativação, adesão e migração celular (Fierro e Serhan, 2001; Fierro e col., 2002).

Figura 12 - Interação das LX e ATL com seus receptores



Legenda: As ações das LX e ATL são mediadas através de muitos mecanismos. Estes incluem a ativação do seu receptor de alta afinidade, o ALX; a interação com receptores CysLT. Inibição indireta, através de outros receptores como CysLT e receptores para fatores de crescimento (VEGF e PDGF). Outro receptor da  $LXA_4$  é o receptor nuclear aril hidrocarboneto, que desencadeia a expressão da SOCS-2 em células dendríticas estimuladas com LX.

Fonte: Adaptado de Maderna & Godson, 2009.

As ações anti-inflamatórias das LX envolvem sua capacidade de inibir a quimiotaxia, a adesão, a transmigração de neutrófilos (PMN) (Serhan e col., 1995) e modular as interações PMN-endotélio ou epitélio (Colgan e col., 1993; Papayianni e col., 1996), possivelmente por sua capacidade de modular a expressão de L-selectina (Filep e col., 1999). Ainda em neutrófilos, podem inibir sua adesão às CE da artéria coronária humana devido à modulação da expressão de CD11/CD18 (Fiore e Serhan, 1995). As LX têm uma ação inibitória também sobre a quimiotaxia e a migração de eosinófilos (Bandeira-Mello e col., 2000) e diminuem a

citotoxicidade de células T ativadas através do bloqueio da ativação de ERK (Ariel e col., 2003).

Dentre as ações das LX no âmbito da resolução da inflamação destaca-se sua eficácia ao estimular a quimiotaxia e aderência de monócitos sem causar degranulação e liberação de ROS (Maddox e Serhan, 1996; Maddox e col., 1997). Em estudos *in vitro*, as LX induzem o *clearance* de PMN apoptóticos por macrófagos de maneira não-flogística (Godson e col., 2000), o que contribui significativamente para a resolução do quadro inflamatório.

Nas CE, as LX agem inibindo a expressão de E-selectina (Scalia e col., 1997) não permitindo a adesão frouxa de PMN ao endotélio, além de inibir a reorganização do citoesqueleto de actina e a migração induzidas por VEGF via fosforilação de FAK (Cezar-de-Mello e col., 2006) demonstrando seu grande potencial antiangiogênico. As LX também são capazes de inibir outras ações angiogênicas importantes produzidas pelo VEGF, incluindo a fosforilação das vias PI3-K e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), envolvidas com a proliferação das CE, expressão e atividade de MMP-9, envolvida com o remodelamento vascular, além de inibir a fosforilação do receptor VEGFR-2 pela ativação de fosfatase, reduzindo a resposta proliferativa das CE ao VEGF (Cezar-de-Mello e col., 2008). Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ATL-1, em células endoteliais, inibe a produção de espécies reativas de oxigênio mediada pela ativação da enzima NAD(P)H oxidase, protegendo contra o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares (Nascimento-Silva e col., 2007). Além disso, este análogo induz a expressão da heme oxigenase (HO)-1, uma enzima com papel anti-inflamatório e antioxidante (Nascimento-Silva e col., 2005).

Mais recentemente Pang e colaboradores (2011) demonstraram que a LXA<sub>4</sub>, em concentrações fisiológicas, pode impedir a hiperpermeabilidade induzida por LPS através da manutenção da expressão da VE caderina e  $\beta$ -catenina. Este efeito sugere uma possível ação antimetastática para lipoxinas, uma vez que o aumento da permeabilidade é um evento inicial para o intravasamento de células tumorais.

Em tumores, um estudo demonstrou que a LXA<sub>4</sub> em células de hepatoma (HepG2) suprime a invasão induzida por fator de crescimento para hepatócitos (HGF). Este efeito é devido à inibição da expressão da enzima COX-2, e das MMP-2 e -9 (Zhou e col., 2009). Corroborando este estudo, Hao e colaboradores (2011) mostraram que LXA<sub>4</sub> promove a apoptose e inibe a proliferação, migração e angiogênese de células HepG.

Estes dados sugerem que as LX poderiam ser um candidato para a prevenção da invasão ou metástase, porém, ainda são poucos os estudos relacionados à modulação do comportamento das células tumorais por estes lipídios. Como os quimioterápicos utilizados tradicionalmente apresentam muitos efeitos adversos, um dos objetivos da pesquisa de novas moléculas com efeito antitumoral é a demonstração do efeito farmacológico associado à redução dos efeitos indesejáveis.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do microambiente tumoral sobre o comportamento de células endoteliais humanas e a possível modulação deste efeito por um análogo sintético de 15-epi-lipoxinas, 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A<sub>4</sub> (ATL-1), em um modelo de melanoma humano.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a modulação da permeabilidade endotelial por fatores secretados pelas células tumorais (fatores solúveis, com ênfase no papel do VEGF, e matriz extracelular imobilizada);
- Investigar a regulação de proteínas presentes nas junções aderentes e as vias de sinalização envolvidas no controle da permeabilidade;
- Estudar a modulação inflamatória e angiogênica de células endoteliais expostas a fatores tumorais, analisando a expressão de moléculas de adesão, de fatores angiogênicos e seus receptores e a diferenciação endotelial *in vitro*;
- Neste contexto tumoral, analisar o efeito de ATL-1 na permeabilidade endotelial, na ativação inflamatória do endotélio, na diferenciação endotelial e na migração transendotelial de células de melanoma *in vitro*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

- Os reagentes utilizados no artigo 1 estão descritos na sessão Materiais e Métodos do manuscrito.
- 15-epi-16-(*para*-flúor)-fenoxi-lipoxina A<sub>4</sub> (ATL-1) - doação do Dr. John Parkinson
- Concanavalina A (ConA), TNF- $\alpha$  - SIGMA ALDRICH
- Matrigel- Becton Dickinson Labware
- Primeres baseados na sequência de *Homo sapiens* senso para V-CAM 1 (5'- AAG GGA GCA CTG GGT TGA CT-3') e primer anti-senso (5'- TGG GAA AGT TGC ACA GGA GT- 3'); anti-VEGF-A(catálogo QT 01682072); anti-KDR (catálogo QT 00069818), Anti-IL-8. (catálogo QT00000322); anti-CXCR2 (catálogo QT 02377732) anti-GAPDH (catálogo QT 00079247); SYBR-green - QIAGEN
- Anticorpos: anti-VCAM-1 e anti-GSK-3 $\beta$  – Santa Cruz Biotechnology; anti-p-GSK3- $\beta$  (Ser 9) – Cell Signaling
- ELISA IL-8 (900-K18) - PeproTech Inc.

#### METODOLOGIA GERAL

A metodologia empregada no artigo 1 encontra-se descrita na sessão de Materiais e Métodos do manuscrito.

### 3.2 Cultura de células

#### Células primárias

Os cordões umbilicais foram obtidos do Hospital-Maternidade Carmela Dutra, Rio de Janeiro-RJ, em até no máximo 24 horas após o parto, e armazenados a 4°C em PBS estéril (NaCl 1,37 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, KCl 40 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; pH 6,5) contendo glicose 0,111 M (PBS-glicose). As células endoteliais da veia cordão umbilical (HUVECs) foram retiradas conforme método descrito anteriormente (Jaffe e col., 1973). Resumidamente, em câmara de fluxo laminar e após assepsia total do cordão, as extremidades da veia do mesmo foram canuladas com cânulas de metal e lavadas com PBS-glicose a 37°C. As células foram descoladas da parede interna da veia com adição de colagenase tipo IV 0,1% em PBS-glicose por 10 minutos a 37°C. Após as células foram coletadas em tubos contendo meio 199 (M199) (SIGMA ALDRICH) complementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, fungisona 2,5 µg/ml e os antibióticos penicilina/estreptomicina 500 µg/ml e ciprofloxacina 5 µg/mL. A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. O sedimento foi distribuído em garrafas com área de 25 cm<sup>2</sup> previamente recobertas com gelatina 2% estéril e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias até que as células atingissem a confluência. A obtenção das subculturas foi feita através da dissociação das células primárias com tripsina 0,1% / EDTA 0,01% e centrifugação a 1.200 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio M199 suplementado com 20% SFB e cultivadas em garrafas de área de 75 cm<sup>2</sup> previamente gelatinizadas. As subculturas foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência com a substituição do meio a cada 24 ou 48 horas.

Para a utilização nos ensaios, as células foram tripsinizadas como descrito acima e a contagem total foi determinada em câmara de *Neubauer*. O número de células foi ajustado conforme o ensaio.

As células utilizadas neste estudo tiveram seu uso regulamentado pelo registro SISNEP / CONEP (Ministério da Saúde) / CAAE: 0086.0.314.325-10 (Protocolo de

origem # 74/10, aprovado pelo CEP/SMSDC-RJ - Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil da cidade do Rio de Janeiro).

### Células de linhagem tumoral

As células de linhagem de melanoma MV<sub>3</sub> com elevado potencial metastático (van Muijen e col., 1991) foram gentilmente doadas pelo Dr. Cezary Marcienkevickz (Universidade de Temple, PA, EUA) congeladas (95% de SFB e 5% de DMSO) em nitrogênio líquido. As células foram descongeladas e expandidas em garrafas com área de 25 cm<sup>2</sup> cultivadas em meio DMEM (pH 7,2) suplementado com 10% SFB, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina. O meio foi trocado a cada 24 ou 48 horas e as células em confluência foram passadas, após a dissociação com Hank's / EDTA (5 mM) e centrifugação a 900 rpm por 10 minutos. As células foram redistribuídas em garrafas com área de 75 cm<sup>2</sup> em meio suplementado com SFB.

Para a produção das matrizes, as células foram descoladas das garrafas de cultura conforme descrito acima e a contagem total foi determinada em câmara de *Neubauer*. O número de células foi ajustado conforme o ensaio.

### **3.3 Obtenção de matrizes extracelulares nativas**

As células HUVECs e MV3, cultivadas por 72 horas sem alteração dos seus respectivos meios, foram lisadas para obtenção da matriz extracelular segundo técnica descrita por Morandi e colaboradores em 1994. Resumidamente, após formação da matriz uniforme, as células foram lavadas com SFB e extraídas com um tampão de extração (PBS pH 7,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 0,001 M - PBS-Ca<sup>2+</sup> - 0,1% de Triton X-100, NH<sub>4</sub>OH 0,1 M e inibidores de proteases PMSF 1 mM, 1 ml/ml de coquetel de inibidores - 10 mg/ml de aprotinina, 10 mg/mL de leupeptina, 2 mg/mL de pepstatina) a 4°C para a retirada do material celular. Posteriormente, os poços contendo a rede proteica invisível ao microscópio óptico, na qual é possível detectar elementos da matriz extracelular por

técnicas de imunocitoquímica, foram três vezes lavados com solução PBS+Ca<sup>2+</sup> para eliminar restos celulares. Então, as matrizes foram bloqueadas com BSA 0,1% em PBS-Ca<sup>2+</sup>, 1 ml/ml de coquetel de inibidores e 1 mL/mL de PMSF por 30 minutos para o bloqueio de eventuais áreas não cobertas por matriz. As células endoteliais foram imediatamente plaqueadas sobre as matrizes obtidas.

### 3.4 Ensaio de permeabilidade

HUVECs e MV3 ( $4 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em duplicata em insertos de transwell (BD Falcon) com membrana de porosidade de 0,4  $\mu\text{m}$  (inseridos no interior de placas de cultura de 24 poços) para a secreção e extração da matriz como descrito em 3.3. Após, novas HUVECs ( $5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas sobre as diferentes matrizes. A interação ocorreu por 24 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi retirado o meio e a monocamada foi lavada com PBS 1x. Para determinar a permeabilidade endotelial frente às diferentes matrizes foram adicionados 150  $\mu\text{l}$  de Dextran-FITC (1 mg/ml) diluídos em meio sem vermelho de fenol dentro do insert e 500  $\mu\text{L}$  de meio sem vermelho de fenol no poço da placa. A permeabilidade foi quantificada através da leitura da quantidade de Dextran-FITC encontrado no poço depois de 1 hora a 37°C. A leitura foi realizada em leitor de placas Wallac EnVision 2104 Multilabel Reader (PERKINELMER) no comprimento de onda de 490 nm de excitação e 535 nm de emissão.

### 3.5 Ensaio de tubulogênese *in vitro*

Para avaliação da capacidade das células endoteliais formarem vasos foi realizado o ensaio de tubulogênese *in vitro*. Para isso, HUVECs e MV3 ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços para a secreção da matriz como descrito em 3.3. Posteriormente, as células endoteliais ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram plaqueadas em meio de cultura M199 suplementado com 20% com SFB sobre as matrizes formadas. Em seguida, as

células foram lavadas com PBS 1x e deixadas em M199 sem suplementos. As células então foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) por 1 hora. Paralelamente, 65 µl de Matrigel® (11,46 mg/ml; Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) foram colocados em placas de 96 poços durante 30 minutos a 37°C para sua polimerização. Ao fim dos tratamentos, as células endoteliais aderidas nas diferentes matrizes foram tripsinizadas das placas de 6 poços e colocadas ( $4 \times 10^4$  células/poço) em triplicata distribuídas em meio de cultura M199 suplementado com 5% com SFB, sobre o Matrigel®, durante 5 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e as células fixadas sobre o Matrigel® com glutaraldeído 1,1% em PBS durante 20 minutos em temperatura ambiente (Zemani e col., 2005). A retirada do fixador foi feita por três lavagens com PBS 1x. Não houve danos nas estruturas tubulares por esse tipo de fixação. A análise do número total das ramificações (prolongamentos celulares endoteliais, que resultam no aspecto em “rede” da diferenciação angiogênica) foi feita em campo claro, no microscópio invertido (Olympus IX71, Tóquio, Japão) em um aumento de 4x. As imagens capturadas foram analisadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 9.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

### 3.6 Detecção da citocina IL-8 em meios condicionados

Para avaliar a secreção de IL-8 produzida pelo endotélio e pelo melanoma, HUVECs e MV3 ( $2 \times 10^5$  células por poço) foram cultivadas em placas de 24 poços *overnight* em seus respectivos meios suplementados. Em seguida, foram lavadas com PBS 1x a 37°C antes da adição de 500 µl de meio M199 com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) e sem suplementos. As células então foram deixadas por 4, 8, 16 ou 24 horas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após os referidos tempos, os sobrenadantes foram retirados (meios condicionados) e estocados a -80°C até a realização do ensaio.

Foi também avaliada a secreção de IL-8 produzida por HUVECs após contato com diferentes matrizes. Para tal, HUVECs e MV3 ( $1,5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços para a secreção e extração da matriz como descrito em 3.3. Em seguida, HUVECs ( $2 \times 10^5$  células por poço) foram plaqueadas. Após 1 hora de interação, as células foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) e deixadas por mais 23 horas em

incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C, totalizando o tempo de 24 horas. Após incubação, o sobrenadante foi retirado e estocado a -80°C até sua leitura.

O ensaio foi realizado utilizando um kit de ELISA para IL-8, comercialmente disponível (PeproTech Inc.). A dosagem foi feita conforme as instruções do fabricante. As leituras foram efetuadas a cada 5 minutos em leitor de placas *EnVision™* no comprimento de onda de 490 nm corrigido com o comprimento de onda de 650 nm. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

### 3.7 Imunocitoquímica

HUVECs e MV3 ( $1,5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em lamínulas (13 mm de diâmetro) inseridas em placas de cultura de 24 poços para a secreção e extração da matriz como descrito em 3.3. Após, as HUVECs ( $2 \times 10^5$  por poço) foram cultivadas por 24 horas em M199 suplementado com SFB 20%. Em seguida foram lavadas com PBS 1x e deixadas em M199 sem suplementos. As células então foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) por 1 hora. Ao fim da incubação, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1x gelado e fixadas com paraformaldeído 4% / sacarose 4% por 20 minutos. Em seguida foram incubadas com BSA 5% por 30 minutos e anticorpo anti-V-CAM-1 (1:400) *overnight* a 4°C em câmara úmida e escura. A incubação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado à biotina (1:400) foi realizada durante 1 hora, seguida por mais três lavagens com PBS 1x e incubação por 1 hora com Alexa Fluor® 555 (1:400) a temperatura ambiente. O núcleo foi marcado com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 1 minuto. As laminas foram montadas usando N-propilgalato 20 mM e 80% glicerol. A epifluorescência foi observada ao microscópio de fluorescência (modelo IX-71 Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas usando o programa Adobe Photoshop 7.1 (Adobe Systems, San Jose, CA).

### 3.8 Análise da expressão gênica (qRT-PCR)

As HUVECs ( $5 \times 10^5$ ) em duplicata foram incubadas durante 24 horas, a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , sobre as matrizes obtidas através extração descrita em 3.3. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e deixadas em M199 sem suplementos. Posteriormente, o RNA total foi isolado utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). As amostras de RNA foram estocadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$  até o uso. A qualidade e a quantidade de RNA nas amostras foram analisadas por absorvância em NanoVue Plus (GE Healthcare). As amostras de RNA (100 ng) foram retro-transcritas em DNA complementar utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer  $-20^\circ\text{C}$  até o momento de uso. O cDNA foi amplificado com o uso de *primers* (Qiagen) para VCAM-1, KDR, VEGF-A, IL-8, baseados na sequências descritas em 3.1. O nível de expressão de cada gene analisado foi normatizado contra o GAPDH. O qPCR foi realizado em Rotor Gene Q e os *amplicons* foram quantificados pelo sistema de fluorescência SYBR-green (Qiagen). A condição padrão da reação de PCR foi:  $95^\circ\text{C}$  por 5 minutos, seguido de 45 ciclos a  $95^\circ\text{C}$  (5 segundos) e  $60^\circ\text{C}$  (10 segundos), seguido por uma curva-padrão de desnaturação. A expressão relativa foi determinada pelo método do  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , que representa o valor da expressão de genes analisados com os mesmos calibradores.

### 3.9 Obtenção de células mononucleares

As células mononucleares humanas foram isoladas de sangue periférico de doadores saudáveis. Para isso, o sangue foi retirado e tratado com EDTA 5%. Em seguida foram adicionados 5 mL de sangue em 5 mL de Ficoll-Hypaque (GE-healthcare) e centrifugados ( $400\text{g}/25^\circ\text{C}$ ) por 40 minutos (Simões e Fierro, 2005). A camada de células mononucleares foi coletada, lavada com solução salina e ressuspendida em meio de cultura RPMI 1640 sem suplementação com SFB. As células foram contadas em câmara de *Neubauer*.

### 3.10 Adesão de mononucleares à monocamada endotelial

HUVECs e MV3 ( $1,5 \times 10^5$ ) foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços para a secreção e extração da matriz como descrito em 3.3. Após, HUVECs ( $2 \times 10^5$  por poço) foram cultivadas por 24 horas em M199 suplementado com SFB 20% em atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os poços foram lavados 3 vezes com M199 e a monocamada endotelial foi incubada ou não por 4 horas com  $\text{TNF-}\alpha$  (10 ng/mL) em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado com L-glutamina 2 mM e os antibióticos penicilina/estreptomicina 500  $\mu\text{g/mL}$ , ciprofloxacina 5  $\mu\text{g/mL}$  e fungisona 2,5  $\mu\text{g/mL}$  e contendo 0,1% de BSA. As células mononucleares isoladas do sangue periférico de doadores saudáveis e posteriormente marcadas com fluorocromo vermelho (PKH-26, SIGMA ALDRICH) de acordo com as instruções do fornecedor, foram ativadas ou não com 4  $\mu\text{g/mL}$  ConA e plaqueadas sobre a monocamada endotelial ( $2 \times 10^5$ ) em meio M199 contendo 0,1% de BSA. A interação ocorreu durante 45 minutos em atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a incubação, os poços foram lavados 3 vezes com M199 para retirada dos mononucleares não aderidos à monocamada. Foi adicionado paraformaldeído 3,7% em PBS por 10 minutos para a fixação das células. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x e as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71, Tóquio, Japão). A quantificação das células mononucleares aderidas se deu através da contagem de 10 campos aleatórios em aumento de 400x.

### 3.11 Análise da produção óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada através de fluorimetria. Para tal HUVECs e MV3 ( $4 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em quadruplicata em placas escuras de 96 poços (*Corning Incorporated*) para a secreção e extração da matriz como descrito em 3.3. HUVECs ( $5 \times 10^4$ ) foram plaqueadas em meio M199 sobre as matrizes obtidas, tratadas ou não com ATL-1(100 nM) durante a primeira hora de interação. Após, foi adicionado aos poços 20% de SFB e as células foram deixadas por mais 23 horas em atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com meio HBSS

(*Hank's Buffered Salt Solution*) (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glucose, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>). Após este tempo, as células foram incubadas com a sonda DAF-FM DA (5 µM, Molecular Probes) por 1 hora, período em que a sonda é internalizada.

A produção de NO foi avaliada através da fluorescência que foi monitorada, em intervalos de 30 minutos, após incubação de até 4h pela excitação em 495 nm e emissão em 515 nm no fluorímetro (*Envision<sup>TM</sup>*).

### 3.12 Análise estatística

A significância foi obtida através do ANOVA seguido pela análise com o pós-teste Bonferroni ou teste *t de Student* sendo  $P < 0,05$  considerado como estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

Nosso grupo já avaliou diferentes efeitos antiangiogênicos do ATL-1, principalmente devido ao efeito inibitório deste análogo sobre diversas ações do VEGF. Entretanto, pouco se sabe sobre seu efeito em vasos presentes em um microambiente alterado, onde a angiogênese é constantemente estimulada por fatores secretados pelas células tumorais / estromais.

Em um primeiro momento, foi avaliada a capacidade do ATL-1 de modular os efeitos do VEGF, um potente agente permeabilizante, em um contexto tumoral. Os resultados obtidos na primeira etapa deste projeto estão apresentados no corpo do manuscrito a seguir.

### 4.1 Artigo

ATL-1, A SYNTHETIC ANALOG OF LIPOXIN MODULATES ENDOTHELIAL PERMEABILITY AND INTERACTION WITH TUMOR CELLS THROUGH A VEGF-DEPENDENT MECHANISM

**Andreza Maia Vieira; Edward Helal Neto; Camila Castro Figueiredo; Thereza Christina Barja-Fidalgo; Iolanda Margherita Fierro; Verônica Maria Morandi da Silva.**

Submetido para Biochemical Pharmacology

**ATL-1, A SYNTHETIC ANALOG OF LIPOXIN, MODULATES ENDOTHELIAL PERMEABILITY AND INTERACTION WITH TUMOR CELLS THROUGH A VEGF-DEPENDENT MECHANISM**

Vieira AM<sup>1</sup>; Neto EH<sup>1</sup>; Figueiredo CC<sup>1</sup>; Barja Fidalgo C<sup>2</sup>; Fierro IM<sup>3</sup>; Morandi V<sup>1</sup>

Department of Cell Biology - <sup>1</sup>Laboratory of Endothelial Cell Biology and Angiogenesis (LabAngio) and <sup>2</sup>Laboratory of Biochemical and Cellular Pharmacology; <sup>3</sup>Department of Pharmacology – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) - Rio de Janeiro; Brazil.

