

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**INTERAÇÃO B1R/TLR4 COMO MECANISMO DE RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E SUA IMPLICAÇÃO NA BARREIRA  
HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA.**

**Carolina Batista**

**2024**



# INTERAÇÃO B1R/TLR4 COMO MECANISMO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SUA IMPLICAÇÃO NA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA.

Carolina Batista

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Anatomia Patológica), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como partes dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Anatomia Patológica).

Orientadores: Prof. Dr. Fabio de Almeida Mendes  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Joice Stipursky Silva

Rio de Janeiro

05.2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
 Decania do Centro de Ciências da Saúde  
 Faculdade de Medicina  
 Direção Adjunta de Pós-Graduação  
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Anatomia Patológica

## ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Medicina

Ata de Defesa de Tese para a concessão do grau de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicina (Anatomia Patológica)

Defesa realizada no dia 21 de Maio de 2024

Candidato: Carolina Batista

Orientadores:

1) Fabio de Almeida Mendes

2) Joice Stipursky Silva

Co-orientador:

1) João Bosco Pesquero

Banca examinadora (Nome Completo)

1) Fabio de Almeida Mendes

2) Valéria Pereira Ferrer

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** VALERIA PEREIRA FERRER  
 Data: 11/06/2024 10:33:24-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

3) Luciana Ferreira Romão

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUCIANA FERREIRA ROMAO  
 Data: 10/06/2024 21:00:43-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

4) Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JORGE PAES BARRETO MARCONDES DE SOUZA  
 Data: 13/06/2024 13:34:01-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

5) Ronaldo de Carvalho Araújo

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RONALDO DE CARVALHO ARAUJO  
 Data: 14/06/2024 12:55:06-0300  
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Título da Tese:

**INTERAÇÃO B1R/TLR4 COMO MECANISMO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SUA IMPLICAÇÃO NA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA**

Local da Defesa

Defesa híbrida:

1. Auditório Helio Fraga, bloco K, segundo andar, Centro de Ciências da Saúde, Ilha do Fundão.
2. <https://meet.google.com/zsg-epoa-xfc>

De acordo com resolução CPEG 128/2022, a banca concordou em arguir a candidata de forma remota e a comissão deliberativa concordou com este formato de defesa.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, a candidata foi argüida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, a candidata foi argüida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

**APROVAÇÃO DA TESE SEM RESTRIÇÕES**

**APROVAÇÃO DA TESE CONDICIONADA AO CUMPRIMENTO DE EXIGÊNCIAS FEITAS PELA BANCA (NUM PRAZO NÃO SUPERIOR A 90 (NOVENTA) DIAS)**

Rio de Janeiro, 21 de Maio de 2024

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada eletronicamente pelo presidente e demais membros da banca na ordem acima determinada e pelo candidato.

Referência: Processo nº 23079.206467/2024-39

SEI nº 4243738

Av. Pedro Calmon, 550 - Prédio da Reitoria - Bairro Cidade Universitária

Rio de Janeiro - RJ - CEP: CEP 21941-901 - Telefone: - <http://www.ufrj.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** FABIO DE ALMEIDA MENDES  
Data: 10/06/2024 16:15:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

B292i Batista, Carolina  
INTERAÇÃO B1R/TLR4 COMO MECANISMO DE RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA E SUA IMPLICAÇÃO NA BARREIRA  
HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA. /  
Carolina Batista. -- Rio de Janeiro, 2024.  
192 f.

Orientador: Fabio de Almeida Mendes.  
Coorientador: Joice Stipursky Silva.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós  
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2024.

1. Des-Arg9-Bradicinina. 2. Glioblastoma. 3.  
Barreira Hematoencefálica. 4. Receptor B1 de  
Cininas. 5. Receptor Toll-like 4. I. de Almeida  
Mendes, Fabio, orient. II. Stipursky Silva, Joice,  
coorient. III. Titulo.

Para Atena, para sempre lembrar que  
nunca é tarde demais.

## AGRADECIMENTO

Ao prof. Fabio de Almeida Mendes, pela amizade, confiança e por me convencer a fazer o doutorado. Sim, a culpa é sua.

À prof. Joice Stipursky, pela amizade e por colaborar nesta jornada sem pestanejar.

Ao prof. João Bosco Pesquero, por permitir o uso de dados que gerei ao seu grupo ao longo de meus anos na Unifesp. Serei eternamente grata pela disposição.

Aos meus pais, pela vida de inspiração.

Ao meu marido, Leonardo, e minha filha, Atena, pelo amor e paciência.

Aos meus irmãos, amigas e amigos, pelos ombros, mensagens, cafés e carinhos.

Aqui incluo às vezes em minha cabeça, minhas amigas mais surpreendentes.

À todos do Laboratório de Neuroplasticidade, em especial meu chefe prof Roberto Lent. Obrigada pelo carinho e trocas de conhecimentos.