**Keywords:** Endothelial permeability; lipoxin; VEGF; VE-cadherin; adherens junctions

**Running Title:** Modulation of VEGF-induced endothelial permeability by ATL-1

Corresponding author:

**Dr. Verônica Morandi/Associate Professor**

Departamento de Biologia Celular/IBRAG

Laboratório de Biologia da Célula Endotelial e da Angiogênese (LabAngio)

Rua São Francisco Xavier, 524 PHLC, Lab. 203/204, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Fax: + 55 21 2334 0309

e-mail: veronica@uerj.br

## ABSTRACT

Lipoxins (LX) and 15-epi-LX are lipids with a potent inhibitory effect on angiogenesis, in different models in vivo and in vitro. ATL-1, a synthetic analog of 15-epi-LXA<sub>4</sub>, inhibits various actions stimulated by vascular endothelial growth factor (VEGF). However, LX actions on endothelial cells (EC) in tumor-related contexts are still unknown. Here, we investigated the modulation of EC by ATL-1, in a model that mimics tumor extravasation. We observed that the analog inhibited endothelial permeability induced by VEGF, through the stabilization of VE-cadherin/ $\beta$ -catenin-dependent adherens junctions. We tested the ability of MV3 cells, a highly metastatic melanoma cell line, to transmigrate across unchallenged EC monolayers for 18 hours, as compared to NGM normal melanocytes. ATL-1 was able to inhibit only melanoma extravasation. MV3 cells secrete large amounts of VEGF and we observed that ATL-1 per se did not alter this ability. Melanoma cells skills to crossing endothelial monolayers were due to the steady accumulation of tumor-derived VEGF. When endothelial cells were challenged with exogenous VEGF, added at levels comparable to those secreted by MV3 cells over 18 hours, and a short-term (4 hours) transendothelial migration assay was performed, both melanoma and melanocyte cells were able to extravasate, and ATL-1 was able to block the passage of both cells. These results indicate that ATL-1 has a potent inhibitory effect on the permeability induced by VEGF, and that this pharmacological effect could be used to block tumor extravasation across endothelial barriers, with a possible prospect of reducing the haematogenic spread of cancer cells.

## 1. INTRODUCTION

Malignant tumors arise from genetic, epigenetic and microenvironmental alterations that might eventually culminate with the fostering of fast growing cell masses, not rarely primed for invasion of tissues and even of distant organs [1]. Metastasis is a multi-step process that includes transendothelial tumor cell migration, intravasation of cancer cells into vessels, followed by hematogenous extravasation and the settlement of new tumor cells at secondary sites [2]. Recent studies have shown that tumor growth and metastasis are strongly influenced by a variety of cues provided by stromal cells such as fibroblasts, immune system cells, and endothelial cells (EC), which create a supportive microenvironment for tumor progression [3-5].

Blood vessel walls form a selective barrier for the transport of molecules between blood and tissues, and vascular health is largely kept by endothelial integrity [6]. The endothelium is a continuous monolayer formed by cells linked to each other by different types of cell-to-cell junctions. These complex structures are formed by transmembrane adhesive molecules linked to a network of cytoskeletal proteins. On the basis of morphological and functional characterization, three types of junctions have been described in endothelial cells [7, 8] tight junctions, adherens junctions, and gap junctions. Adherens junctions are formed by cadherins, VE-cadherin being the one present at the endothelial cell surface. Cadherins are cell adhesion molecules, which are anchored with their cytoplasmic tail to a network of intracellular cytoplasmic proteins such as catenins, which are connected to the actin-based microfilament system [9]. Endothelial permeability changes are associated with redistribution of surface cadherins and stabilization of focal adhesion bonds [10]. Loss of barrier properties in pathophysiological situations can lead to extracellular edema.

Many tumors express high levels of the proangiogenic factor VEGF [11]. VEGF exerts its effects mainly by binding two specific tyrosine kinase receptors, VEGFR-1 (also named Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Signaling through endothelial VEGFR-1 in angiogenesis remains an elusive question, since the tyrosine kinase activity of this receptor is poor and not required for endothelial cell function [12]. However, a role of both membrane-bound and soluble VEGFR-1 as negative modulators of angiogenesis has been proposed in the last years, an activity centrally based on the very high affinity of this receptor for VEGF, which would render this growth factor less available for binding to VEGFR-2. This property would be responsible for keeping adequate rates of angiogenesis and vasculogenesis during development and also in normal homeostasis, and would explain why mice embryos bearing

vegfr1 – / – genotypes undergo early embryonic death, a failure linked to excessive formation of disorganized lumen-less vessels [13].

VEGFR-2 plays a central role in angiogenesis and permeability of EC [14]. Once activated, VEGFR-2 dimerizes and becomes autophosphorylated, leading to the phosphorylation of several cytoplasmic signaling molecules. VEGF has been reported to induce VE-cadherin phosphorylation, thus initiating the loosening of adherens junctions [15]. VEGF165 and VEGF189 are splicing variants of the VEGF-A isoform, and both constitute the most potent inducers of vascular permeability within this growth factor family [16].

The practical possibility of controlling vascular permeability has several therapeutic implications. For example, vascular leakage in tumors not only facilitates metastatic dissemination, but also contributes to the elevated interstitial pressure that is a trait shared by several solid tumors [17]. Elevated interstitial pressure is probably the cause of altered tumor perfusion and impaired drug delivery. Conversely, decreasing vascular permeability might be beneficial because it might increase drug accessibility to tissues.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as aspirin (ASA), have been suggested to prevent certain types of cancer, such as lung, colon, and breast cancers, and its mechanism of action is thought to result from antiangiogenic activity [18,19]. ASAs therapeutic mechanism of action includes the inhibition of COX-2-derived prostanoids [20]. In addition, when acetylated by ASA, COX-2 ability to generate prostanoids is blocked, but remains active in EC to induce the biosynthesis of ASA triggered-15-epi-lipoxin A4 (ATL) [21]. These endogenous lipid mediators are the carbon 15 epimers of the native lipoxins (LX) and mimic some of their bioactivities [22]. ATL can be generated in vivo during cell–cell interactions, such as EC–neutrophil interaction [23] and display potent inhibitory actions in several key events in inflammation [24].

Our group has reported diverse effects of 15-epi-16-(parafluoro)- phenoxy-lipoxin A4 (ATL-1) on endothelial cells. We demonstrated that ATL-1 inhibited VEGF-stimulated endothelial migration, an essential component of the angiogenic process, in a concentration- dependent manner [25, 26]. Furthermore, ATL-1 modulates essential components of the motile process, by impairing actin polymerization and focal adhesion assembly [27].

Here, we demonstrated that ATL-1 inhibits VEGF-induced endothelial permeability, leading to an important impairment of the transendothelial migration capacity of a highly invasive human melanoma cell line. These effects were directly related to the integrity of VE-cadherin-mediated junctions. Besides the well described anti-angiogenic properties of ATL-1

[25-28], the new data presented herein are supportive of the therapeutic potential of lipoxin synthetic analogs also as anti-metastatic drugs, through the targeting of the extravasation of tumor cells across endothelial barriers.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Antibodies and other reagents**

Polyclonal rabbit anti-VE-cadherin [pY658] antibody, and FITC- or Alexa Fluor® 455-streptavidin conjugates were purchased from Life Technologies (Brazilian division, São Paulo, Brazil). Goat anti-histone H3 and anti-VE-cadherin, and rabbit anti- $\beta$ -catenin antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Biotin-labeled anti-IgG antibody was obtained from Abcam (Cambridge, UK). VEGF-A165 isoform (referred as VEGF in this paper) was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brasil). HEPES, trypsin, EDTA, bovine serum albumin (BSA), PMSF, benzamidine, leupeptin, soybean trypsin inhibitor, fluorescein isothiocyanate-dextran (dextran-FITC, average MW 40 000) and vital PKH26 red fluorescent dye for cell membrane labeling (PKH26GL-1KT) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). General supplies for buffers and saline solutions, detergents and protease and phosphatase inhibitors were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Unless otherwise stated, all reagents for cell culture were purchased from Life Technologies (Brazilian Division, São Paulo, Brazil).

### **2.2 Cell culture**

Primary endothelial cells were isolated from human umbilical vein (HUVEC) as previously described [29]. Umbilical cords were collected according to the guidelines provided by SISNEP/CONEP – Brazilian Ministry of Health (CAAE: 0086.0.314.325-10 - Source Protocol #74/2010, approved by the SMSDC-RJ/City of Rio Janeiro Research Ethics Committee). At least five independent primary cultures were pooled for each experiment, in order to minimize the interference of individual genetic variation. The human melanocyte cell line (NGM) was obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (RJ, Brazil). The human melanoma strain (MV3) with high metastatic potential [30], was kindly donated by Dr. Cezary Marcienkevickz, (Temple University, PA, USA). The immortalized human

microvascular endothelial cell line (HMEC-1) [31] was kindly provided by Dr. Francisco Candal (Emory School of Medicine & CDC, Atlanta, GA, USA). HUVECs were cultured in medium 199 containing 20% FCS, 50 U/mL penicillin, 15 µg/mL streptomycin, 8 U/mL heparin, and 6 g/L HEPES. MV3 and NGM were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. HMEC-1 was cultured in MCDB-131 culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 14,04 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM HEPES, 0.5 U/mL penicillin, 0.5 mg/mL streptomycin, 1 µg /mL hydrocortisone, 10 ng/mL EGF (Sigma, St Louis, MO, USA) and 10% FBS. The cultures were incubated at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was changed every 24 to 48 hours and the cells were passaged at confluence, after dissociation with 0.1%/0.01% trypsin/EDTA.

### **2.3 Preparation of cell extracts**

Endothelial cells were treated with ATL-1 and then stimulated with VEGF. To obtain whole-cell extracts, 10<sup>6</sup> cells were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid, pH 6.4, containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, and 1% Triton X-100), and also supplemented with the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, 1 µM aprotinin, 1 µM leupeptin and 1 µM soybean trypsin inhibitor.

### **2.4 VEGF quantification by ELISA**

To investigate the rate of VEGF secretion, HUVECs, NGM and MV3 cells (2 x 10<sup>5</sup>) were grown in medium supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 4, 8, 16 or 24 hours. Collected conditioned media samples were stored at -80°C. We also prepared samples from MV3 cells treated with ATL-1 (100 nM) and then incubated for 4 or 18 hours at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. VEGF levels in tumor conditioned media were determined by using the standard ELISA Development Kit from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions.

### **2.5 Tumor transendothelial migration assay**

HUVECs (5 x 10<sup>4</sup> cells) were plated on 8.0 µm-pore BD Falcon Cell Culture inserts (to fit inside standard 24-well culture plates). Cells were pretreated or not with ATL-1 (100 nM) and stimulated or not with VEGF (10 ng/mL) for 1 hour. After the treating medium was removed, PKH126-labeled MV3 melanoma cells (3 x 10<sup>4</sup>) were allowed to migrate across endothelial

monolayers for 4 or 18 hours. The bottom side of each insert was fixed in 3.7% formaldehyde in PBS and the upper side was cleaned with a flexible rod. The labeled cells in at least 10 fields per insert were counted on a fluorescence microscope (model IX-71, Olympus, Tokyo, Japan).

## **2.6 Endothelial Permeability Assay**

To determine endothelial monolayer permeability, we used a standard Dextran-FITC protocol and an endothelial cell line of microvascular origin (HMEC-1 cells) which in our hands generated the lowest thresholds for 40 000 dextran-FITC detection (observations from previous protocol optimizations; not shown). HMEC-1 ( $5 \times 10^4$  cells) were plated on Falcon Cell Culture Inserts (0.4  $\mu\text{m}$ -pore size, to fit inside standard 24-well culture plates). Cells were pretreated with ATL-1 (100 nM) and stimulated or not with VEGF (100 ng/mL) for 1 hour. To detect changes in monolayer permeability, 500  $\mu\text{l}$  assay medium without phenol red was added to each lower chamber and 150  $\mu\text{l}$  assay medium without phenol red containing Dextran-FITC (1mg/mL) was added on the top of each insert. HMEC-1 monolayer permeability was quantified as clearance of Dextran-FITC from the upper chamber to the lower one, the fluorescent content was measured using Wallac EnVision 2104 Multilabel Reader (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) at 490 nm and 535 nm absorption/emission wavelengths.

## **2.7 Preparation of nuclear extracts**

Cells were treated with ATL-1 and stimulated with VEGF for 4 h. Intranuclear proteins were obtained by lysing the cells with 10 mM HEPES, pH 7.9, containing 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA (ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetic acid), 1 mM DTT (dithiothreitol), aprotinin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), leupeptin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pepstatin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 1 mM PMSF for 15 min at 4 °C. NP40 (Nonidet P40) (5%) was next added and the nucleus was pelleted at  $12\,000 \times g$  for 5 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 20 mM HEPES, pH 7.9, containing 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, aprotinin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), leupeptin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pepstatin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 1 mM PMSF, and then it was incubated at 4 °C for 30 min. The whole lysate was centrifuged at  $12\,000 \times g$  for 10 min at 4°C. Only supernatants were used. The total amount of proteins in lysates was measured by the BCA kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA).

## 2.8 Western blots

Cell lysates were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% sodium dodecyl sulphate, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and heated in a boiling water bath for 5 min. Samples were resolved by SDS-PAGE and proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore Corp., São Paulo, Brazil). Rainbow-colored protein molecular weight markers (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, Brazil) were run in parallel to estimate molecular weights. Then, membranes were blocked for 30 min with 5% BSA in Tris-buffered saline (TBS-T) (20 mM Tris, pH 7.6, containing 0.8% NaCl and 0.1% Tween 20) and probed overnight with specific antibodies at 4 °C. The membranes were incubated with either anti-VE cadherin (1:500), or anti-phospho VE-cadherin (Y658, 1:1 000) or anti- $\beta$  catenin (1:500), or anti-histone H3 (1: 1 000 ) primary antibodies. After washing steps with TBS-T, membranes were incubated with biotin-conjugated anti-IgG antibody for 1 h, washed again and then incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase. Bound antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Pierce, Rockford, IL, USA). The bands were quantified by densitometry, using Image J Software (Scion Co., Frederick, MD, USA).

## 2.9 Immunofluorescence microscopy

Endothelial cells grown to confluence on 13 mm diameter coverslips, previously covered with gelatin 2% were treated with ATL-1 and stimulated with VEGF for 4 h at 37°C. The monolayers were washed twice with PBS. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS for 20 min and blocked with 5% BSA in PBS for 30 min. The cells were then incubated with anti-VE-cadherin or anti- $\beta$ -catenin Ab (1:400) overnight at 4°C. Subsequently, the cells were washed three times with PBS and incubated with biotin-conjugated anti-IgG (1:400), followed by incubation with FITC- or Alexa Fluor® 455-conjugated streptavidin (1:400) for 1 h at room temperature. Cells were covered with 4,6-diamidino-2-phenylindole for 1 min and washed three times with PBS. Coverslips were mounted on a slide with the use of a 20 mM N-propylgalate and 80% glycerol solution in PBS before examination under a microscope (model IX-71 Olympus, Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence. The images were analyzed using Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

## 2.10 Statistical analysis

Statistical significance was assessed by ANOVA, followed by Bonferroni's t-test, and  $P < 0.05$  was taken as statistically significant.

## 3. RESULTS

### *3.1 ATL-1 inhibits VEGF-induced endothelial permeability by stabilizing VE-cadherin-dependent junctions*

We first decided to investigate whether ATL-1 could reduce the endothelial permeability stimulated by VEGF. Microvascular HMEC-1 cells, which usually generate more sensible thresholds for the detection of labeled macromolecule tracers for permeability assessments, were plated into porous inserts and then pretreated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before the incubation with VEGF (100 ng/ml). As expected, the stimulation of endothelial cells with VEGF increased Dextran-FITC (MW = 40 000) passage through the endothelial monolayer (**Figure 1**). The pre-treatment with ATL-1 completely inhibited VEGF-induced permeability. Noteworthy, ATL-1 had no direct effect on endothelial permeability.

To determine if ATL-1 could impair AJ disruption, we pre-incubated HUVECs with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes and then with VEGF (100 ng/ml), before visualizing VE-cadherin distribution by immunofluorescence analysis (**Figure 2**). We observed a strong pericellular staining of VE-cadherin in cells that were not treated with VEGF, and also in cells incubated with ATL-1 alone (**Fig. 2A**). By contrast, HUVECs stimulated with VEGF exhibited large portions of disrupted pericellular VE-cadherin staining. This effect was completely precluded when the pretreatment with ATL-1 was performed.

We next analyzed whether ATL-1 effect on VE-cadherin-dependent junctions was related to the inhibition of VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF. As shown in **Fig.2B**, ATL-1 was able to impair VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation on tyrosine 658 (Y658).

### *3.2 ATL-1 prevents the VEGF-induced nuclear translocation of $\beta$ -catenin*

When HUVECs were treated with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before incubation for 4 hours with VEGF, we observed a mostly continuous staining of  $\beta$ -catenin in the

pericellular region (**Figure 3**). By contrast, in the absence of ATL-1, VEGF treatment led to a reduction of the pericellular staining of the protein, with a significant loss of the continuous surface staining, a pattern consistent with a possible redistribution of  $\beta$ -catenin towards intracellular compartments. In fact, the comparative analysis of nuclear pools of  $\beta$ -catenin by western blotting (**Figure 4**) demonstrated that the pre-treatment of endothelial cells with ATL-1 prevented VEGF-induced nuclear translocation of  $\beta$ -catenin.

### ***3.3 ATL-1 reduces transendothelial migration of MV3 melanoma cells but not the migration of normal melanocytes: a role for tumor derived-VEGF***

We then decided to evaluate the effect of ATL-1 on the ability of MV3 cells, an invasive human melanoma cell line, to transmigrate across an endothelial barrier, as compared to a normal melanocyte cell line counterpart, NGM cells. For this purpose, HUVECs grown to confluence on porous inserts were pretreated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes. After treatments, NGM or MV3 cells were incubated with the endothelial monolayer for an additional 18 hours. As shown in **Figure 5**, the total number of MV3 migrating cells was about 3-fold over the number of migrating NGM melanocyte cells. MV3 cells treated with ATL-1 showed a significant decrease in the migration as compared to untreated groups (control) or vehicle (ethanol) (**Fig. 5A**). However, ATL-1 *per se* had no effect on the transendothelial migration of NGM cells (**Fig. 5B**).

We next decided to evaluate the endogenous production of VEGF by MV3 melanoma cells and to elucidate if ATL-1 could interfere with this secretion. Using a quantitative ELISA assay, we demonstrated that MV3 melanoma cells continuously secrete large amounts of VEGF in culture (**Figure 6A**). VEGF secreted by MV3 melanoma cells varied from pg/mL concentrations in the first hours of secretion, to ng/mL amounts after 24 hours (2ng/mL/2 x 10<sup>5</sup> cells). By contrast, NGM melanocytes secreted extremely low basal levels of this angiogenic factor. In fact, even the amounts detected after 16 or 24 hours in NGM cells conditioned media were barely statistically significant (Fig. 6A). The secretion of VEGF by HUVECs was not detectable by this procedure. Additionally, the pre-treatment of MV3 cells with ATL-1 (100 nM) had no effect on the short-term (4 hours) and long-term (18 hours) secretion of VEGF (**Figure 6B**), indicating that the inhibitory effect of ATL-1 on melanoma transendothelial migration was not due to a direct interference on the ability of MV3 cells to secrete VEGF, and that the large endogenous production of VEGF by melanoma cells was

probably sufficient to trigger endothelial permeability along the 18 hours period used in the transmigration assay.

In order to ultimately demonstrate the effect of ATL-1 as an antagonist of endothelial permeability to tumor cells, we decided to directly stimulate endothelial monolayers with exogenously added VEGF (10 ng/mL), but now performing a short-term transendothelial tumor migration assay of 4 hours. (**Figure 7**). Effectively, in the presence of exogenous VEGF added at ng/mL levels, MV3 melanoma cells transmigrated in levels that were comparable to those observed in the long-term assay (18 hours), previously ran in the absence of exogenously added growth factor. The pre-treatment of HUVECs with ATL-1 impaired the VEGF-induced transmigration of MV3 cells (**Fig. 7A**). On the other hand, the treatment of endothelial cells with VEGF led to a significant higher number of NGM melanocytes to transmigrate across endothelial monolayers after 4 hours (**Fig. 7B**), as compared to the rates observed after 18 h (Fig. 5B), although the rates remain very low when compared with the malign cell line. Importantly, ATL-1 was able to partially abrogate NGM cells migration in this short-term VEGF-induced migration assay. These data clearly indicate that the ability to secrete elevated amounts of VEGF is rate-limiting to the process of cell extravasation across endothelial barriers, and also confirms that VEGF-activated pathways represent crucial targets to ATL-1 pharmacological activity.

#### 4. DISCUSSION

The contemporary view defines cancer as tissues that would not only consist of transformed cells with excessive proliferation, but that also contain other cells and molecules able to interact, regulate and modify the behavior of tumor cells [3-5, 32, 33]. Vascularization is essential for the development of cancer, ensuring perfusion and sustainment of the whole tumor microenvironment [34]. Endothelial cells are the first in contact with any element present in the blood and are especially prevalent in malign tumors [35].

Besides, there are also strong evidences of a close association between inflammation and angiogenesis in various human diseases, including cancer [1, 36]. Understanding the inflammatory pathways involved in cancer is expected to help in the development of new anti-cancer therapies. Lipoxins, ATL and its analogs have been highlighted as lipid mediators that, beyond the anti-inflammatory and pro-resolution actions [37], have anti-angiogenic

actions [26-28, 38]. Here, we exploited the potential of ATL-1, a synthetic ATL analog, as a modulator of VEGF-induced vascular permeability, and its ability to modulate tumor cells transendothelial migration.

Tumor vessels are characterized by increased permeability, which is expected to facilitate the infiltration of tumor cells towards secondary sites [39]. In endothelial cells, it has been shown that soluble factors such as histamine, thrombin and VEGF increase vascular permeability, by affecting tyrosine phosphorylation of several components of the VE-cadherin/catenin complex [14, 31, 40, 41]. The activation of VEGFR-2 by VEGF leads to VE-cadherin phosphorylation, which has been correlated with the relaxation of cadherin-mediated adhesion in many cell types [33, 42, 43-45]. The activation of VEGFR-2/Kdr receptor results in rearrangement and turnover of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin on the cell membrane [14, 31, 46]. Our group demonstrated that ATL-1 is a potent inhibitor of several steps of angiogenesis induced by VEGF [26]. Here, we demonstrated that ATL-1 was able to impair the permeability-inducing activity of VEGF, by stabilizing AJs at the pericellular region.

A crucial mechanism underlying the VEGF-dependent loosening of AJs is the dissociation of  $\beta$ -catenin from the cytoplasmic tail of VE-cadherin [47, 48]. When  $\beta$ -catenin is dissociated from VE-cadherin, it may take different pathways:  $\beta$ -catenin may be phosphorylated and degraded quickly in the cytoplasm [49] or, in certain conditions, the non-phosphorylated  $\beta$ -catenin may initially accumulate in the cytoplasm and later translocate to the nucleus, where it can trigger the activation of several transcription factors involved in the regulation of migration and proliferation of endothelial cells [50].

Several sites for tyrosine phosphorylation have been identified on the cytosolic portion of VE-cadherin so far [51]. Phosphorylation of Y658, Y731 [52] and Y685 [53] leads to inhibition of cell barrier function, in a process that largely depends on the activation of *Src* family kinases [52-54]. In the present work, we showed that ATL-1 inhibits VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin on Y658. Besides, we showed that the pre-treatment of endothelial cells precluded the translocation of  $\beta$ -catenin translocation to the nucleus after cell treatment with VEGF. We suggest that ATL-1 might favor  $\beta$ -catenin retention at AJ complexes, thus leading to the strengthening of endothelial junctions.

We have previously shown that ATL-1 anti-angiogenic effects on endothelial cells were antagonized by sodium orthovanadate and correlated with SHP-1 phosphatase association with VEGFR-2 [26]. A number of other phosphatases such as VE-PTP, PTP1B, PTP $\mu$  and SHP-2, are also known to associate with VE-cadherin and control its level of

phosphorylation [55]. Therefore, although we hypothesize that ATL-1 primarily interferes with the most upstream component of VEGF-induced signaling pathway - namely, the phosphorylation of the tyrosine kinase receptor VEGFR-2 - the possibility that this analog could also affect phosphatases acting on VE-cadherin cytoplasmic tail deserves further investigation.

Recently, it has been demonstrated that endothelial FAK (focal adhesion kinase) directly phosphorylates VE-cadherin on tyrosine Y658 in response to cell activation by VEGF; conversely, the endothelial barrier function is enhanced when FAK is inhibited [56]. Interestingly, we have previously shown that ATL-1 inhibited VEGF-stimulated migration of endothelial cells, by blocking focal adhesion clustering, due to the inhibition of FAK phosphorylation. Thus, the effect of ATL-1 in preserving the barrier properties of vascular endothelial cells *in vitro* could also result from its ability to inhibit endothelial FAK.

A number of different molecules have been described as potent activators of vascular permeability, and also identified as tumor-secreted factors [reviewed by 57]. Among these, the secretion of large amounts of different VEGF isoforms appears as a hallmark of malign cancers. Increased VEGF expression occurs in malignant peritoneal and pancreatic ascites [58, 59], metastatic breast and lung cancers [60, 61], ovarian and melanoma tumors [56, 61, 62], suggesting that metastatic cancer cells rely on VEGF-dependent mechanisms in order to cross the endothelial barrier.

In order to examine the impact of cell-derived VEGF in the process of melanoma and melanocyte extravasation across endothelial monolayers, we characterized VEGF secretion by the cells used in the present study, and sought to correlate this trait with their ability to transmigrate. We observed a sustained VEGF secretion by MV3 melanoma cells over time, while the normal melanocyte cells (non-malignant) lineage barely produced this growth factor, a fact that well correlated with their respective skills to cross established endothelial monolayers *in vitro*, suggesting that the pronounced metastatic potential of MV3 could be related to an improved ability to secrete VEGF. Chen and colleagues [63] showed that ATL-1 was able to inhibit the production of VEGF by mouse hepatocarcinoma cells (H22). However, in our model, such an inhibition by ATL-1 did not occur.

Several previous works by our group and by others have demonstrated important anti-angiogenic properties of ATL analogs [25-28]. Although VEGF has been extensively characterized both as permeability and angiogenic factor – a fact that prompted it to be named as VPF, from Vascular Permeability Factor – empiric evidences suggest that the signaling

pathways involved in angiogenesis and endothelial barrier regulation can be eventually independent from each other. For example, it has been shown that mice deficient in *Scr* or *Yes* small kinases do not exhibit vascular leak response to VEGF, but show a normal angiogenic response [64]. Therefore, studies to address the anti-metastatic potential of lipoxin analogs, in particular their effects on crucial cellular steps of intravasation and/or extravasation of tumor cells during hematogenous cancer spread, are greatly warranted and presently scarce in cancer cell literature.

Overall, the results presented herein suggest that the antagonizing effect of ATL-1 on VEGFR-2-dependent signaling, already demonstrated as the basis for the anti-angiogenic properties of this synthetic analog, may also imply a relevant anti-metastatic potential of this molecule, a hypothesis that we intend to explore *in vivo*, in the next steps of this work.

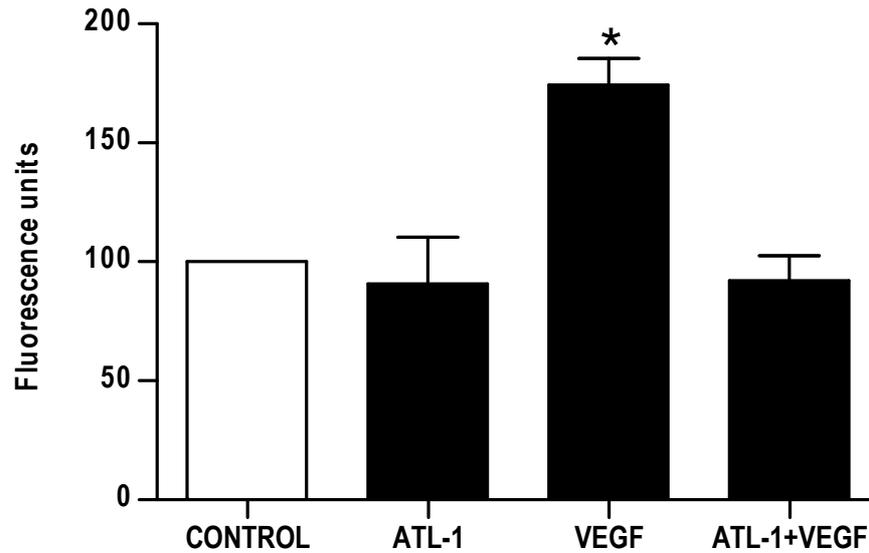
### **Acknowledgements**

The authors are most thankful to Marcos de Oliveira Temperini for the excellent technical assistance with cell cultures, and to Dr John F Parkinson for the generous gift of the ATL-1 analog. We are indebted to the nursing staff of the Carmela Dutra Maternity Hospital (Rio de Janeiro), for providing the umbilical cords which were essential to this work.

### **Funding:**

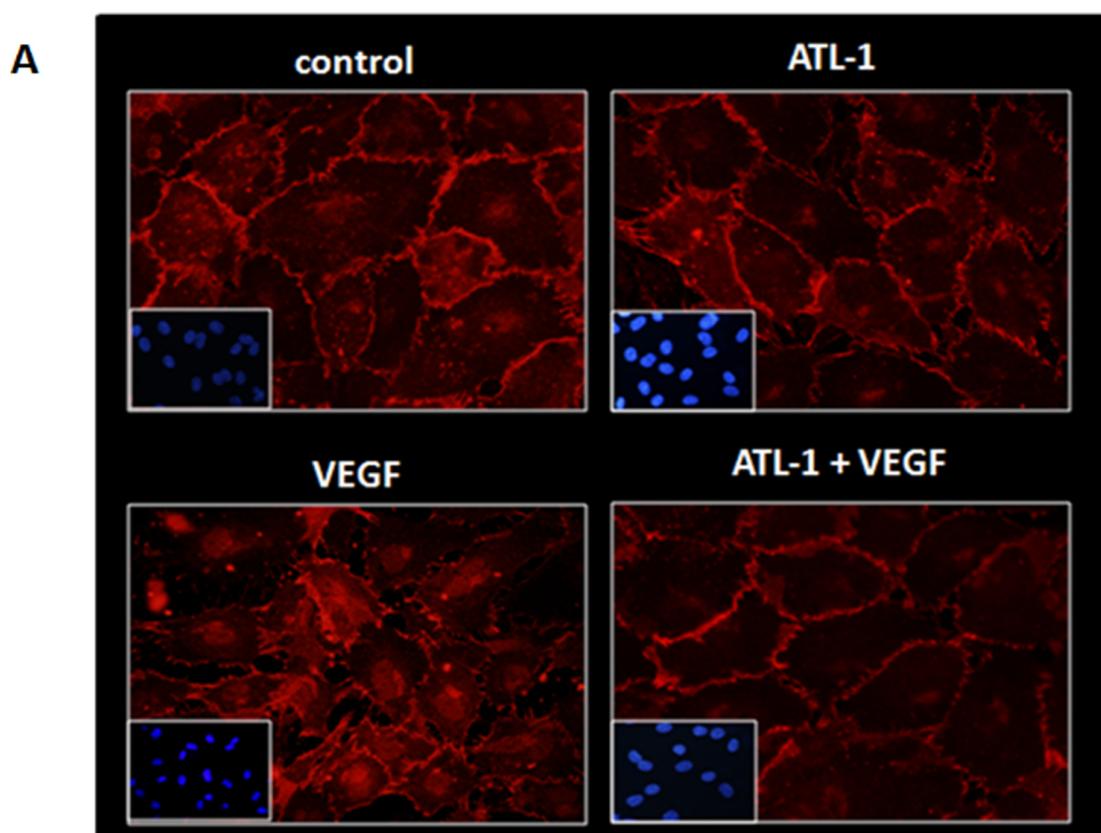
The following organisms supported this research: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil); the Foundation for the Support of Research of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ, Rio de Janeiro State Government); and the National Institutes for Science and Technology (INCT for Cancer Control, coordinated by the Brazilian National Cancer Institute – INCA). A.M. Vieira received fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Ministry of Science, Technology and Innovation, Brazil) and from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Ministry of Education, Brazil). These funding sources were not involved, at any level, in either designing, data collecting, analysing and interpreting of the data presented in the present work, or in the writing of this report and the decision to submitting the article for publication.

FIGURE 1

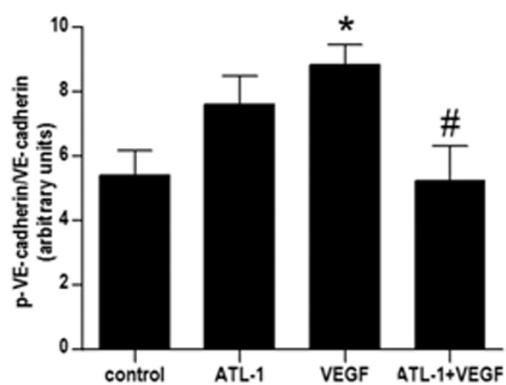
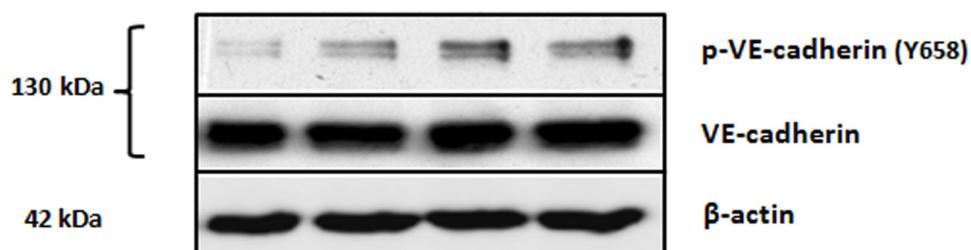


**Figure 1: *ATL-1 inhibits VEGF-induced permeability.*** Dermal microvascular HMEC-1 cells ( $5 \times 10^4$ ) were grown on porous inserts ( $0.4 \mu\text{m}$  porosity) and pre-treated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes, before incubation with (100 ng/mL) or without VEGF for 1 hour, in medium containing dextran-FITC (1 mg/mL). The fluorescence density was quantified using a plate reader (EnVision™) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm. Results represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments. \* $P < 0.05$  refers to the value obtained for VEGF treatment versus all other group

FIGURE 2

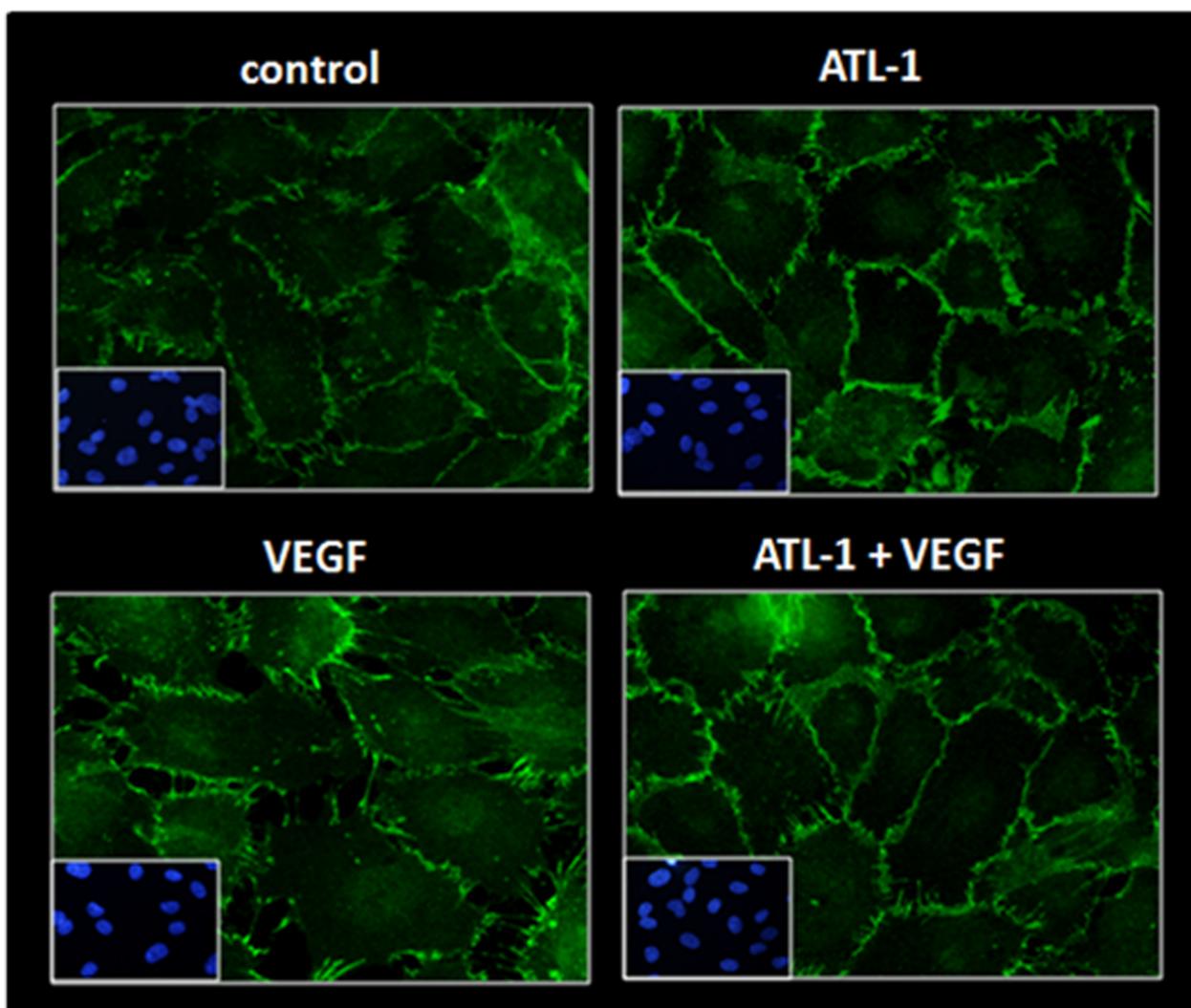


**B**



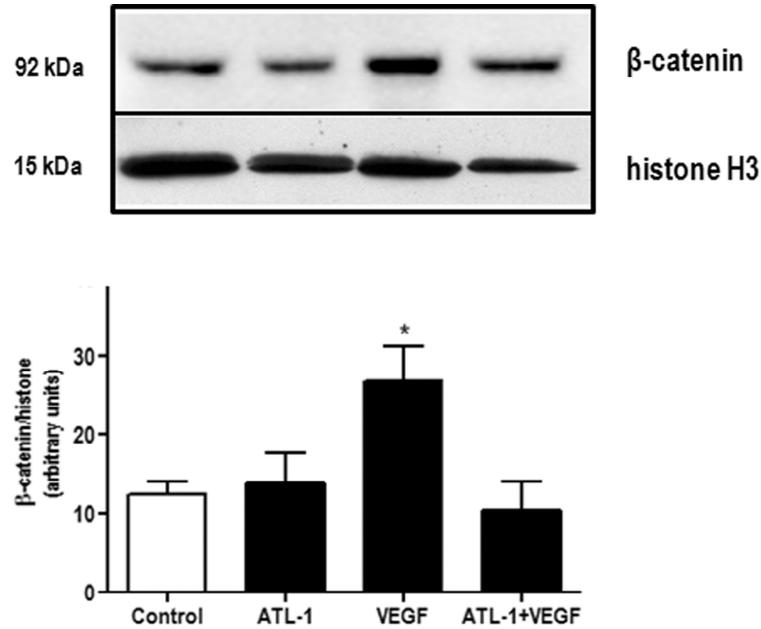
**Figure 2: ATL-1 inhibits VEGF-induced permeability by stabilizing of VE-cadherin-dependent junctions.** (A) HUVEC ( $2 \times 10^5$ ) were grown in 24 well plates and treated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes prior to incubation with VEGF (10 ng/mL) or not for 1 hour. Cells were immunostained with anti-VE-cadherin and nuclei were labeled with DAPI. Magnification: 60x. Images are representative of three similar experiments. (B) HUVEC ( $1 \times 10^6$ ) were grown in 6-well plates and treated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before the incubation with or without VEGF (10 ng/mL) for 10 minutes. The total extract was obtained and analyzed by western blotting using specific antibodies against phosphorylated VE-cadherin (Y658) and VE-cadherin. The bands were analyzed by densitometry. Values represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments, and a representative blot is showed, for illustration purposes. \* $P < 0.05$  refers to the value obtained for VEGF treatment *versus* control, and # $P < 0.05$  refer to ATL-1 + VEGF *versus* VEGF.

FIGURE 3



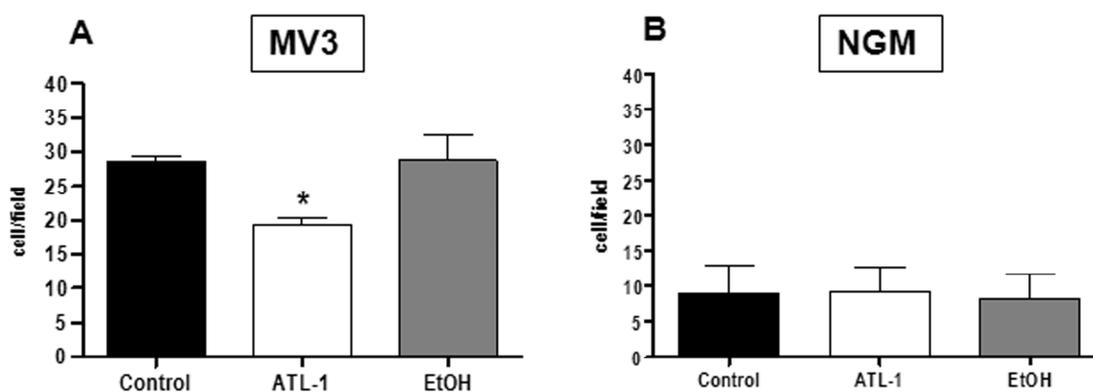
**Figure 3:** *ATL-1 modulates  $\beta$ -catenin translocation to cell nucleus.* HUVEC ( $2 \times 10^5$ ) were grown in 24 well plates and treated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before the incubation with or without VEGF (10 ng/mL) for 4 hours. Cells were incubated with an anti- $\beta$ -catenin antibody and revealed in green fluorescence, as described in the *Methods* section, and nuclei were labeled with DAPI. The cells were viewed with a fluorescence microscope. Magnification: 60 x. Images are representative of three similar experiments.

FIGURE 4



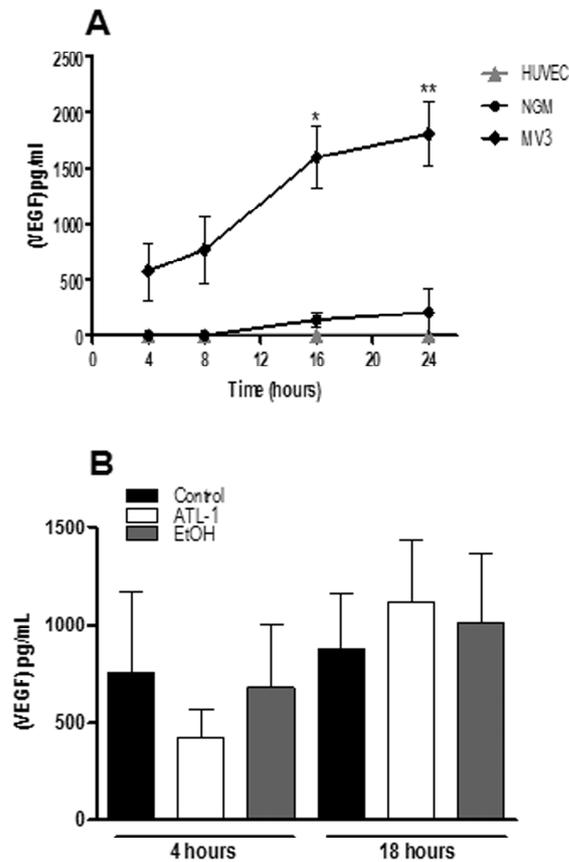
**Figure 4:** *ATL-1 inhibits VEGF-induced nuclear translocation of β-catenin.* HUVEC ( $1 \times 10^6$ ) were cultured in 6 well plates and treated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before the incubation with or without VEGF (10 ng/mL) for 4 hours. The nuclear extract was obtained and analyzed by western blot using specific antibodies against β-catenin and histone H3. The blots were analyzed by densitometry. Values represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments. \* $P < 0.05$  refers to the value obtained for VEGF treatment versus all other groups.