À todos do Laboratório de Sinalização Celular e Mecanotransdução pela parceria do dia-a-dia.

À todos os Laboratórios (CCS/UFRJ, Unifesp, Instituto Estadual do Cérebro) que disponibilizaram seus equipamentos para que eu pudesse desenvolver esta tese.

Aos TAEs do ICB/UFRJ, queria Militância técnica, pelas ajudas experimentais, churrascos, gins e apoios para nunca desistirmos de dominar o mundo.

À minha querida psicóloga Fernanda Navarro, por ajudar no meu autoconhecimento.

À todos que contribuíram com minha formação.

*“Tenho a impressão  
que já disse tudo.  
E tudo foi tão de repente...”  
Paulo Leminski*



## RESUMO

### INTERAÇÃO B1R/TLR4 COMO MECANISMO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SUA IMPLICAÇÃO NA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM MODELO DE GLIOBLASTOMA.

Carolina Batista

Orientadores: Prof. Dr. Fabio de Almeida Mendes  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Joice Stipursky Silva

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Anatomia Patológica), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Anatomia Patológica).

A família dos receptores de cininas compreende dois subtipos, sendo o B1R aquele em tem como um de seus agonistas fisiológicos a des-Arg<sup>9</sup>-BK (DBK). O receptor B<sub>1</sub> tem baixa expressão ou está até mesmo ausente em condições fisiológicas normais, podendo ser induzido por vários estímulos, como o promovido pelo lipopolissacarídeo (LPS), um dos ligantes do receptor do tipo toll 4 (TLR4). Dados presentes na literatura sugerem uma possível interação entre B1R e TLR4, podendo esta ser importante para a resposta inflamatória local. O objetivo deste estudo é ampliar o conhecimento sobre uma possível relação entre esses receptores e a implicação clínica desta na abertura transitória da barreira hematoencefálica (BHE) através da administração de DBK. Em eletrofisiologia de aortas torácicas de camundongos C57BL/6 WT e nocautes para B1R ou TLR4 observamos que a ausência de B1R modifica a resposta de TLR4 e vice-versa nas células endoteliais (alteração da interação de canais de K na via), que na ausência de B1R a DBK ativa o receptor B<sub>2</sub> de cininas e que essas vias não são dependentes de óxido nítrico. Imunohistoquímica em aortas de WT indicam que a marcação de TLR4 diminui em todas as camadas celulares quando o anel de aorta é incubado com DBK e LPS, enquanto que a marcação para B1R aumenta significativamente na camada endotelial. Análises de células endoteliais em cultura (linhagem HBMEC) mostram que os receptores apresentam marcação perinuclear, e até mesmo no interior do núcleo,

quando as células são tratadas com DBK e LPS e, quando o tratamento é somente com DBK, há o aumento de pontos de proximidade de B1R e TLR4. Fatores secretados por células de glioblastoma (U87MG e T98G) também alteram o padrão de marcação desses receptores e a resposta aos seus agonistas. Experimentos *in vivo*, em camundongos suíços inoculados ou não com células da linhagem C6, tratados ou não com DBK, mostram que há a abertura transitória da BHE, aumentando a biodisponibilidade de fármaco (doxorrubicina) no parênquima cerebral e na massa tumoral de glioblastoma. Os dados reforçam a evidência de uma conexão entre a sinalização B1R e TLR4, um alvo terapêutico a ser explorado, além de apresentar evidências adicionais para o uso do agonista fisiológico de B1R para a abertura transitória de BHE, pelo período menor que 48h, o que aumentaria a biodisponibilidade de fármacos no parênquima cerebral.

Palavras-chave: Receptor toll-like 4, Receptor B<sub>1</sub> de cininas, Des-Arg<sup>9</sup>-BK, Células endoteliais, Glioblastoma, Barreira hematoencefálica.

## **ABSTRACT**

### **B1R/TLR4 INTERACTION AS A MECHANISM OF INFLAMMATORY RESPONSE AND ITS IMPLICATION ON THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN GLIOBLASTOMA MODEL.**

Carolina Batista

Orientadores: Prof. Dr. Fabio de Almeida Mendes  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Joice Stipursky Silva

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Anatomia Patológica), da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Anatomia Patológica).