FIGURE 5



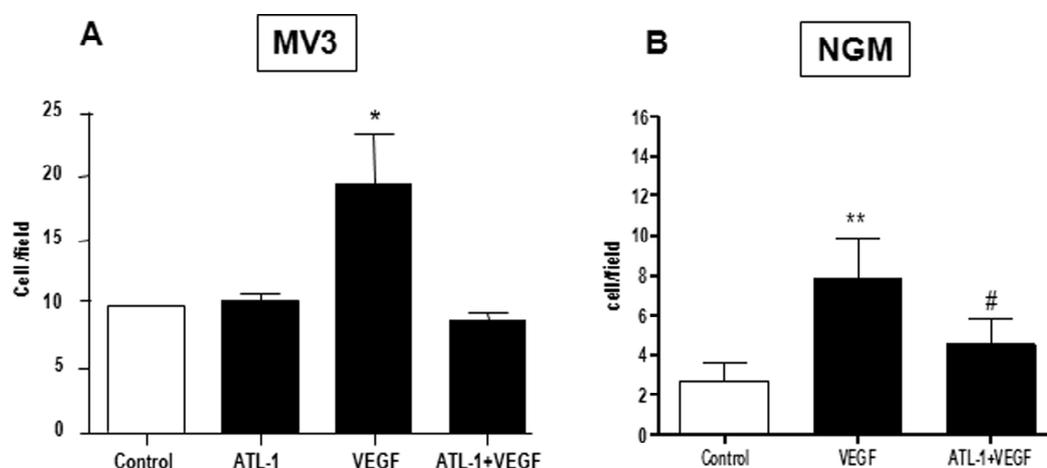
**Figure 5:** *ATL-1 inhibits long-term (18 hours) tumor transendothelial migration in the absence of exogenously added VEGF.* HUVEC ( $5 \times 10^4$ ) were grown to confluence onto porous inserts ( $8 \mu\text{m}$ ) and then pretreated or not with ATL-1 (100 nM) or EtOH (vehicle) for 30 minutes. After the treatment, MV3 melanoma cells ( $3 \times 10^4$ ) (A) or NGM melanocytes ( $3 \times 10^4$ ) (B) previously labeled with PKH126 vital fluorescent dye were incubated with endothelial monolayers for 18 hours. Cells were counted in a fluorescence microscope. Values represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments. \* $P < 0.05$ , when compared to control and EtOH groups.

FIGURE 6



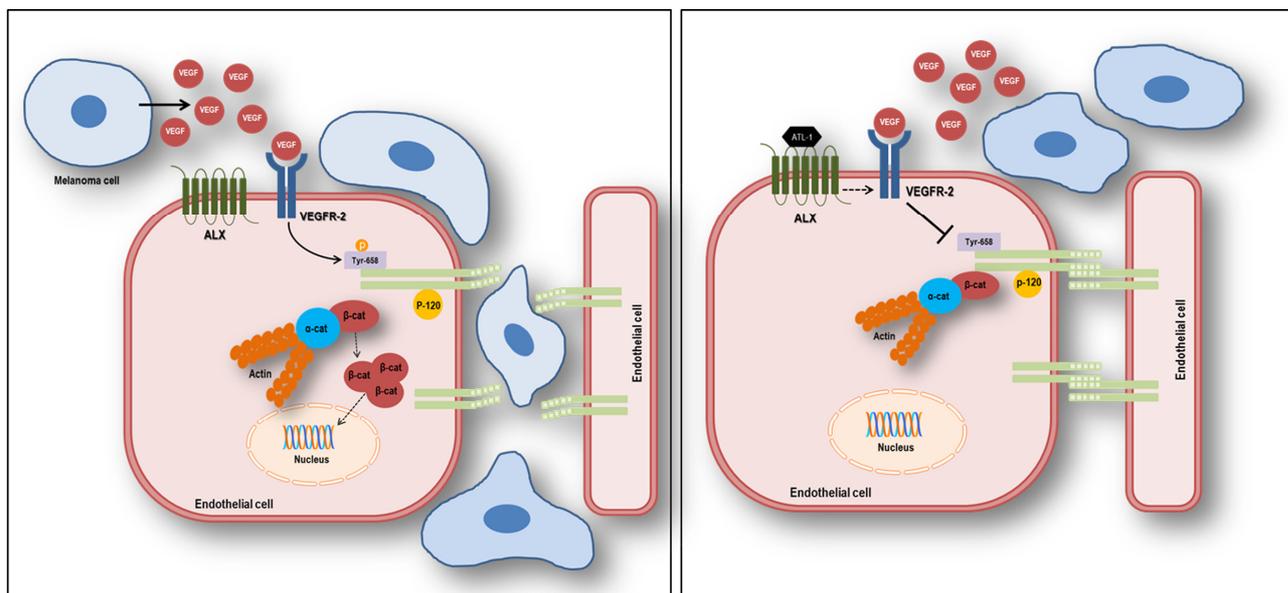
**Figure 6: VEGF quantification in cell conditioned media.** (A) Conditioned media collected from HUVEC, NGM and MV3 cells ( $2 \times 10^5$ ) at different times (4, 8, 16 and 24 hours) were analyzed using ELISA. Values represent mean and standard deviation of 3 similar and independent experiments. \* $P < 0.05$  as compared with HUVEC, NGM and the times 4 and 8 hours of MV3. (B) MV<sub>3</sub> cells ( $1 \times 10^6$ ) were cultured in 6 well plates and treated or not with ATL-1 (100 nM) or EtOH (vehicle) for 4 or 18 hours. Conditioned medium was collected and analyzed using ELISA. Results represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments.

FIGURE 7



**Figure 7: Effect of ATL-1 on the short-term migration (4 hours) of melanoma cells and melanocytes across endothelial monolayers, in response to exogenous VEGF addition.** HUVEC ( $5 \times 10^4$ ) were cultured in porous inserts ( $8 \mu\text{m}$ ) and pretreated or not with ATL-1 (100 nM) for 30 minutes before incubation with or without VEGF (10 ng/mL) for 1 hour. After the treatment, MV<sub>3</sub> cells ( $3 \times 10^4$ ) (A) or NGM cells ( $3 \times 10^4$ ) (B) previously labeled with PKH126 vital fluorescent dye were incubated with endothelial monolayers for 4 hours. Migrating tumor cells were counted in a fluorescence microscope. Values represent mean and standard deviation of three similar and independent experiments. \* $P < 0.05$  VEGF versus all the other groups; \*\* $P < 0.05$  for VEGF versus control and ATL1+VEGF groups; # $P < 0.05$  for ATL-1+VEGF versus control.

## Graphical Abstract



## 5. REFERENCES

- [1] Hanahan D, Weinberg RA (2011) The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- [2] Eger A, Mikulits W (2005) Models of epithelial–mesenchymal transition. *Drug Discov Today: Dis Models*. 2 57–63.
- [3] Bissell MJ, Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1:46–45.
- [4] Addison C (2006) Modulation of response to tumor therapies by the extracellular matrix. *Future Oncol*. 2(3):417-429.
- [5] Polyak K, Haviv I, Campbell IG (2009) Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet*. 25: 30–38.
- [6] Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 196:430-443.
- [7] Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*. 9:910-918.
- [8] Schnittler HJ (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol*. 93 Suppl 3:30-39.
- [9] Dejana E. (1996) Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest*. 98(9):1949-1953.

- [10] Alexander JS, Elrod JW (2002) Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 200(6):561-574.
- [11] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219(4587):983-985.
- [12] Koch, S Claesson-Welsh, L (2012) Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*;2:a006502.
- [13] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66–70.
- [14] Ferrara N, Gerber HP, LeVouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9:669-676.
- [15] Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.*111(Pt 13):1853-1865.
- [16] Küsters B, de Waal RM, Wesseling P, Verrijp K, Maass C, Heerschap A et al. (2003) Differential effects of vascular endothelial growth factor A isoforms in a mouse brain metastasis model of human melanoma. *Cancer Res.*63(17):5408-5413.
- [17] Weis SM, Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437:497–504.
- [18] Shtivelband MI, Juneja HS, Lee S, Wu KK (2003) Aspirin and salicylate inhibit colon cancer medium- and VEGF-induced endothelial tube formation: correlation with suppression of cyclooxygenase-2 expression. *J Thromb Haemost.* 1(10):2225-2233.
- [19] Wang D, Dubois RN (2004) Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol.* 31(1 Suppl 3):64-73.
- [20] Vane JR (2000) The mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 31:1-23.
- [21] Clària, J, CN Serhan (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:9475-9475.
- [22] Serhan CN, Takano T, Gronert K, Chiang N, Clish CB (1999) Lipoxin and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin cellular interactions anti-inflammatory lipid mediators. *Clin Chem Lab Med.* 37(3):299-309.
- [23] Chiang N, Takano T, Clish CB, Petasis NA, Tai HH, Serhan CN. (1998) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (ATL) generation by human leukocytes and murine peritonitis exudates: development of a specific 15-epi-LXA4 ELISA. *J Pharmacol Exp Ther.* 287(2):779-790.

- [24] Simões RL, Fierro IM (2005) Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog. *J Immunol.* 175(3):1843-1850.
- [25] Fierro IM, Kutok JI, Serhan CN (2002) Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration aspirin-triggered 15-R-lipoxin-A4 and lipoxin A4. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 300:385-392.
- [26] Cezar-de-Mello PFT, Vieira AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Fierro IM (2008) ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol.* 153:956-965.
- [27] Cezar-de-Mello PFT, Nascimento-Silva V, Villela CG, Fierro IM (2006) Aspirin-triggered lipoxin A4 inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene.* 25:122-129.
- [28] Baker N, O'Meara SJ, Scannell M, Maderna P, Godson C (2009) Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. *J Immunol.* 182(6):3819-3826.
- [29] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52(11):2745-2756.
- [30] van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ (1991) Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int. J. Cancer.* 48:85-91.
- [31] Ades EW; Candal FJ; Swerlick RA; George VG; Summers S; Bosse DC et al. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 99(6):683-690.
- [32] Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- [33] Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER, (2011) Stromal Endothelial Cells Directly Influence Cancer Progression. *Sci Transl Med.* 3(66):66ra5.
- [34] Folkman J (2006) Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 57:1-18.
- [35] van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW (2008) Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nat Protoc.* 3:1085-1091.
- [36] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature.* 454: 436-444.
- [37] Fierro IM (2005) Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73:271-275.
- [38] Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D (2004) Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell Biol.* 167: 223-229.

- [39] Tinsley JH, Wu MH, Ma W, Taulman AC, Yuan SY (1999) Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274:24930–24934.
- [40] Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ (2000) SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J. Biol. Chem.* 275:5983–5986.
- [41] Gavard J, Gutkind JS (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8:1223–1234.
- [42] Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994) Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 127:1375–1380.
- [43] McLachlan RW, Yap AS (2007) Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *J Mol Med.* 85:545 – 554.
- [44] Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, Lilien J, Balsamo J (2007) Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol.* 9:883–892.
- [45] Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kim HW, Hilenski L, Patrushev NA, Zhang L et al. (2006) IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;26(9):1991-1997.
- [46] Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim biophys Acta* 1778:660-669.
- [47] Gavard J (2009) Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Letters* 583:1–6.
- [48] Gavert N, Ben-Ze'ev A (2007) A beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem.*102:820-828.
- [49] Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E et al. (2003) Beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 63: 3145-3153.
- [50] Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.*121:2115-2122.
- [51] Potter MD, Barbero S, Cheresch DA (2005) Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 280(36):31906-31912.
- [52] Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S et al. (2012) Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun.*3:1208.

- [53] Adam AP, Sharenko AL, Pumiglia K, Vincent PA (2010) Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *J Biol Chem.* 285(10):7045-7055.
- [54] Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G et al. (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J.* 21(18):4885-4895.
- [55] Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C et al. (2014) Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol.* 2014; 204(2):247-263.
- [56] García-Román, Zentella-Dehesa (2013) Vascular permeability changes involved in tumor metastasis. *Cancer Lett.* 335(2):259-269.
- [57] Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK et al. (1995) Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res.* 55(2):360-368.
- [58] Liu CD, Tilch L, Kwan D, McFadden DW (2002) Vascular endothelial growth factor is increased in ascites from metastatic pancreatic cancer. *J Surg Res.* 102(1):31-34.
- [59] Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, Maru Y, Fukumura D, Duda DG et al. (2011) Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(9):3725-3730.
- [60] Arias-Pulido H, Chaher N, Gong Y, Qualls C, Vargas J, Royce M. (2012) Tumor stromal vascular endothelial growth factor A is predictive of poor outcome in inflammatory breast cancer. *BMC Cancer.* 19;12:298.
- [61] Claffey KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo KT, Manseau EJ et al. (1996) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 56:172–181.
- [62] Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN (2011) Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 86(10):981-90.
- [63] Chen Y, Hao H, He S, Cai L, Li Y, Hu S et al. (2010) Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor growth of transplanted H22 in mice: the role of anti-angiogenesis *Mol Cancer Ther* 9:2164-2174
- [64] Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresch DA (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4:915– 924.

Na segunda etapa deste estudo, foram investigados os efeitos da interação de células endotélias com a matriz extracelular produzida por células de melanoma e a ação do ATL-1 sobre o endotélio nestas condições.

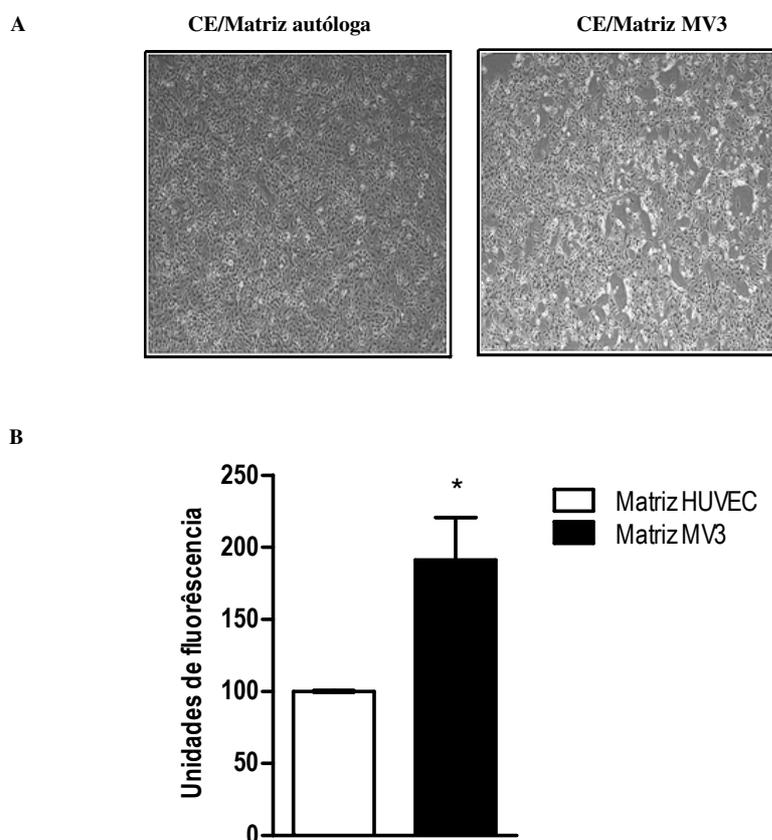
#### **4.2 A matriz produzida por células de melanoma altera a permeabilidade endotelial**

A MEC é definida como uma mistura complexa de proteínas, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas que proporcionam um suporte estrutural, bioquímico e mecânico às células e tecidos. As proteínas da MEC atuam cooperativamente regulando uma variedade de processos celulares, tanto positiva como negativamente (Hynes, 2009).

Cada tipo celular apresenta receptores de superfície específicos para o seu ambiente tecidual, e a interação destes receptores com componentes MEC influencia a forma da célula, o comportamento e a resposta a moléculas solúveis, como citocinas e fatores de crescimento (Lin e Bissell, 1993). A MEC produzida pelo tumor é um componente chave do microambiente tumoral e está em contato imediato com as células presentes neste estroma modificado (Barkan e col., 2010).

Como a interação da MEC tumoral com células endoteliais neste microambiente é um alvo de nosso estudo, decidimos investigar quais seriam os efeitos que uma matriz tumoral efetivamente exerceria sobre a permeabilidade endotelial, um passo primário para o escape e colonização de outros tecidos. Para isso, foram obtidas formas imobilizadas das matrizes secretadas por uma linhagem tumoral e por células endoteliais primárias. HUVECs foram plaqueadas sobre estas matrizes por 24 horas. Percebemos o início de aparecimento de espaços na monocamada quando as CE são semeadas sobre matriz de MV3 (fig 13-A) nesta condição, as células endoteliais apresentaram uma maior permeabilidade quando comparado à sua própria matriz (Fig. 13-B), o que indica que o estroma produzido por células tumorais contribui para o comprometimento da função de barreira do endotélio vascular.

Figura 13 - A matriz produzida por células de melanoma altera a permeabilidade endotelial



Legenda: (A) HUVEC ou MV3 foram cultivadas em placas de 24 poços por 72 horas e depois as matrizes secretadas foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $2 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. Imagem representativa da monocamada em aumento de 40x. (B) HUVEC ou MV3 foram cultivadas em insertos de transwell ( $0,4 \mu\text{m}$ ) por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas. HUVEC ( $5 \times 10^4$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. O meio foi removido e foi adicionado Dextran-FITC ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) na câmara superior por 1 hora, e o extravasado para o poço foi coletado. A fluorescência foi medida com leitor de placas *EnVision<sup>TM</sup>*. A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde  $*P < 0,05$ .

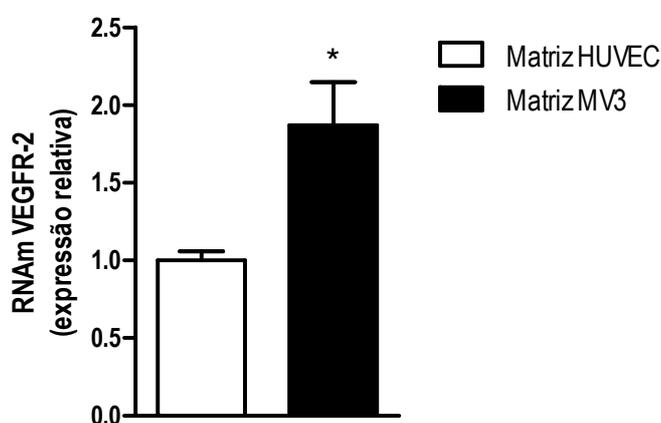
#### 4.3 A matriz tumoral induz a expressão de fatores permeabilizantes em HUVECs

Estudos prévios já mostraram que a MEC tumoral apresenta uma composição proteica alterada e assim pode influenciar as respostas celulares pela expressão de fragmentos pró- e antiangiogênicos (Pupa e col., 2002; Lu e col., 2012). Assim, a MEC poderia funcionar como um agente potencialmente oncogênico, direcionando a tumorigenicidade em células do estroma, como as células endoteliais, mesmo na ausência das células tumorais propriamente

ditas.

Os tumores se desenvolvem através de mecanismos semelhantes aos utilizados durante a organogênese (Ruoslahti, 2002). O VEGF é um potente fator hiperpermeabilizante e pró-angiogênico que, através da sua ligação ao receptor VEGFR-2, é capaz de promover o crescimento tumoral e a metástase. Em nossos estudos observamos uma produção sustentada de VEGF pelas células tumorais (Artigo 4.1). Deste modo, avaliamos se a matriz produzida pelo melanoma poderia regular a resposta endotelial através da modulação de genes envolvidos com a resposta angiogênica. Para tal, HUVECs foram plaqueadas sobre a MEC produzida pelo melanoma. Após 24 horas, foi realizada a extração e análise da expressão molecular do RNAm para o VEGFR-2 (KDR). As células endoteliais expressaram níveis significativamente maiores de RNAm para este receptor quando em contato com a MEC tumoral (Fig. 14), sugerindo que a MEC pode modular positivamente a resposta do endotélio ao VEGF.

Figura 14 - Aumento da expressão de VEGFR-2 induzido pela matriz tumoral

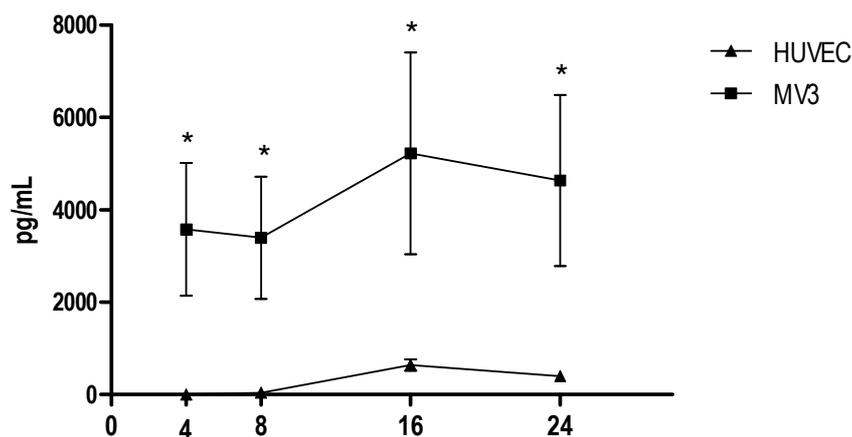


Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em duplicata em placas de 6 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $5 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. As amostras de RNA foram retro-transcritas em DNA complementar. O cDNA foi amplificado com o uso de primers para VEGFR-2. O nível de expressão foi normalizado contra o GAPDH. A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde  $*P < 0,05$ .

A interleucina (IL)-8, também conhecida com CXCL8, é uma quimiocina pró-inflamatória da família CXC frequentemente co-expressa com o VEGF em tumores, embora inicialmente caracterizada por suas ações durante a resposta inflamatória e imune (Mukaida e col., 1991; Waugh e Wilson, 2008). A IL-8 exerce seus efeitos através da ligação a dois receptores de membrana acoplados a proteína G, o CXCR-1 e CXCR-2 (Holmes e col., 1991). O aumento dos níveis desta citocina foi detectado em vários tipos de tumores, como câncer de mama (Benoy e col., 2004), glioblastoma (Desbaillets e col., 1997) e melanoma (Zhang e col., 2011). Um estudo de Dwyer e colaboradores, em 2012, mostrou que a IL-8 produzida por células de linhagem de glioblastoma foi capaz de induzir, via CXCR-2, o aumento da permeabilidade em células endoteliais de microvasculatura cerebral, uma ação mediada pelo remodelamento de VE-caderina.

Para avaliar se a linhagem de melanoma MV3 ou as células endoteliais (HUVECs) secretam IL-8, coletamos o meio condicionado destas células por 4, 8, 16 e 24 horas e realizamos o ensaio de ELISA para detecção da citocina nos sobrenadantes. Como mostrado na figura 15, a linhagem MV3 secreta níveis elevados de IL-8 quando comparada às HUVECs.

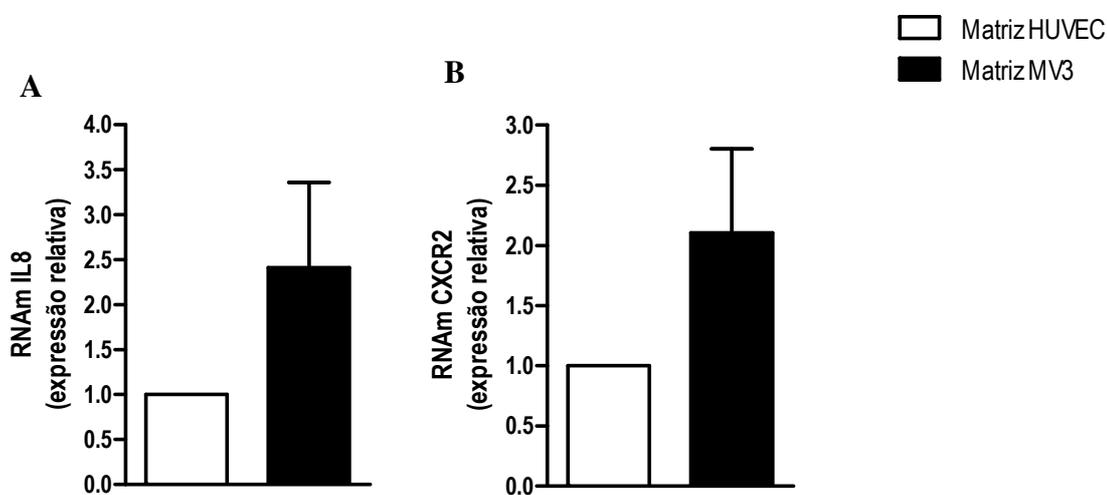
Figura 15 - Secreção de IL-8 por HUVEC e MV3



Legenda: Meio condicionado de células HUVEC e MV3 ( $5 \times 10^4$ ) foi coletado em diferentes tempos e analisado usando kit ELISA. A média e o desvio padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde  $*P < 0,05$ .

Uma vez que as células tumorais secretam IL-8, uma citocina que apresenta propriedades pró-angiogênicas e permeabilizantes, investigamos se a matriz produzida pela linhagem MV3 poderia modular a produção de IL-8 ou de seu receptor nas células endoteliais. Para isso, analisamos a expressão molecular do RNAm para IL-8 e CXCR-2 em HUVECs após 24 horas de contato com sua matriz nativa ou com a matriz tumoral. Observamos que existe uma tendência de aumento da expressão, tanto da IL-8 quanto do receptor CXCR-2, pelas células endoteliais (Fig. 16) após a adesão sobre a matriz tumoral, o que sugere que vasos produzidos na presença de um estroma reativo estariam mais responsivos a fatores angiogênicos.

Figura 16 - O contato com matriz tumoral induz a expressão de IL-8 e CXCR-2 em células endoteliais



Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em duplicata em placas de 6 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $5 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. As amostras de RNA foram retro-transcritas em DNA complementar. O cDNA foi amplificado com o uso de primers para IL-8 (A) ou CXCR-2 (B). O nível de expressão foi normalizado contra o GAPDH. A média e erro padrão representam 2 experimentos idênticos e independentes.

#### 4.4 ATL-1 inibe a produção de óxido nítrico em HUVECs estimuladas pela matriz tumoral

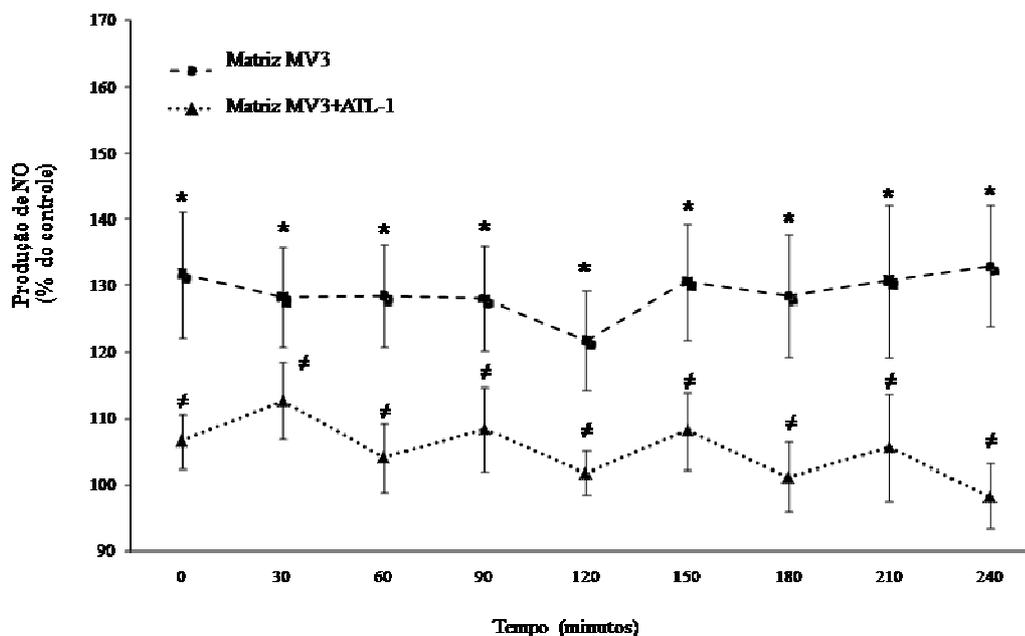
O NO é um radical livre e um importante mediador de processos intra e extracelulares, apresentando um papel central em uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos (Guzik e col., 2003). O NO pode ser gerado através de três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): a NOS neuronal (nNOS) ou NOS1, a NOS induzida (iNOS) ou NOS2 e a NOS endotelial (eNOS) ou NOS3, sendo a eNOS expressa constitutivamente no endotélio (Knowles e Moncada, 1994).

A expressão da NOS por células tumorais foi observada em câncer de mama, cólon, pulmão e melanoma (Fitzpatrick e col., 2008). Em melanoma e outros tipos de câncer, a atividade da NOS foi associada ao crescimento tumoral (Massi e col., 2001; Xie e Huang, 2003; Ellerhorst e col., 2006), transformação maligna (Fukumura e col., 2006; Palmieri e col., 2009), angiogênese (Palmieri e col., 2009) e resistência à apoptose (Salvucci e col., 2001).

Fatores como VEGF, angiopoietinas e a força de cisalhamento podem estimular a liberação de NO pelas CE (Sessa, 2004). Todavia, a produção de NO induzida por VEGF é praticamente abolida em camundongos *knockout* para eNOS, resultando na redução da permeabilidade vascular (Fukumura e col., 2001), o que sugere um *feedback* entre estas vias. Além disso, a expressão constitutiva de iNOS foi detectada em melanomas metastáticos e em células de linhagem de melanoma (Ekmekcioglu e col., 2000; Ekmekcioglu e col., 2003).

Deste modo, avaliamos a secreção de NO em CE crescidas sobre a matriz produzida pelo melanoma e o efeito do ATL-1 neste contexto. Para tal, as HUVECs foram plaqueadas sobre a matriz produzida por MV3 ou sua matriz nativa e os grupos foram tratados ou não com ATL-1 (100 nM). Após 24 horas, monitoramos a produção de NO em intervalos de 30 minutos, por 4h. Como podemos observar, as CE em contato com a matriz tumoral produziram níveis significativamente maiores de NO (Fig. 17) quando comparadas a matriz nativa (controle), um aumento sustentado por todo o tempo avaliado. Já o tratamento com ATL-1 reduziu de forma significativa a produção de NO. Esses achados corroboram dados recentes mostrando que o ATL-1 inibe a produção de NO induzido por LPS em um modelo neuro-inflamatório (Wang e col., 2011; Yao e col., 2014).

Figura 17 - ATL-1 inibe a produção de óxido nítrico em HUVECs estimuladas pela matriz tumoral



Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em quadruplicata em placa escura de 96 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $5 \times 10^4$ ) foram incubadas por 24 horas sobre as matrizes imobilizadas. As células foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM). Em seguida, as células foram incubadas com a sonda DAF-FM DA por 1 hora. A produção de NO foi avaliada através da fluorescência, que foi monitorada em intervalos de 30 minutos, após incubação de até 4h, pela excitação em 495nm e emissão em 515nm no fluorímetro (*Envision<sup>TM</sup>*). A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde \* $P < 0,05$  em relação ao controle e <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo MV3.

#### 4.5 A expressão de moléculas de adesão é induzida pela matriz tumoral e inibida pelo ATL-1

A metástase tumoral é um processo complexo que ocorre através de uma sequência de eventos que incluem a evasão do foco primário, intravasamento na circulação e extravasamento em sítios distantes. Poucas células do grande número que se desprendem do foco primário conseguem efetivamente colonizar focos secundários (Steeg, 2006). Dentre as barreiras enfrentadas pelas células tumorais durante a metástase, a adesão ao endotélio e transmigração para o espaço extravascular são considerados eventos críticos e limitantes (Chambers e col., 2002).

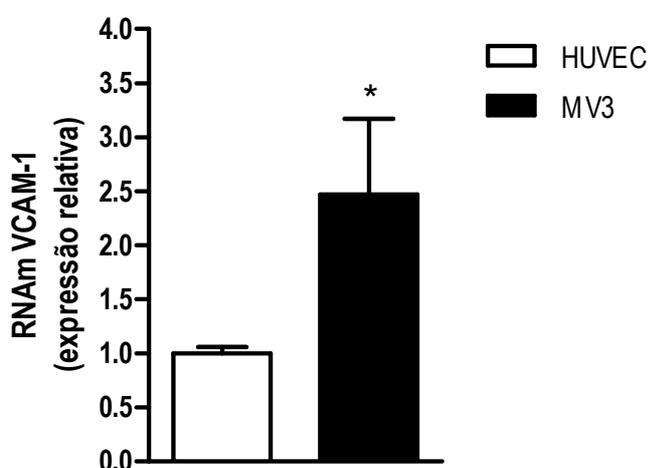
Dentre os mecanismos possíveis pelos quais as células tumorais aderem e transmigram pelo endotélio, já foi visto que certas células tumorais podem extravasar por rotas paracelulares através da indução de *gaps* nas CE, de maneira similar à migração leucocitária durante a resposta inflamatória (Chambers e col., 1995). Estudos prévios demonstraram a interação entre a integrina  $\alpha_4\beta_1$  e a molécula de adesão ao endotélio vascular (VCAM)-1 durante a adesão ao endotélio e metástase de células de melanoma (Giavazzi e col., 1993; Sandig e col., 1997; van Wetering e col., 2003; Liang e col., 2008) e este evento foi relacionado à agressividade e metástase do melanoma (Melchiori e col., 1995).

Tendo como objetivo avaliar o efeito da matriz tumoral sobre a expressão da VCAM-1 no endotélio, analisamos a expressão molecular do RNAm para esta molécula em HUVECs após 24 horas de contato com sua matriz nativa ou a matriz tumoral. Na figura 18 podemos notar que a interação com a matriz produzida pelo melanoma induziu um aumento significativo na produção do RNAm para VCAM-1, sugerindo que células endoteliais em contato com o estroma reativo se tornariam mais permissíveis à adesão celular.

As LX apresentam a capacidade de modular as interações PMN-endotélio ou -epitélio (Colgan e col., 1993; Papayianni e col., 1996), possivelmente por sua capacidade de modular a expressão de moléculas de adesão como a L-selectina (Filep e col., 1999). A fim de avaliar se o ATL-1 exerceria algum efeito sobre a expressão de VCAM-1 observada nas células endoteliais em contato com a matriz tumoral, após 24 de interação realizamos o tratamento da monocamada com o ATL-1 (100 nM) por 1 hora. Em seguida, realizamos um ensaio de imunocitoquímica para marcação de VCAM-1. Assim como observado para o RNAm (Fig. 18), a monocamada em contato com a matriz tumoral apresenta uma maior marcação para

VCAM-1 (Fig. 19) quando comparada às células em contato com a matriz nativa. Podemos perceber também um efeito inibitório do ATL-1, visto que o grupo que interagiu com a matriz tumoral, quando tratado com o análogo, apresenta uma marcação mais fraca para VCAM-1 (Fig. 19).

Figura 18 - A interação com a matriz do melanoma induz a expressão de VCAM-1

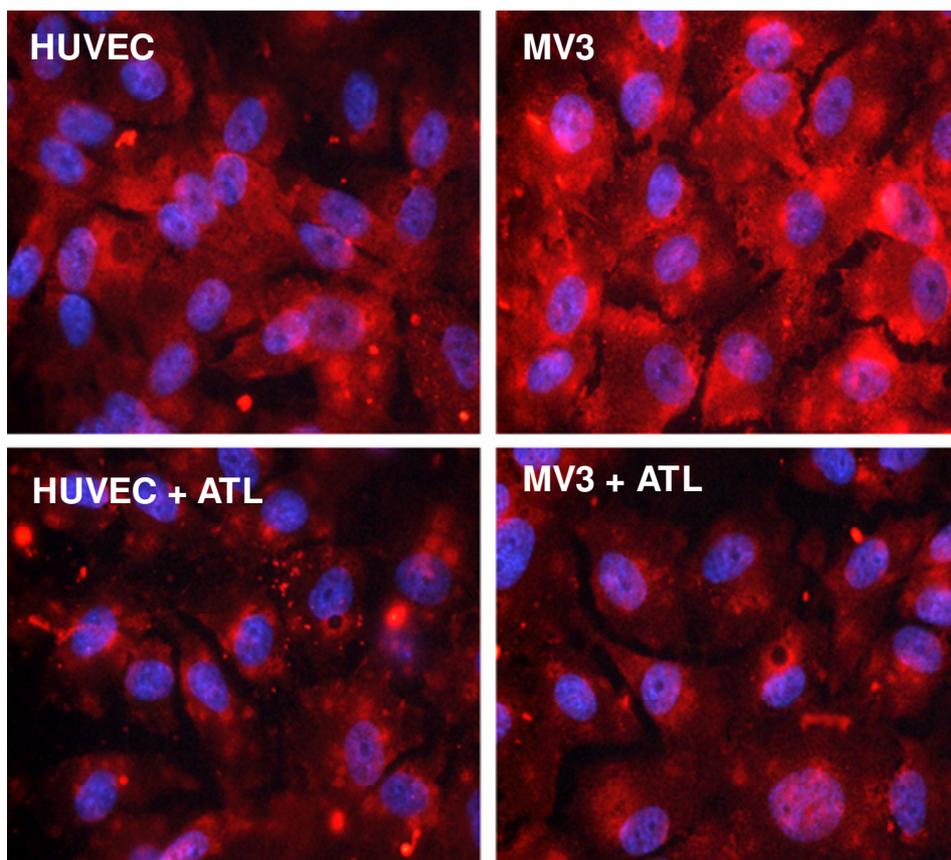


Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em duplicata em placas de 6 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas de acordo com descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $5 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. As amostras de RNA foram retro-transcritas em DNA complementar. O cDNA foi amplificado com o uso de primers para VCAM-1. O nível de expressão foi normalizado contra o GAPDH. A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde  $*P < 0,05$ .

Ainda, avaliar a hipótese de que as CE em contato com o estroma se tornariam mais permissíveis à adesão celular realizamos um ensaio de adesão com células mononucleares. Para isso, CE foram plaqueadas sobre a matriz tumoral ou sua matriz autóloga por 24 horas. Estas células foram ativadas ou não com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) por 4 horas. Células mononucleares humanas pré-ativadas ou não com Concanavalina A (ConA - 2  $\mu$ g/mL) e marcadas com fluorocromo vermelho foram incubadas sobre a monocamada por 45 minutos. Conforme mostrado na figura 20, em todas as condições experimentais observa-se uma tendência de maior adesão das células ao endotélio sensibilizado pela matriz tumoral. Contudo, esse aumento só foi estatisticamente significativo nas condições onde tanto o

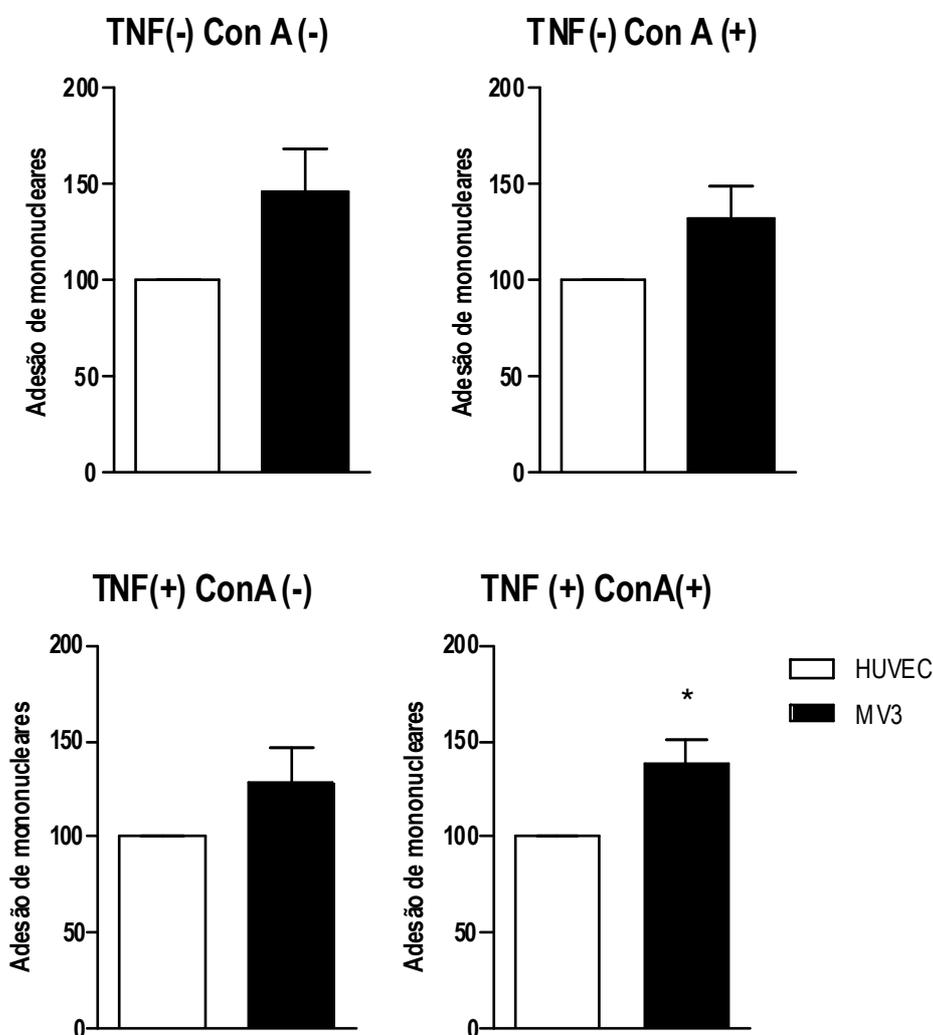
endotélio, quanto os monócitos, encontravam-se ativados, respectivamente, pelo TNF- $\alpha$  e pela Con A. O efeito do análogo sobre a adesão celular encontra-se sob investigação.

Figura 19 - ATL-1 inibe a expressão de VCAM-1 em HUVECs em contato com a matriz tumoral



Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em placas de 24 poços por 72 horas e depois as matrizes secretadas foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $2 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. As células foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) por 1 hora. A monocamada foi fixada com paraformaldeído 4% / sacarose 4% por 20 minutos. Em seguida foram incubadas com BSA 5% por 30 minutos e anticorpo anti-V-CAM-1 (1:400) overnight a 4°C em câmara úmida e escura. A incubação com anticorpo secundário anti-IgG conjugado à biotina (1:400) foi realizada durante 1 hora, seguida pela incubação com Alexa Fluor® 555 (1:400) por 1 hora. O núcleo foi marcado com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 1 minuto. A epifluorescência foi observada ao microscópio de fluorescência invertido. As imagens foram analisadas usando o programa *Adobe Photoshop*. Imagem representativa de 3 experimento individuais e semelhantes.

Figura 20 - Adesão de células mononucleares à monocamada endotelial



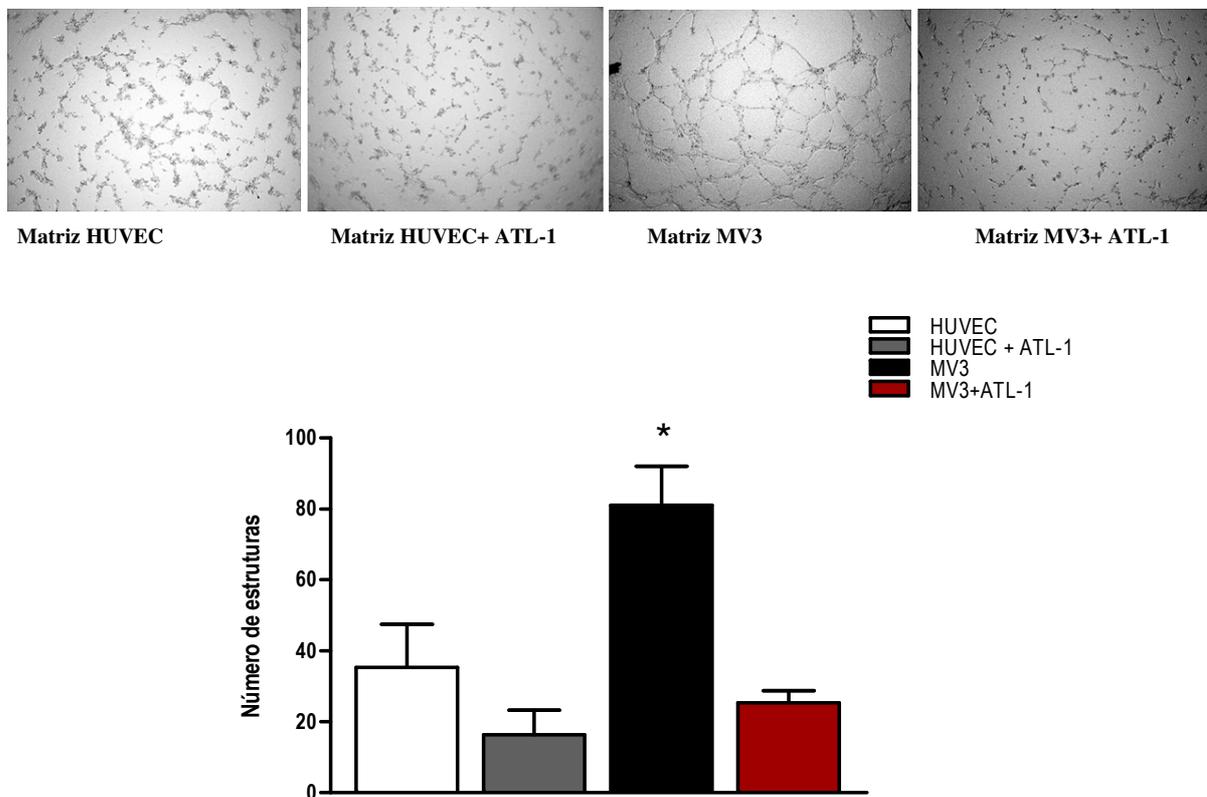
Legenda: HUVEC ou MV3 foram cultivadas em placas de 24 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram obtidas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $2 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. Os poços foram lavados e as HUVECs foram incubadas ou não por 4 horas com TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). As células mononucleares marcadas com fluorocromo vermelho (PKH-26), ativadas ou não com ConA (2  $\mu$ g/mL) e plaqueadas sobre a monocamada endotelial ( $2 \times 10^5$ ). A interação ocorreu durante 45 minutos, os poços foram lavados e fixados. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido. A quantificação das células mononucleares se deu através da contagem de 10 campos aleatórios em aumento de 400x. A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde \* $P < 0,05$ .

#### **4.6 O tratamento da monocamada endotelial com ATL-1 inibiu a tubulogênese *in vitro* induzida pela interação com a matriz tumoral**

Melanomas têm sido relatados como tumores angiogênicos, claramente demonstrando a formação de novos vasos como um passo importante para a progressão da doença (Emmett e col., 2011). Erhard e colaboradores (1997) correlacionaram a produção de VEGF e o aumento da angiogênese com a transição da fase de crescimento radial, que apresenta um potencial metastático baixo, para a fase de crescimento vertical, mais agressiva, sugerindo um link entre a angiogênese e a metástase.

Tendo em vista esta característica apresentada por melanomas, decidimos avaliar a capacidade que a matriz produzida por MV3 teria de induzir a formação de vasos *in vitro* e um possível efeito antiangiogênico do ATL-1. Para isso, HUVECs que estiveram sobre a matriz de MV3 ou sua matriz autóloga por 24 horas foram tratadas com ATL-1 (100 nM) por 1 hora. Em seguida, estas células foram descoladas do poço com tripsina e colocadas sobre o matrigel por 5 horas. Após a contagem das estruturas similares a tubos, observamos que a matriz produzida por células de melanoma MV3 é altamente reativa e por si só induz significativamente a diferenciação de HUVEC, ao passo que o tratamento com ATL-1 claramente inibe esta ação (Fig. 21), sugerindo que o ATL-1 possa ser uma potente ferramenta antiangiogênica e anti-metastática.

Figura 21 - O tratamento da monocamada endotelial com ATL-1 inibiu a tubulogênese *in vitro* induzida pela interação com a matriz tumoral



Legenda: HUVECs ou MV3 foram cultivadas em duplicata em placas de 6 poços por 72 horas, após o que as matrizes foram extraídas de acordo com descrito em Materiais e Métodos. HUVEC ( $5 \times 10^5$ ) foram adicionadas sobre as matrizes por 24 horas. As células foram tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) por 1 hora. As células endoteliais aderidas nas diferentes matrizes foram tripsinizadas, contadas e adicionadas em triplicata sobre o Matrigel<sup>®</sup>, durante 5 horas. A média e erro padrão representam 3 experimentos idênticos e independentes, onde  $*P < 0,05$  comparado aos demais grupos. Imagem representativa de 3 experimento individuais e semelhantes. Imagem representativa de 3 experimento individuais e semelhantes

## 5 DISCUSSÃO

Em contraste com a visão histórica, porém reducionista, de que tumores representam apenas um conjunto de células transformadas com proliferação excessiva, há cada vez mais evidências mostrando que interações heterotípicas entre as células tumorais e o estroma adjacente estão associadas à expressão de fenótipos mais malignos (Hanahan e Weinberg, 2000; Bissell e Radisky, 2001; Franses e col., 2011).

A vascularização é essencial para o desenvolvimento do câncer, assegurando a perfusão da massa tumoral e a manutenção do microambiente (Folkman, 2006). As CE são as primeiras células em contato com qualquer elemento presente na vasculatura e prevalentes nos tumores (van Beijnum e col., 2008). A importância da angiogênese para o crescimento tumoral foi inicialmente levantada em 1972, com a observação de Folkman de que os tumores sólidos possuem recursos limitados. Neste ambiente, as células tumorais estimulam o surgimento de novos vasos a partir da vasculatura estabelecida, criando uma rede vascular dentro do tumor, que permite a obtenção de oxigênio e nutrientes para sua sobrevivência e multiplicação e facilita o escape do foco de instalação primária. Sendo assim, o estudo da vascularização tumoral representa a possibilidade de novas ferramentas para a terapia contra o câncer (Ferrara, 2002; Folkman, 2006).

O VEGF é o principal e mais potente indutor da angiogênese. Estudos indicam que este fator pode induzir a formação de vasos sanguíneos tumorais e ainda estimular a proliferação e migração em vários de modelos de câncer, como o pancreático, mieloma e câncer de mama, em cobaias e pacientes (Dineen e col., 2008; Tarhouny e col., 2008; Yang e col., 2009). Um estudo verificou níveis alterados de VEGF em pacientes em estágio inicial de câncer de mama e colo-retal quando comparados com voluntários sadios (Zaman e col., 2006). Enquanto os voluntários mostravam, em média, níveis plasmáticos de 37,6 µg/mL de VEGF, os pacientes com câncer de mama apresentaram concentrações plasmáticas médias de 52,9 µg/mL e pacientes com câncer colo-retal uma média de 109,6 µg/mL. Estes mesmos pacientes foram submetidos a cirurgia para extirpação de seus tumores primários e, entre seis e sete semanas pós-cirurgia, registrou-se uma diminuição nos níveis plasmáticos de VEGF (Zaman e col., 2006). Esta evidência mostra o efeito direto que a malignidade tem sobre fatores importantes para angiogênese.

O papel da inflamação na carcinogênese tem sido amplamente investigado. A transcrição imprópria de genes que codificam mediadores inflamatórios, fatores de sobrevivência e proteínas angiogênicas e metastáticas é um evento molecular chave na ligação entre inflamação e câncer (Kundu e Surh, 2012). Além disso, a estreita associação ou co-dependência entre a inflamação crônica e a angiogênese em várias doenças humanas, incluindo o câncer, vem sendo amplamente descrita (Mantovani e col., 2008; Hanahan & Weinberg, 2011). A compreensão das vias inflamatórias envolvidas no câncer pode contribuir para terapias alvo antitumorais.

As LX, ATL e seus análogos sintéticos vêm se destacando como mediadores lipídicos que, além das ações anti-inflamatórias e de pró-resolução (Serhan, 2007), possuem ações antiangiogênicas (Fierro, 2005; Cezar-de-Mello, 2006; 2008; Baker e col., 2009). O aumento da permeabilidade e a migração das CE são eventos primordiais para a promoção da angiogênese. Cezar-de-Mello e colaboradores (2006), analisando mecanismos moleculares envolvidos no efeito inibitório do ATL-1 sobre migração de CE, demonstraram que o análogo modula o rearranjo do citoesqueleto de actina e adesões focais.

Agentes patogênicos, como o *Toxoplasma gondii*, que expressam 15-LO, podem induzir níveis elevados de LX no soro do hospedeiro, auxiliando o escape do sistema imune (Bannenber e col., 2004; Machado e Aliberti, 2006). Adicionalmente, verificou-se que o crescimento tumoral foi inibido, concomitantemente com a supressão da angiogênese, durante a infecção aguda pelo *Toxoplasma gondii* em camundongos (Hunter e col., 2001; Kim e col., 2007). Esta observação sugere que as LX podem estar envolvidas na angiogênese tumoral, entretanto os mecanismos envolvidos neste processo ainda são desconhecidos.

Na primeira fase deste estudo, investigamos a interação da rede vascular com o microambiente tumoral, onde há uma acentuada produção de VEGF, e o papel do ATL-1 como um agente anti-metastático. Em nosso estudo, demonstramos, pela primeira vez, que o pré-tratamento de CE com o ATL-1 inibe o aumento da permeabilidade, a ação mais proeminente do VEGF.

A possibilidade de controlar a permeabilidade vascular representa uma série de implicações terapêuticas, uma vez que o extravasamento vascular contribui para o aumento da pressão intersticial comum em vários tumores sólidos (Weis e Chersesh, 2005). A pressão intersticial elevada gera zonas isquêmicas na massa tumoral, prejudicando a ação de medicamentos intravenosos, além de facilitar a penetração e disseminação metastática (Dejana e col., 2008). O extravasamento vascular provocado pelo VEGF é ainda responsável

pela formação de uma matriz provisional rica em fibrina e fibronectina, que favorece a angiogênese nos tecidos, em oposição ao efeito angiostático de uma lâmina basal íntegra, nos vasos quiescentes (Dvorak e col., 1983; Davis e Senger, 2005).

Apesar do dano local causado por tumores primários, eles são responsáveis por apenas 10% de todas as mortes relacionadas ao câncer, enquanto os outros 90% devem-se às metástases (Spano e col., 2012). Evidências experimentais destacam a importância crítica do aumento da permeabilidade vascular para o extravasamento de células tumorais.

Em nosso estudo, observamos que a inibição da permeabilidade pelo pré-tratamento com o ATL-1 foi resultado da manutenção das JA, uma vez que a ativação do receptor do VEGF reduziu a expressão de VE-caderina e  $\beta$ -catenina na membrana celular, o que foi prevenido quando as células foram pré-tratadas com o análogo.

A fosforilação em tirosina de proteínas presentes nas JA tem sido correlacionada com o afrouxamento das junções mediadas por caderinas em vários tipos celulares (Hoschuetzky e col., 1994; McLachlan e Yap, 2007; Rhee e col., 2007). Mostramos que o pré-tratamento com o ATL-1 reduziu a fosforilação no resíduo Try<sup>658</sup> induzida pelo VEGF, o que está de acordo com estes achados.

Diferentes estudos indicam que as quinases da família Src estão envolvidas no aumento da permeabilidade induzida pelo VEGF (Eliceiri e col., 1999; Weis e col., 2004) devido à fosforilação direta da VE-caderina (Adam e col., 2010). Outra proteína envolvida no efeito permeabilizante do VEGF é a FAK, sua inibição farmacológica previne a permeabilidade e a angiogênese associadas ao VEGF (Weis e col., 2008; Chen e col., 2012). A diminuição da expressão ou da atividade da FAK em CE em cultura reduziu a fosforilação do resíduo Try<sup>658</sup> da VE-caderina (Zhao e col., 2010; Jean e col., 2014). Nosso grupo demonstrou previamente que o ATL-1 é capaz de reduzir a migração de CE estimuladas com VEGF pelo bloqueio de FAK (Cezar-de-Mello e col., 2006), o que nos leva a sugerir que o efeito anti-permeabilizante apresentado pelo ATL-1 poderia ser resultado da inibição de FAK.

O aumento da fosforilação da VE-caderina também pode ser resultado da inibição de proteínas tirosina fosfatase (PTP) (Nawroth, 2002). Ukropec e colaboradores (2000) mostraram que a trombina aumenta a associação da VE-caderina com a SHP-2. Em trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que o ATL-1 induziu a ativação e associação da fosfatase SHP-1 ao VEGFR-2 (Cezar-de-Mello e col., 2008). A modulação da ação de fosfatases associadas à VE-caderina poderia ser outro mecanismo do efeito anti-permeabilizante deste análogo, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A inibição da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina induzida pelo VEGF após o pré-tratamento com o ATL-1 indica um possível mecanismo do ATL-1 sobre a atividade metastática. A  $\beta$ -catenina, uma vez no núcleo, pode induzir a expressão de enzimas proteolíticas com as metaloproteinase, ou ainda de genes alvo envolvidos com a migração e proliferação e com o ciclo celular (Easwaran e col., 2003).

Em condições fisiológicas normais, a  $\beta$ -catenina liberada no citosol é fosforilada pela glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) sendo ubiquitinizada e posteriormente degradada (Aberle e col, 1997). A GSK-3 é uma proteína quinase serina / treonina, que regula a diferenciação e proliferação em diversos tecidos (Cohen e col., 2001). As GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  são codificadas por genes diferentes, contudo possuem uma homologia de 85% em sua sequência de aminoácidos. A estimulação da GSK-3 $\beta$  desempenha um papel importante na angiogênese através do controle da migração e diferenciação das CE (Kim e col., 2002). A inativação de GSK-3 $\beta$  e a translocação nuclear de  $\beta$ -catenina foram observadas após o estímulo com VEGF em diferentes estudos, ação que envolve a via de sinalização PI3-K/AKT e membros da família p38 MAPK (Kim e col., 2002; Skurk e col., 2005; Yang e col., 2012). Diferentemente de outras quinases, a GSK-3 $\beta$  é constitutivamente ativa em condições basais, e quando é fosforilada perde sua atividade. Assim, a  $\beta$ -catenina escapa da ubiquitinação, acumula-se no citoplasma e transloca para o núcleo onde age como co-ativadora de fatores transcricionais como o Tcf/Lef (do inglês *T cell factor/lymphoid enhancing factor*) (Yang, 2012).

Contudo, acreditamos que o efeito do análogo se deve à manutenção estrutural da JA já que o tratamento de HUVECs com VEGF induziu a fosforilação de GSK-3 $\beta$  no resíduo de serina 9, o que possivelmente causou o acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo, um efeito que não foi alterado pelo pré-tratamento com o ATL-1 (Apêndice 1).

Como mostrado em revisão por Koch e colaboradores, em 2011, a atividade do VEGFR-2, o principal receptor envolvido nas ações do VEGF, é altamente complexa (Fig. 7), com diferentes sítios de fosforilação passíveis de regulação. Estudos anteriores mostraram que a ligação da LXA<sub>4</sub> e do ATL-1 ao seu receptor cognato leva à inibição do VEGFR-2 (Cezar-de-Mello e col., 2008), por inibição do resíduo Tyr<sup>1175</sup> (Baker e col., 2009). A ativação do VEGFR-2 leva à consequente ativação da fosfolipase (PL)C $\gamma$ , que é crucial para a proliferação induzida pelo VEGF. O ATL-1 inibe a ativação da PLC $\gamma$  pelo VEGF (Takahashi e col., 2001; Baker e col., 2009). O resíduo Tyr<sup>951</sup> está diretamente envolvido com a ativação de Src e fosforilação da VE-caderina (Koch e col., 2011). Mais estudos sobre a modulação de

diferentes resíduos de tirosina são necessários para esclarecer as diferentes vias intracelulares reguladas pela ativação do VEGFR-2.

Visto o efeito anti-permeabilizante do ATL-1 e a fim de analisar um possível papel anti-metastático do análogo, foram realizados experimentos de co-cultura com HUVEC, células de melanoma (MV3) e células não tumorais, melanócitos (NGM). O ATL-1 reduziu significativamente a migração transendotelial do melanoma, possivelmente devido a uma inibição do VEGF secretado pelo melanoma.

Em tumores comumente ocorre a hipóxia que promove angiogênese, metástase e leva à resistência terapêutica (Wouters e Koritzinsky, 2008). A expressão do VEGF induzido pela hipóxia serve para o recrutamento de vasos para os tecidos isquêmicos.

Diferentemente de Chen e colaboradores (2010) que demonstraram que o ATL-1 inibiu a produção de VEGF por células de hepatocarcinoma (H22), em nosso modelo tal inibição não ocorreu. As LX e seus análogos exercem seus efeitos principalmente através da ligação ao receptor ALX. A ausência deste receptor na superfície das células da linhagem MV3 poderia justificar a ausência do efeito do análogo. Esta hipótese está sob investigação em nosso laboratório.

A linhagem de melanócitos não secreta VEGF, enquanto o melanoma produz níveis bastante aumentados deste fator de crescimento. A fim de confirmar que a secreção de VEGF seria o diferencial para o alto poder metastático do melanoma, analisamos o efeito do ATL-1 sobre a migração transendotelial desses dois tipos celulares na presença de VEGF endógeno. Em experimentos de co-cultura com as diferentes linhagens, observamos uma reduzida transmigração de melanócitos em quatro horas quando comparados ao melanoma. Contudo, o VEGF exógeno promoveu um aumento da transmigração destas células, demonstrando a importância do VEGF para a abertura de junções celulares e, conseqüentemente, para a invasão celular. Esse aumento na transmigração foi maior nas células de melanoma após o tratamento com VEGF. O pré-tratamento do endotélio com o ATL-1 preveniu o aumento de células intravasadas nos dois casos, demonstrando que, além de ações antiangiogênicas, o ATL-1 pode ser também um potente agente anti-metastático.

A inibição da angiogênese é um processo complexo que inclui um grande número de alvos potenciais. No entanto, diversos estudos reconhecem o sistema VEGF como um regulador chave, que atua na iniciação e regulação de múltiplas respostas celulares, além de sua especificidade pelo endotélio vascular (Petrova e col., 1999).

Há muito busca-se determinar marcadores celulares envolvidos na iniciação e desenvolvimento de cânceres. No entanto, estudos mais recentes vem destacando a importância dos componentes não celulares, em especial a matriz extracelular, na progressão tumoral (Levental e col., 2009; Alves e col., 2011). Embora durante muito tempo vista como uma estrutura estável, que desempenha apenas o papel de suporte, a MEC é dinâmica e versátil e pode influenciar, direta ou indiretamente, o comportamento celular (Lu e col., 2012).

A progressão do tumor requer uma constante evolução das interações entre células e a MEC. Um passo relevante deste processo é o remodelamento do microambiente tumoral, formado por um estroma reativo e responsivo, que regula o balanço entre fatores angiogênicos e angiostáticos associados à MEC. Estes podem modificar o comportamento de células tumorais e / ou endoteliais (Pupa e col., 2002). As células tumorais reorganizando a MEC facilitam suas comunicações e escape do controle homeostático exercido pelo microambiente e, assim, podem modificar a resposta aos tratamentos citotóxicos (Pupa e col., 2002). Há evidências de que a MEC tumoral, remodelada pelas células tumorais, apresenta componentes estruturais que podem ser explorados pelas células neoplásicas para criar um ambiente pró-tumor (Campbell e col., 2010).

Portanto, na segunda etapa deste estudo, investigamos o impacto que uma MEC tumoral exerce sobre as CE e o possível efeito do ATL-1 neste contexto. Para isso, obtivemos as matrizes tridimensionais através de modelo *in vitro* já estabelecido em nosso laboratório (Morandi e col., 1994). Avaliamos se a matriz tumoral poderia promover um perfil endotelial ativado semelhante ao observado durante uma resposta inflamatória.

Estudos paralelos realizados em nosso laboratório buscaram caracterizar as diferenças entre a MEC produzida pelas células de melanoma e melanócitos. Foi visto que a matriz do melanoma apresenta a expressão de laminina e tenascina-C aumentadas, ao passo que a expressão de fibronectina (FN) e trombospondina (TSP)-1 encontrava-se diminuída em relação à matriz do melanócito (Anexo 1) (Helal-Neto e col., dados não publicados).

Alves e colaboradores (2011) mostraram que a matriz subendotelial de HUVECs é formada principalmente por colágeno tipo IV, laminina, TSP-1 e FN e que a tenascina-C está envolvida na seleção de uma subpopulação de HUVECs com perfil mais proliferativo e angiogênico. A laminina está associada a eventos de invasão tumoral e metástase, aumentando a malignidade do melanoma (Givant-Horwitz e col., 2005).

Além disso, a diminuição da FN e da TSP-1 está relacionada à adesão célula-matriz e pode contribuir para a invasão tumoral (Kim e col., 2011). A TSP-1 atua como um inibidor natural da angiogênese (Ferrari e col., 2002; Trapp e col., 2010). Assim, a composição alterada da matriz do melanoma favorecendo a produção de proteínas reativas e suprimindo proteínas matricelulares associadas à instabilidade celular colaboraria para um perfil mais metastático, característico desse tipo de câncer.

O contato das células tumorais com o endotélio aumenta a permeabilidade vascular, aparentemente pela desorganização de proteínas adesivas como a VE-caderina e PECAM-1 (Lewalle e col., 1997; Cai e col., 1999). Nossos dados demonstraram que a adesão das CE à matriz tumoral foi o suficiente para alterar a permeabilidade endotelial (Fig. 13). Em estudos prévios, Helal-Neto e colaboradores (dados não publicados) observaram uma maior formação de fibras de estresse induzida pela adesão das CE à matriz do melanoma. Acreditamos que a adesão endotelial alterada pelo contato com a matriz tumoral contribuiu para o aumento do extravasamento vascular observado. Existe ainda a possibilidade que esse aumento na permeabilidade também resulte do acúmulo de VEGF produzido e estocado pelas células do melanoma em suas matrizes, contribuindo para a modulação do complexo caderina-catenina. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar estas possibilidades.

Os efeitos pró-angiogênicos do VEGF são desencadeados principalmente via ligação ao VEGFR-2, o que resulta também na indução da expressão do próprio receptor (Shen e col., 1998). A presença de receptores para VEGF em células de melanoma pode indicar a ação autócrina deste fator (Lacal e col., 2000). Corroborando com um estudo prévio, que mostrou a secreção de VEGF por 19 linhagens de melanoma humano originadas de tumores primários ou metastáticos (Lacal e col., 2000), as células de linhagem MV3 utilizadas neste estudo secretam grandes quantidades de VEGF (Artigo em 4.1).

Adicionalmente, em estudos *in vitro*, Lacal e colaboradores (2005) mostraram que células de melanoma humano que produzem e expressam simultaneamente o VEGF-A e o VEGFR-2 exibem uma capacidade espontaneamente maior de invadir a MEC do que as células de melanoma que não expressam este fator de crescimento ou seu receptor. Esses dados reforçam o importante papel que a ativação do VEGFR-2 tem para o crescimento e progressão do melanoma. Ainda, a análise de amostras de carcinoma gástrico humano mostrou que metástase tumoral é aumentada quando as células tumorais expressam VEGF e os vasos do estroma adjacente expressam o VEGFR-2 (Takahashi e col., 1996).

Avaliando a modulação de genes envolvidos com a resposta angiogênica em CE, mostramos pela primeira vez que o aumento da expressão do VEGFR-2/KDR é induzido apenas pelo contato com a matriz produzida pelas células tumorais (Fig. 14). Estes dados em conjunto sugerem que, além da capacidade invasiva intrínseca das células tumorais, estas também produzem uma MEC capaz de modificar o endotélio vascular intra-tumoral tornando-o mais responsivo ao VEGF. Esse efeito pode ser decorrente da mudança na expressão de componentes que formam essa matriz ou do aprisionamento de fatores de crescimento por essa matriz.

Outros fatores pró-angiogênicos são expressos em melanomas, incluindo PDGF, FGF-2, IL-8, PIGF (Westermarck e col., 1986; Reed e col., 1994, Nürnberg e col., 1999; Lacal e col., 2000). A IL-8 é super-expressa em muitos tipos de câncer, frequentemente em resposta a quioterapia, radioterapia ou hipóxia, e apresenta um papel importante para a progressão tumoral (Vaughn e Wilson, 2008). Além de ações diretas sobre o crescimento, sobrevivência e invasividade tumoral, esta citocina também apresenta ações pró-angiogênicas por estimular a expressão do VEGF-A e do VEGFR-2 em CE (Matin e col., 2009), exercendo assim, efeitos profundos sobre o microambiente tumoral.

Devido à sua ação em diferentes etapas da progressão tumoral, a IL-8 tornou-se alvo do nosso interesse. Através do ensaio de ELISA observamos a intensa produção da citocina pelas células tumorais, diferentemente do endotélio, que não produziu quantidades significativas (Fig. 15). O contato com a matriz tumoral induziu um aumento na expressão do RNAm tanto da IL-8 como do receptor CXCR-2 (Fig. 16), indicando que a matriz do melanoma pode induzir uma ação autócrina contínua da IL-8 em CE. Dados recentes da literatura mostraram que a IL-8 produzida por células de linhagem de glioblastoma induz, via CXCR-2, abertura de junções e aumento da permeabilidade em CE de microvasculatura cerebral (Dwyer e col., 2012).

Nossos resultados sugerem que a matriz produzida pelas células tumorais favorece a produção de fatores permeabilizantes e pró-angiogênicos, que podem agir sinergicamente a favor da manutenção de um microambiente ativado. Corroborando com nossa hipótese, a IL-8 é frequentemente co-expressa com VEGF em tumores e teve sua secreção relacionada ao aumento da permeabilidade endotelial, contribuindo para o aumento da pressão intersticial e formação de edemas dentro da massa tumoral (Petreacae col., 2007). A IL-8 é, primariamente, um mediador inflamatório, e seu aumento após a radioterapia pode estar relacionado a uma inflamação local (Lattanzio e col., 2013). Interessantemente, a LXA<sub>4</sub> reduziu a secreção de

IL-8 induzida pelo VEGF em CE (Baker e col., 2009), assim pretendemos ainda avaliar o efeito do análogo sobre a produção de IL-8 induzida pela matriz tumoral.

A inflamação e a angiogênese relacionam-se intrinsecamente no microambiente tumoral (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011). O papel do óxido nítrico no câncer ainda é complexo e indefinido, uma vez que ambos os efeitos pró- e antitumorogênico podem ser observados dependendo do tempo de exposição e da concentração do gás. Contudo, a exposição prolongada ao NO, como em doenças inflamatórias crônicas, pode gerar um estado pró-tumorogênico (Choudhari e col., 2013).

A expressão do NO e da NOS vem sendo observada em diferentes tumores, tais como pulmão, colon, mama e melanoma (Thomsen e col., 1995; Ambs e col., 1998; Grimm e col., 2008). Os mecanismos pelo qual o NO induz a inflamação associada à carcinogênese variam desde danos ao DNA, supressão de enzimas de reparo ao DNA, modificação pós-transcricional de proteínas, até o aumento da proliferação celular, angiogênese e metástase (Hussain e col., 2008; Kundu e Surh, 2012).

O NO também é associado às ações permeabilizantes do VEGF, uma vez que camundongos *knockout* para eNOS apresentaram a permeabilidade vascular reduzida quando estimulados com VEGF (Fukumura e col., 2001). Ainda, a eNOS pode ser ativada pela fosforilação induzida por AKT, ou pelo influxo de cálcio dependente de PLC $\gamma$  (Dimmeler e col., 1999; Fulton e col., 1999). O NO pode exercer suas ações pró-angiogênicas através da inibição de fatores angiostáticos presentes na MEC, como a TSP-1, que teve sua produção reduzida em HUVECs tratadas com doadores de NO (Ridnour e col., 2005). A angiostatina, um inibidor da angiogênese presente da MEC, teve sua produção aumentada em CE tratadas com o L-NAME, um inibidor de NOS (Matsunaga e col., 2002). Também, a resposta das CE ao NO é inibida pela TSP-1 de um modo dependente de GMPc (Isenberg e col., 2005).

Em nosso estudo observamos que as CE em contato com a matriz tumoral exibiram a produção sustentada de NO (Fig. 17), ação que atribuímos aos menores níveis de trombospondina-1 expressos por essa matriz.

Contudo, o tratamento com ATL-1 das CE em contato com a matriz reduziu significativamente a produção de NO. Este efeito pode estar relacionado com as ações inibitórias das LX e seus análogos sobre o VEGF, uma vez que o VEGF pode induzir a liberação de NO (van der Zee e col., 1997). Ainda, foi visto que a LX ou ATL-1 inibem a fosforilação da via PI3K/AKT induzida pelo VEGF (Cezar-de-Mello e col., 2008; Baker e

col., 2009), o que pode contribuir para a inibição da atividade da eNOS (Dimmeler e col., 1999; Fulton e col., 1999).

A inflamação, caracterizada pelo influxo de leucócitos, desempenha um papel relevante no desenvolvimento do câncer. Embora a sua função inicial seja suprimir o crescimento tumoral, as células imunes, incluindo os macrófagos, são frequentemente alteradas e recrutadas a favor da massa tumoral (Coussens e Werb, 2002). A transmigração dos leucócitos é dependente da ativação de moléculas de adesão presentes no endotélio e nos próprios leucócitos. A migração transendotelial é um aspecto essencial do tráfego de leucócitos, bem como de células malignas (Hordijk, 2006).

Durante a metástase, em um processo similar ao rolamento de leucócitos pelo endotélio inflamado, as células tumorais interagem com as CE e extravasam para o novo sítio de colonização (Jahroudi e Greenberger, 1995). Este processo é mediado por moléculas de adesão (selectinas e integrinas) presentes nas CE e carboidratos expressos na superfície das células tumorais (Krause e Turner, 1999).

A VCAM-1, através da ligação com receptores da família das integrinas, é responsável pela adesão firme dos leucócitos ao endotélio vascular. Esta proteína encontra-se ausente em células em repouso, mas é fortemente regulada por estímulos inflamatórios (Hordijk, 2006). Khanna e colaboradores (2010) estudando a interação entre melanoma e endotélio mostraram a importância da secreção de citocinas como IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ , e da interação com VCAM-1 para ativação da MAPK p38 e desorganização de VE-caderina.

Nós observamos que a matriz tumoral induziu a expressão gênica de VCAM-1 nas HUVECs (Fig. 18), o que foi confirmado pela robusta marcação de VCAM-1 observada em ensaio de imunocitoquímica (Fig. 19). O tratamento com o ATL-1 reduziu a VCAM-1 induzida pela MEC tumoral. O endotélio ativado facilita a transmigração dos leucócitos que, no foco tumoral, podem ser modulados a favor do tumor, contribuindo com a inflamação sustentada característica do microambiente tumoral. Análogos de LX podem afetar a resposta inflamatória através da modulação da expressão de moléculas de adesão de leucócitos em repouso ou ativados, inibindo a adesão de neutrófilos ao endotélio ativado (Filep e col., 1999). Adicionalmente, o ATL-1 inibiu a expressão de E-selectina e VCAM-1 em CE ativadas com TNF- $\alpha$ , efeito mediado pela indução enzima anti-inflamatória heme-oxigenase-1 (Nascimento-Silva e col., 2005).

Decidimos, então, investigar a relevância fisiológica do aumento de VCAM-1 nas CE através de ensaios de adesão com células mononucleares ativadas ou não com Concanavalina

A. Observamos uma maior adesão de mononucleares à monocamada de HUVEC plaqueadas sobre a matriz derivada de tumor, contudo essa resposta só foi estatisticamente significativa no grupo onde o endotélio foi estimulado com TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, comumente encontrada no microambiente tumoral (Fig.20). Acreditamos que as ações citoprotetoras do ATL-1, em parte pela inibição de proteínas de adesão, fariam deste mediador lipídico uma importante ferramenta antitumoral.

As células tumorais promovem a angiogênese ainda nas etapas iniciais da tumorigênese, contudo, estes novos vasos apresentam diferenças morfológicas e estruturais (Carmeliet e Jain, 2000). Um passo inicial na formação de novos vasos é a ativação do endotélio quiescente pela liberação de fatores proveniente das células tumorais e / ou pelo estroma.

A MEC, neste caso, além de fornecer um suporte para a migração endotelial pode influenciar o comportamento celular, afetando o crescimento, diferenciação, motilidade e viabilidade (Marastoni e col., 2008). Em neoplasias, alterações da composição da MEC influenciam diretamente a carcinogênese (Marastoni e col., 2008).

Devido à menor expressão de TSP-1 e FN na matriz do melanoma, resolvemos avaliar a capacidade desta matriz de induzir a diferenciação de HUVEC em estruturas similares a tubos. As CE, em contato com a matriz tumoral, apresentaram uma capacidade tubulogênica significativamente maior no matrigel em relação às CE sobre a matriz subendotelial. Ainda, o tratamento com ATL-1 reduziu a tubulogênese induzida pela matriz, o que demonstra um significativo efeito do análogo no comportamento das CE (Fig. 21).

Evidências indicam que fármacos, incluindo glicocorticóides, anti-inflamatórios não esteroidais e imunomoduladores, exercem suas propriedades benéficas, em parte, através de efeitos pleiotrópicos sobre a MEC (Järveläinen e col., 2009). Ainda, alguns anti-inflamatórios não esteroidais apresentaram a capacidade de alterar a MEC através da supressão da expressão, síntese e atividade de metaloproteinases de matriz (Sadowski e Steinmeyer, 2001; Pavlovic e col., 2006). Nosso grupo demonstrou que o ATL-1 modula a expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9 de CE estimuladas com VEGF (Cezar-de-Mello e col., 2008), o que poderia estar relacionado ao remodelamento da matriz extracelular. Neste estudo, observamos o importante papel da matriz extracelular do melanoma na promoção da diferenciação endotelial, ativando diretamente as CE e tornando-as mais sensíveis a fatores pró-angiogênicos comumente produzidos pelas células tumorais.

O principal conceito na base das terapias antiangiogênicas para combate ao câncer é ter a CE endotelial como alvo terapêutico, pois, diferentemente das células tumorais, são geneticamente estáveis e apresentam um perfil característico na vasculatura intratumoral, contribuindo para a seletividade e eficácia do tratamento. Neste contexto, nosso estudo apontou o ATL-1 como uma poderosa ferramenta farmacológica, por inibir múltiplas ações produzidas pelo estroma tumoral nas células endoteliais.

Controlar o ambiente tumoral não corresponde a tratar somente a célula cancerosa. Há necessidade de se entender a importância exercida pelo microambiente tumoral e pelas alterações genéticas predisponentes ao câncer na resposta às diferentes modalidades terapêuticas. Pretendemos, com este trabalho, colaborar para o entendimento das interações entre os componentes do estroma e sua relevância para a progressão tumoral, e, assim, contribuir para a criação de novas estratégias para manter o câncer sob controle e aumentar a eficácia de agentes tumoricidas já utilizados.

## CONCLUSÃO

As lipoxinas e ATL têm demonstrado um efeito inibitório sobre as ações de VEGF em células endoteliais. Neste trabalho foi investigado o efeito direto do ATL-1 sobre a transmigração de células tumorais através do endotélio e a produção de VEGF pelas mesmas. O análogo não possui efeito direto sobre as células de melanoma, contudo, inibe a ação do VEGF produzido por essas nas junções aderentes, preservando proteínas juncionais como a VE-caderina e  $\beta$ -catenina, conseqüentemente reduzindo a hiperpermeabilidade endotelial necessária para a angiogênese e a metástase.

Além disso, estudando a interação da matriz produzida por células de melanoma com as células endoteliais, observamos a influência direta que a matriz tumoral exerce sobre o comportamento das células endoteliais, que passam a expressar um perfil ativado. Este perfil foi caracterizado pelo aumento da permeabilidade endotelial, super expressão do VEGFR-2 e também do agente angiogênico IL-8 e seu receptor CXCR-2, além do aumento da expressão da molécula de adesão VCAM-1 e do mediador pró-inflamatório NO. A ativação endotelial culminou com uma aumentada tubulogênese apresentada pelas células suportadas pela matriz tumoral. O ATL-1 inibiu o perfil inflamado e pró-angiogênico induzido nestas células, o que resultou na diminuição da quantidade de vasos formados.

## REFERÊNCIAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3797-804.

Adam AP, Sharenko AL, Pumiglia K, Vincent PA. Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *J Biol Chem.* 2010; 285(10):7045-7055.

Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(6):464-478

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter D. *Molecular Biology of the Cell.* 2002; 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter D. *Biologia Molecular da célula.* 2010; 5<sup>o</sup> edição Porto Alegre: Editora Artmed.

Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med.* 2009; 15, 1023–1030

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011; 223:162-176.

Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG, Faria J et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2011; 317(15):2073-85.

Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, Ogunfusika MO, Oser SM, Khan MA et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer.* 1998 Jul;78(2):233-9.

Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res.* 1998 Jan; 58 (2):334-41.

Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:2286–2297

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 2001; 114: 629–641.

Ariel A, Chiang N, Arita M, Petasis NA, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxin A4 and B4 analogs block extracellular signal-regulated kinase-dependent TNF $\alpha$  secretion from human T cells. *J. Immunol.* 2003; 170:6566-6272

Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001; 63:8–18.

Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:221-247.

Baker N, O'Meara SJ, Scannell M, Maderna P, Godson C. Lipoxin A4: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells. *J Immunol.* 2009; 182:3819-3826.

Balda MS, Matter K. Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol.* 2000; 11: 281–289.

Bandeira-Mello C, Bozza PT, Diaz BL, Cordeiro RSB, Jose PJ, Martins MA et al. Cutting edge: lipoxin (LX) A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 block allergen-induced eosinophil trafficking. *J. Immunol.* 2000; 164:2267–2271.

Bannenberg GL, Aliberti J, Hong S, Sher A, Serhan C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis. *J Exp Med.* 2004; 199:515–523.

Barcellos-Hoff MH, Ravani SA. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res.* 2000; 60(5):1254-60.

Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular Matrix: A Gatekeeper in the Transition from Dormancy to Metastatic Growth. *Eur J Cancer.* 2010; 46(7): 1181–1188.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004; 84:869-901.

- Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG et al. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ. Res.* 2005; 96, 1257–1265
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer.* 2003; 3:401–410.
- Birnbaum Y, Ye Y, Lin Y, Freeberg SY, Nishi SP, Martinez JD et al. Augmentation of myocardial production of 15-Epi-Lipoxin-A4 by pioglitazone and atorvastatin in the rat. *Circulation.* 2006; 114:929-935.
- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context *Nat Rev Cancer.* 2001; 1:46–45
- Blankenstein T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system *Cur Opin Immunol.* 2005; 17:180–186.
- Braga VM. Cell–cell adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14, 546–556
- Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J et al. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15, 1229–1239
- Cai J, Jiang WG, Mansel RE. Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells. *Int J Mol Med.* 1999; 4(2):191-5.
- Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM, Petrik J. ExtracellularMatrix Proteins and Tumor Angiogenesis. *J Oncol.* 2010; 2010: 586905.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407(6801): 249-57.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380:435-439.
- Caveda L, Corada, M, Martin-Padura, I, Del Maschio, A, Breviario, F, Lampugnani et al. Structural characteristics and functional role of endothelial cell to cell junctions. *Endothelium.* 1994; 2:1-10

Cezar-de-Mello PFT, Nascimento-Silva V, Vilela CG, Fierro IM. Aspirin-triggered lipoxin A4 inhibition of VEGF-induced endothelial cell migration involves actin polymerization and focal adhesion assembly. *Oncogene*. 2006; 25:122-129.

Cezar-de-Mello PFT, Vieira AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol*. 2008; 153:956-965.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:563-572

Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev*. 1995; 14:279-301.

Chatelain C, Balois T, Ciarletta P, Ben Amar M. Emergence of microstructural patterns in skin cancer: a phase separation analysis in a binary mixture *New J. Phys*. 2011; 13 115013

Chen XL, Nam JO, Jean C, Lawson C, Walsh CT, Goka E et al. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell*. 2012; 22(1):146-57.

Chen Y, Hao H, He S, Cai L, Li Y, Hu S et al. Lipoxin A4 and its analogue suppress the tumor growth of transplanted H22 in mice: the role of antiangiogenesis *Mol Cancer Ther*. 2010; 9:2164-2174

Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J. Cell Biol*. 2010; 188, 595-609.

Chiang N, Arita M, Serhan CN. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 73:163-177

Chiang N, Serhan CN, Dahlen S, Drazen JM, Hay DWP, Rovati GE et al. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo. *Pharmacol Rev*. 2006; 58:463-487.

Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:559-570.

Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:118

Clària, J, CN Serhan. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:9475-9475.

Clish CB, Levy BD, Chiang N, Tai HH, Serhan CN. Oxidoreductases in lipoxin A4 metabolic inactivation: a novel role for 15-oxyprostaglandin 13-reductase/leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase in inflammation. *J. Biol. Chem.* 2000; 33:25372-25380

Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:769–776.

Colgan SP, Serhan CN, Parkos CA, Delp-Archer C, Madara JL. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers, *J. Clin. Invest.* 1993; 92:75–82

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1989; 84, 1470–1478.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 507-521.

Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96, 9815–9820

Coussens, LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420:860–867

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28:488-494.

Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 2005; 97(11):1093-1107.

de Vries, C, Escobedo JA, Ueno H, Houck, K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992; 255:989- 991.

Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5:261-270.

Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res.* 1999; 252: 13–19.

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions *FASEB J.* 1995; 9:910-918.

Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol.* 2012; 19(3):218-23.

Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008; 121:2115-2122.

Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 308–315.

Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell.* 2009; 16:209-221.

Delaney CE, Weagant BT, L Addison C. The inhibitory effects of endostatin on endothelial cells are modulated by extracellular matrix. *Exp Cell Res.* 2006; 312:2476.

Desbaillets I, Diserens AC, Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med.* 1997; 186: 1201–1212.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399 (6736):601-605.

Dineen SP, Sullivan LA, Beck AW, Miller AF, Carbon JG, Mamluk R et al. The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 352.

Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003; 47:149-161.

Dvorak HF, Senger DR, Dvorak AM. Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev.* 1983; 2(1):41-73

Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya EM, Smith SS, Azzi S et al. Glioblastoma cell-secreted interleukin-8 induces brain endothelial cell permeability via CXCR2. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45562

Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E et al. Beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 2003; 63: 3145-3153.

Edenius C, Haeggstrom J, Lindgren JA. Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 157:801-807

Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010; 22:697–706.

Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(12):4768–4775.

Ekmekcioglu S, Ellerhorst JA, Mumm JB, Zheng M, Broemeling L, Prieto VG et al. Negative association of melanoma differentiation-associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(1):9–17

El Tarhouny S, Seefeld M, Fan AX, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Comparison of serum VEGF and its soluble receptor sVEGFR1 with serum cell-free DNA in patients with breast tumor. *Cytokine.* 2008; 44: 65–69.

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Chersesh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 1999; 4:915– 924.

Ellerhorst JA, Ekmekcioglu S, Johnson MK, Cooke CP, Johnson MM, Grimm EA. Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Oncogene.* 2006; 25(28):3956–3962.

Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res* 2011; 1(7):852-868

Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiten DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* 1997; 7 Suppl 2: S19-26.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1998; 111:1853-1865.

Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation.* 1999; 6(1):23-44.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999; 237: 1-30.

Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol.* 2000; 1:617-24.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:795-803.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996; 380:439-442.

Ferrara N, Gerber HP, LeVouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9:669-676.

Ferrari do Outeiro-Bernstein MA; Nunes SS; Andrade AC; Alves TR; Legrand C; Morandi V. A recombinant NH<sub>2</sub>-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biology.* 2002; 21(4):311-324.

Fierro IM. Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 73:271-275.

- Fierro IM, Kutok JI, Serhan CN. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration aspirin-triggered 15-R-lipoxin-A4 and lipoxin A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 300:385-392.
- Fierro IM, Serhan CN. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34:555-566
- Filep JG, Zouki C, Petasis NA, Hachicha M, Serhan CN. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 stable analogs are demonstrable in human whole blood: modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil–endothelial interactions. *Blood.* 1999; 94:4132–4142.
- Fiore S, Madox JF, Perez HD, Serhan CN. Identification of human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med.* 1994; 1:253-260
- Fiore S, Serhan CN. Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction, *Biochemistry.* 1995; 34:16678–16686.
- Fitzpatrick B, Mehibel M, Cowen RL, Stratford IJ. iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide.* 2008; 19(2):217–224.
- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972; 175: 409-416
- Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med.* 1975; 82:96-100.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat Med.* 1995; 1:27–31
- Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006; 57:1-18
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267:10931-10934
- Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER. Stromal Endothelial Cells Directly Influence Cancer Progression. *Sci Transl Med.* 2011; 3(66):66ra5.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:2604–2609.

Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(7):521–534.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999; 399(6736):597-601.

Garcia SF, Cella D, Clauser SB, Flynn KE, Lad T, Lai JS et al. Standardizing patient-reported outcomes assessment in cancer clinical trials: a patient-reported outcomes measurement information system initiative. *J Clin Oncol*. 2007; 25:5106-5112.

Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Letters*. 2009; 583:1–6.

Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006; 8:1223–1234.

Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda)*. 2005; 20:194-200.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003; 161(6):1163-77

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285:1028-1032.

Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R, Remuzzi A. Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest*. 1993; 92: 3038–3044.

Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Letters*. 2005; 223 1–10.

Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000; 164:1663-1667

Gomes FG, Nedel F, Alves AM, Nör JE, Tarquinio SB. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci.* 2013; Feb 7;92(2):101-7.

Gong P, Angelini DJ, Yang S, Xia G, Cross AS, Mann D et al. TLR4 signaling is coupled to SRC family kinase activation, tyrosine phosphorylation of zonula adherens proteins, and opening of the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *J Biol Chem.* 2008; 283:13437–13449.

Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys Acta.* 2008; 1778:729–756.

Gotsch U, Borges E, Bosse R, Böggemeyer E, Simon M, Mossmann H et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J. Cell Sci.* 1997; 110, 583–588

Grimm EA, Ellerhorst J, Tang CH, Ekmekcioglu S. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide.* 2008; 19(2):133-7.

Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2001; 158:3–159.

Gumbiner BM. Breaking through the tight junction barrier *J Cell Biol.* 1993; 123:1631-1633.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:622-634.

Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003; 54(4):469-87.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005; 18:150–159.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2005; 100:57-70

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646-74.

Hao H, Liu M, Wu P, Cai L, Tang K, Yi P et al. Lipoxin A4 and its analog suppress hepatocellular carcinoma via remodeling tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 2011; 309:85-94

Harris ES, Nelson WJ. Ve-cadherin: at front, and sides of endothelial cell organization and junction. *Current Opinion in Cell Biology.* 2010; 22:651-658

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim biophys Acta.* 2008; 1778:660-669

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev/Cancer.* 2003; 3:411-421

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23:1011-1027.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:9349-9354.

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991; 253: 1278-1280.

Hordijk PL. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS J.* 2006; 273(19):4408-4415.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 1994; 127:1375–1380.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991; 5:1806-1814.

Hunter CA, Yu D, Gee M, Ngo CV, Sevnani C, Goldschmidt M et al. Cutting edge: systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis. *J Immunol.* 2001; 166:5878–5881.

Hussain SP, He P, Subleski J, Hofseth LJ, Trivers GE, Mechanic L et al. Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008; 68(17):7130-7136

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 2009; 326(5957):1216-1219.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines *Cell*. 2002; 110(6):673-87.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativas 2014- Incidência do câncer no Brasil. [acesso em 2014 Jan 20]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>.

Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep; 102(37):13141-6.

Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc)*. 2001; 66:1174-1186.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973; 52(11):2745-56.

Jahroudi N, Greenberger JS. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *J Neurooncol*. 1995; 23(2):99-108.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009; 61(2):198-223

Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol*. 2014; 204(2):247-263

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2007; 57:43-66.

Jimbow K, Lee SK, King MG, Hara H, Chen H, Dakour J et al. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1993; 100:259S-268S

Joyce JA, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006; 66: 605–612.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 2008; 11<sup>o</sup> edição – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kadl A, Leitinger N. The Role of Endothelial Cells in the Resolution of Acute Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 20205; 7:1744-1754.

Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 2008; 73:751-62.

Khanna P, Yunkunis T, Muddana HS, Peng HH, August A, Dong C. p38 MAP kinase is necessary for melanoma-mediated regulation of VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298(5):C1140-1150.

Kim H-S, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y et al. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3b signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277: 41888–41896.

Kim JO, Jung SS, Kim SY, Kim TY, Shin DW, Lee JH et al. Inhibition of Lewis lung carcinoma growth by *Toxoplasma gondii* through induction of Th1 immune responses and inhibition of angiogenesis. *J Korean Med Sci*. 2007; 22 Suppl:S38–46

Kim S, Myung WC, Lee JS, Cha JK, Jung UW, Yang HC et al. The effect of fibronectin-coated implant on canine osseointegration. *J Periodontal Implant Sci*. 2011; 41(5):242-247

King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol*. 1998; 60:601–617.

Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 515:33-48.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994. Mar 1;298 (Pt 2):249-258.

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011; Jul 15;437(2):169-183.

Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:463-493.

Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis*. 1999; 17(3):183-92.

Kundu JK, Surh YJ. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(9):2013-2037.

Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25:482-489.

L Addison C. Modulation of response to tumor therapies by the extracellular matrix. *Future Oncol*. 2006; 2(3):417-29

Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S et al. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol*. 2000. 115(6):1000-1007.

Lacal PM, Ruffini F, Pagani E, D'Atri S. An autocrine loop directed by the vascular endothelial growth factor promotes invasiveness of human melanoma cells. *Int J Oncol*. 2005 Dec; 27(6):1625-1632.

Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 2007; 100:782-794.

Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 1992; 118:1511-1522

Lattanzio L, Tonissi F, Torta I, Gianello L, Russi E, Milano G et al. Role of IL-8 induced angiogenesis in uveal melanoma. *Invest New Drugs*. 2013; 31(5):1107-1114.

Le Boeuf F, Houle F, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J Biol Chem*. 2004; 279:39175-39185.

Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*. 2005 May 23; 169(4):681-691.

Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer.* 1999; 79: 991–995.

Levental KR1, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, Fong SF et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009; 139:891–906.

Lewalle JM, Bajou K, Desreux J, Mareel M, Dejana E, Noël A et al. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exp Cell Res.* 1997; 237(2):347-356.

Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66 605–612.

Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol.* 2000; 192: 150–158.

Liang S, Dong C. Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295: C701–C707.

Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993; 7:737–743.

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007; 445:843-850.

Lorquet S, Berndt S, Blacher S, Gengoux E, Peulen O, Maquoi E, et al. Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J.* 2010; 24, 3782-3795.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Dec; 3(12). pii: a005058.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012; 196(4):395-406.

Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:437-441.

Machado FS, Aliberti J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res.* 2006; 35:209–218.

Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med.* 2006; 12:330-334.

Maddox JF, Hachicha M, Takano T, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272:6972-6978.

Maddox JF, Serhan CN (1996) Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med.* 1996; 183(1):137-146.

Maderna P, Godson C. Lipoxins: revolutionary road. *Br J Pharmacol.*2009; 158:947-959.

Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol.* 2003 Mar; 3:319-328.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454: 436–444.

Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metast Rev.* 2006; 25:315–322.

Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular Matrix: A Matter of Life and Death. *Connective Tissue Research.* 2008; 49:203–206.

Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem.* 2009; 284(10):6038-42.

Massi D, Franchi A, Sardi I, Magnelli L, Paglierani M, Borgognoni L et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *J Pathol.* 2001; 194(2):194–200.

Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.* 2005 Jul; 24(13):2342-2353..

Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, Tessmer J, Warltier DC, Chilian WM. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation.* 2002 May 7;105(18):2185-2191.

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 225–236.

McLachlan, RW, Yap AS. Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *J Mol Med.* 2007; 85:545 - 554.

McMahon B, Mitchell D, Shattock R, Martin F, Brady HR e Godson C. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J.* 2002; 16: 1817-1819.

McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem.* 2000; 275:27566-27575.

Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006; 86:279-367.

Melchiori A, Mortarini R, Carlone S, Marchisio PC, Anichini A, Noonan DM et al. The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res.* 1995; 219:233–242.

Meyer RD, Sacks DB, Rahimi N. IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PLoS One.* 2008; 3(12):e3848.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H ,Martinez R, Moller NPH, Risau W et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72:835-846.

Morandi V, Cherradi SE, Lambert S, Fauvel-Lafève F, Legrand YJ, Legrand C. Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate

synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J Cell. Physiol.* 1994; 160:367-377.

Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae CO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for interleukin-8. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 305:31-38.

Murphy PM, Ozçelik T, Kenney RT, Tiffany HL, McDermott D, Francke U. A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J Biol Chem.* 1992; 267:7637-7643.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. Aspirin-triggered lipoxin A4 blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidative mechanism. *Thromb Haemost.* 2007; 97:88-98.

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM. Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A4 induces heme oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 289:C557-C563.

Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G et al. VEPTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J.* 2002; 21:4885-4895.

Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002; 12:13-19.

Nürnberg W, Tobias D, Otto F, Henz BM, Schadendorf D. Expression of interleukin-8 detected by in situ hybridization correlates with worse prognosis in primary cutaneous melanoma. *J Pathol.* 1999; 189(4):546-551.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:359-371.

O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, McGee JO. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. *Lancet.* 1993; 342:148-149.

Otrock ZK, Mahfouz RA, Makarem JA, Shamseddine AI. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis.* 2007; 39:212-220.

- Ozbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC. The evolution of extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21:4300–4305.
- Palmieri G, Capone M, Ascierio ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009; 7:86.
- Pang H, Yi P, Wu P, Liu Z, Liu Z, Gong J et al. Effect of lipoxin A4 on lipopolysaccharide-induced endothelial hyperpermeability. *ScientificWorldJournal.* 2011; 11:1056-1067.
- Papayianni A, Serhan CN, Brady HR. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells, *J. Immunol.* 1996; 156:2264–2272.
- Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: An overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation and inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006; 5:91-106.
- Patel SD, Chen CS, Bahna F, Honig B, Shapiro L. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol.* 2003; 13: 690–698.
- Pavlovic S, Du B, Sakamoto K, Khan KM, Natarajan C, Breyer RM et al. Targeting prostaglandin E2 receptors as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *J Biol Chem.* 2006; 281: 3321-3328.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181:902-906.
- Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(12):5014-23.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell Res.* 1999; 253: 117.
- Pilorget A, Conesa M, Sarray S, Michaud-Levesque J, Daoud S, Kim KS et al. Lebectin, a Macrovipera lebetina Venom-Derived C-type Lectin, Inhibits Angiogenesis Both In Vitro and In Vivo. *Journal of cellular physiology.* 2007; 211(2):307-15.

Planagumà A, Pfeffer MA, Rubin G, Croze R, Uddin M, Serhan CN et al. Lovastatin decreases acute mucosal inflammation via 15-epi-lipoxin A(4) *Mucosal Immunol.* 2010; 3:270–279.

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:803-815.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4:71–78.

Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 2005; 280(36):31906-31912

Pupa SM, Ménard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol.* 2002; 192:259-267.

Reed JA, McNutt NS, Albino AP. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. *Am J Pathol.* 1994; 144(2):329-36.

Retsas S, Henry K, Mohammed MQ, Mac-Rae K. Prognostic factors of cutaneous melanoma and a new staging system proposed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC): validation in a cohort of 1284 patients. *Eur J Cancer.* 2002; 38: 511-516.

Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, Lilien J, Balsamo J. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol.* 2007; 9:883–892.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(37):13147-13152.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis *Nature.* 1997; 386(6626):671-674.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995; 11: 73-91.

Roberts WG1, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated *Cancer Res.* 1997; 57(4):765-72.

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:11–28.

Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer *Adv Cancer Res.* 1999; 76:1-20.

Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2:83–90.

Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9(5):407-415.

Salvucci O, Carsana M, Bersani I, Tragni G, Anichini A. Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res.* 2001; 61(1):318–326.

Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1997; 38: 351–364.

Scalia R, Gefen J, Petasis NA, Serhan CN, Lefer AM. Lipoxin A4 stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of Pselectin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; USA 94:9967–9972.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene.* 1995; 10:135-147.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983–985.

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46:5629–5632.

Serhan CN. Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-Inflammatory and proresolving Lipid mediators and Pathways. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:101-137.

Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: a novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 5335-5339.

Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR et al. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*, 1995; 44:14609-14615.

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005; 73:141–162

Sessa WC. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* 2004; 177:2427-2429

Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C et al. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*. 1999; 5(6):662-668.

Shen BQ, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem*. 1998; 273:29979–29985.

Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem*. 1998; 273:31283–31288

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359(6398), 843–845.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cel Res*. 2006; 312:549-560.

Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- $\kappa$ B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol*. 2000; 164:762–767.

Simionescu M, Simionescu N. Endothelial transport macromolecules: transcytosis and endocytosis. *Cell Biol Rev. Cell Biol Rev*. 1991; 25(1):1-78.

Simões RL, Fierro I. Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog. *J Immunol.* 2005; 175(3):1843-1850.

Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2005; 96(3):308-18.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998; 92:735-745.

Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22(3):234-49.

Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006; 12:895-904.

Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene.* 2003; 22: 3172-3179.

Sun Z1, Li X, Massena S, Kutschera S, Padhan N, Gualandi L et al. (2012) VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAd. *J Exp Med.* 2012; 209(7):1363-77.

Suzuki S, Sano K, Tanihara H. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.* 1991; 2:261-270.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001; 20(11):2768-2778.

Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(10):1679-84.

Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer.* 1995; 72(1):41-44.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991; 266:11947-11954.

Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis.* 2010. 13:305–315.

Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.* 2005; 14: 425–431.

Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ. SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:5983–5986.

van Beijnum JR, Rousch M, Castermans K, van der Linden E, Griffioen AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. *Nat Protoc.* 2008; 3:1085–1091.

van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* 1997; 95(4):1030-1037.

van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer.* 1991; 48(1):85-91.

van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R et al. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 285:C343–C352.

Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; pii:S1359-6101(13)00098-1.

Vestweber D. The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 28(2):223-32.

Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:223-232.

- Vestweber D, Broermann A, Schulte D. Control of endothelial barrier function by regulating vascular endothelial-cadherin. *Curr Opin Hematol*. 2010; 17:230-236.
- Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player *Trends Cell Biol*. 2009; 19:8-15.
- Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*. 2007 26:1067-1077.
- Wallez Y, Huber P. Endothelial adherents and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:794-809.
- Wang YP, Wu Y, Li LY, Zheng J, Liu RG, Zhou JP et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation*. 2011; 8:95.
- Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem*. 2003; 278, 48848–48860.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(21): 6735–6741.
- Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*. 2004; 167: 223–229.
- Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005; 437:497–504.
- Weis SM, Lim ST, Lutu-Fuga KM, Barnes LA, Chen XL, Göthert JR et al. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J Cell Biol*. 2008; 181(1):43-50.
- Walti J, Loges S, S Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*. 2013 Aug 1;123(8):3190-3200.
- Westermarck B, Johnsson A, Paulsson Y, Betsholtz C, Heldin CH, Herlyn M et al. Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chains of

platelet-derived growth factor (PDGF) and produce a PDGF-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(19):7197-7200.

Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15:509–514.

White RR, Stanley WE, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis. *Ann Surg*. 2002; 235: 879-887.

Willis AL, Sabeh F, Li XY, Weiss SJ. Extracellular matrix determinants and the regulation of cancer cell invasion stratagems. *J Microsc*. 2013; 251(3):250-260.

Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:851–864.

Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Zhou GP, Chen ZQ. Lipoxin A4 inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells. *Kidney Int*. 2006; 69: 248–256.

Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E et al. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol. Biol. Cell*. 2005; 16:5141-5151.

Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(8):969–986.

Xu Y, Yuan L, Mak J, Pardanaud L, Caunt M, Kasman I et al. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol*. 2010; 188, 115–130.

Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kim HW, Hilenski L, Patrushev NA et al. IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell–cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2006; 26:1991–1997.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407:242-242.

Yang DH, Park JS, Jin CJ, Kang HK, Nam JH, Rhee JH et al. The dysfunction and abnormal signaling pathway of dendritic cells loaded by tumor antigen can be overcome by neutralizing VEGF in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2009; 33: 665–670.

Yang J, Caldwell RB, Behzadian MA. Blockade of VEGF-induced GSK/ $\beta$ -catenin signaling, uPAR expression and increased permeability by dominant negative p38 $\alpha$ . *Exp Eye Res.* 2012 Jul; 100:101-8.

Yang L, Chen Y, Cui T, Knösel T, Zhang Q, Albring KF et al. Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 2012; 33(10):1863-1870.

Yao C, Yang D, Wan Z, Wang Z, Liu R, Wu Y et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response in primary astrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2014; 18(1):85-89.

Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Morimoto S, Watanabe Y, Hirata M et al. Anti-angiogenic effects of differentiation-inducing factor-1 involving VEGFR-2 expression inhibition independent of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Cancer.* 2010; 9:245.

Youssofian H, Hicklin DJ, Rowinsky EK. Review: monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor receptor-2 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13:5544s-5548s.

Zaman K, Driscoll R, Hahn D, Werffeli P, Goodman SL, Bauer J et al. Monitoring multiple angiogenesis-related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs. conservative therapy. *Int J Cancer.* 2006; 118:755–764.

Zemani F, Benisvy D, Galy-Fauroux I, Lokajczyk A, Collic-Jouault S, Uzan G et al. Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(8):1167-1175.

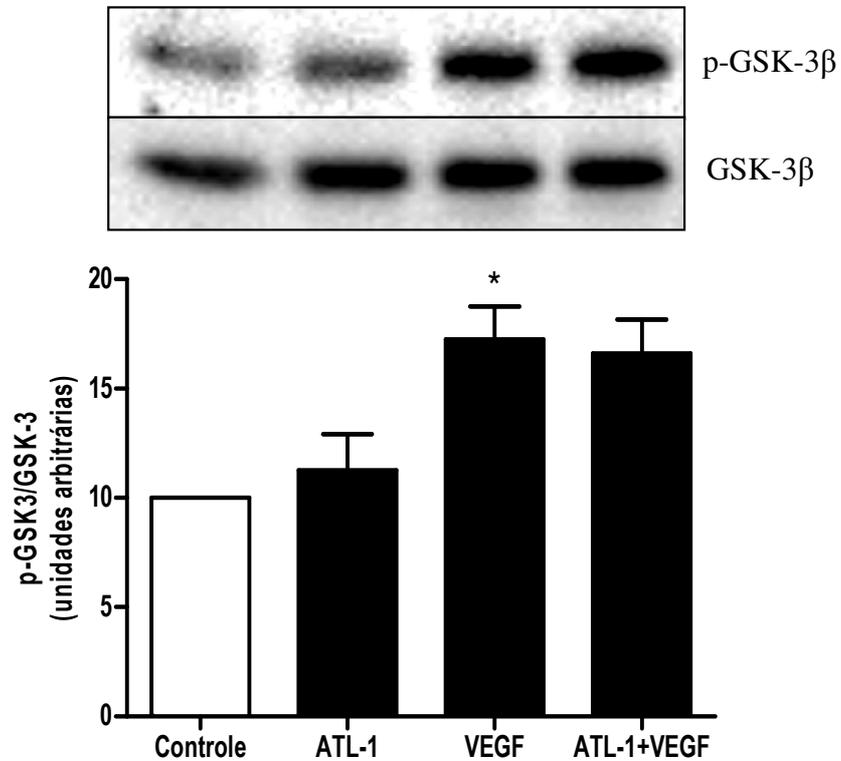
Zhang H, Fu T, McGettigan S, Kumar S, Liu S, Speicher D et al. IL8 and Cathepsin B as Melanoma Serum Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2011; 12: 1505–1518.

Zhao X, Peng X, Sun S, Park AY, Guan JL. Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *J Cell Biol.* 2010 Jun 14; 189(6):955-965.

Zhou XY, Li YS, Wu P, Wang HM, Cai ZY, Xu FY et al. Lipoxin A(4) inhibited hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatoma cells. *Hepatol Res.* 2009; 39:921-930.

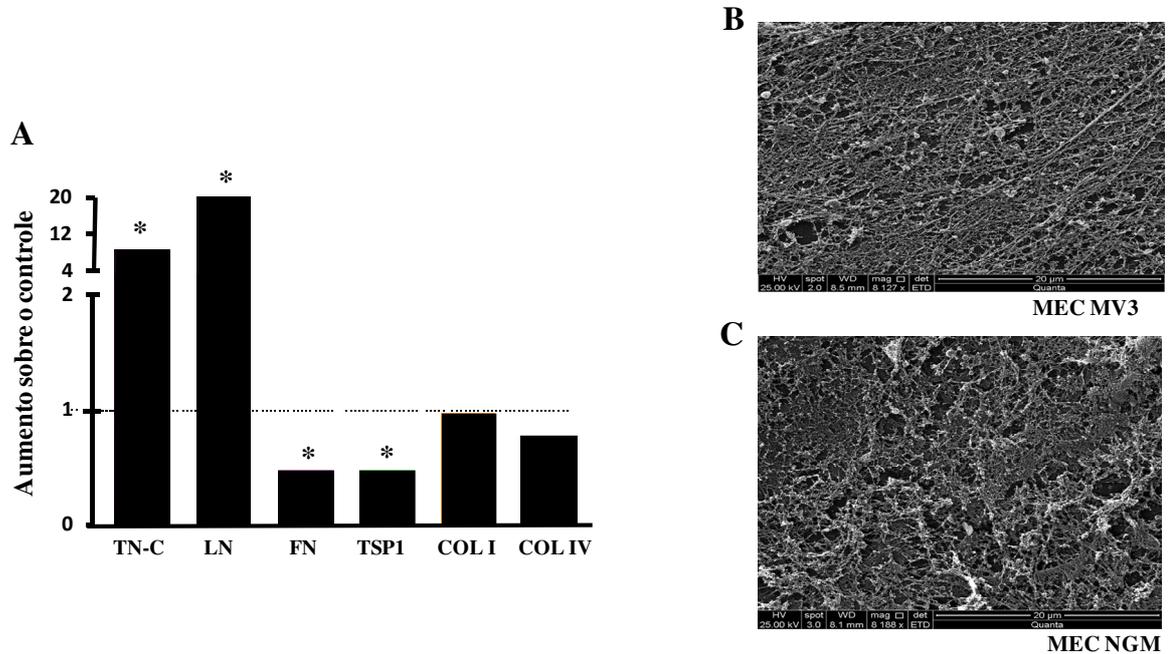
zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Oct; 1288(2):F55-78.

## APÊNDICE - ATL-1 não inibe a fosforilação de GSK-3 $\beta$ induzida pelo VEGF



Legenda: HUVECs ( $1 \times 10^6$ ) foram cultivadas em placas de 6 poços foram pré-tratadas ou não com ATL-1 (100 nM) por 30 minutos antes do estímulo ou não com VEGF (10 ng/ml) durante 10 minutos. O extrato total foram obtidos e analisados por transferência de Western utilizando anticorpos específicos contra a GSK-3 fosforilada (Ser-9) e GSK-3 total. As bandas foram analisados por densitometria. A média e o desvio-padrão representam três experimentos independentes e idênticos, onde \* $p < 0,05$  em relação aos grupos controle e ATL-1.

## ANEXO - Caracterização das proteínas da MEC derivadas de MV3 e NGM



Legenda: (A) MV3 ou NGM foram cultivadas em placas de 96 poços durante 48 horas. As células foram lisadas para se obter a matriz extracelular. A presença de tenascina - C (TN - C), trombospondin (TSP), laminina (LN), fibronectina (FN), colágeno I (Col I) e colágeno IV (Cl IV) na matriz foram determinadas por realização de um ensaio de ELISA, utilizando anticorpos específicos para cada proteína de matriz. Resultado representativo de 3 experimento individuais e semelhantes (\* $p < 0,05$ ). (B e C) Matrizes produzidas por MV3 NGM em 72 horas. Amostras observadas com microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5800) usando voltagem de aceleração de 25 KV. Ampliação. 8000X.