The family of ykinin receptors includes two subtypes, with B1R having des-Arg<sup>9</sup>-BK (DBK) as one of its physiological agonists. The B<sub>1</sub> receptor is either minimally expressed or entirely absent under normal physiological conditions, but can be induced by various stimuli, such as lipopolysaccharide (LPS), a ligand of toll-like receptor 4 (TLR4). Literature suggests a potential interaction between B1R and TLR4, which could be crucial for the local inflammatory response. This study aims to enhance our understanding of the possible relationship between these receptors and its clinical implications for the transient opening of the blood-brain barrier (BBB) through the administration of DBK. Electrophysiology experiments in thoracic aortas, from C57BL/6 WT mice and B1R or TLR4 knockout mice, we observed that the absence of B1R alters the TLR4 response and vice versa in endothelial cells (affecting the interaction of K channels in the pathway). Additionally, in the absence of B1R, DBK activates the B<sub>2</sub> bradykinin receptor, and these pathways are independent of nitric oxide. Immunohistochemistry of WT aortas indicates that TLR4 staining decreases across all cell layers when the aorta ring is incubated with DBK and LPS, while B1R staining significantly increases in the endothelial layer. Endothelial cell cultures (HBMEC) show perinuclear and even intranuclear receptor staining when treated with DBK and LPS, and treatment with DBK increases the

proximity points of B1R and TLR4. Factors secreted by glioblastoma cells (U87MG and T98G) also alter the staining pattern of these receptors and their response to agonists. Experiments on Swiss mice, inoculated or not with C6 cell lines and treated or not with DBK, demonstrate that the BBB transiently opens, increasing the bioavailability of the drug (doxorubicin) in the brain parenchyma and glioblastoma tumor mass. These data reinforce evidence of a connection between B1R and TLR4 signaling, a therapeutic target to be explored, and provide additional evidence for the use of the physiological B1R agonists for transient BBB opening for less than 48h, which would increase drug bioavailability in the brain parenchyma.

**Kew-words:** Toll-like 4 receptor, Kinin B<sub>1</sub> receptor, Des-Arg<sup>9</sup>-BK, Endothelial cells, Glioblastoma, Blood-brain barrier.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	O sistema caliceína–cinina e os receptores de cininas.....	<b>26</b>
<b>Figura 2:</b>	Visão geral da sinalização LPS/TLR4.....	<b>30</b>
<b>Figura 3:</b>	Exemplo de imagens de ressonância magnética de um paciente com glioblastoma.....	<b>32</b>
<b>Figura 4:</b>	A heterogeneidade celular no microambiente de glioblastoma.....	<b>34</b>
<b>Figura 5:</b>	Desafios no tratamento do glioblastoma.....	<b>37</b>
<b>Figura 6:</b>	Camada das células endoteliais dos vasos.....	<b>39</b>
<b>Figura 7:</b>	Esquema da barreira hematoencefálica.....	<b>41</b>
<b>Figura 8:</b>	Comparação da unidade neurovascular da barreira hematoencefálica e da barreira hematoencefálica tumoral.....	<b>45</b>
<b>Figura 9:</b>	Hipótese de interação entre B1R e TLR4.....	<b>55</b>
<b>Figura 10:</b>	A base estrutural de B1R e TLR4 para ancoragem molecular.....	<b>59</b>
<b>Figura 11:</b>	Figura esquemática do procedimento de eletrofisiologia.....	<b>61</b>
<b>Figura 12:</b>	Esquema de uma reação Duolink® PLA.....	<b>74</b>
<b>Figura 13:</b>	Reação de Griess.....	<b>76</b>
<b>Figura 14:</b>	Permeabilidade das HBMECs cultivadas em Transwell.....	<b>78</b>
<b>Figura 15:</b>	Perfil de interação B1R–TLR4 fornecido pelo STRING.....	<b>85</b>
<b>Figura 16:</b>	Modelos de ancoragem dos receptores B1R e TLR4.....	<b>86</b>
<b>Figura 17:</b>	Efeito dos agonistas de B1R e TLR4 em aorta torácica.....	<b>89</b>
<b>Figura 18:</b>	Hoe 140 inibe o efeito da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos B <sub>1</sub> KO.....	<b>90</b>
<b>Figura 19:</b>	A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6, B <sub>1</sub> KO e TLR4KO é independente do influxo de cálcio....	<b>91</b>
<b>Figura 20:</b>	A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos TLR4KO é constitutiva.....	<b>92</b>
<b>Figura 21:</b>	A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos B <sub>1</sub> KO e TLR4KO é dependente de K <sub>Ca</sub> .....	<b>93</b>
<b>Figura 22:</b>	A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos B <sub>1</sub> KO e TLR4KO é dependente de canais K <sub>ATP</sub> .....	<b>94</b>

<b>Figura 23:</b>	O LPS causa efeito na polarização de membrana de anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT e B <sub>1</sub> KO.....	<b>95</b>
<b>Figura 24:</b>	A retirada de B1R modifica a resposta ao LPS.....	<b>96</b>
<b>Figura 25:</b>	A atividade da DBK e LPS, em anéis de aorta torácica de camundongos, é independente de NOS.....	<b>98</b>
<b>Figura 26:</b>	Não há variação na expressão de RNAm de B1R em anéis de aorta torácica dos modelos animais estudados.....	<b>99</b>
<b>Figura 27:</b>	Expressão de RNAm de B2R em anel de aorta torácica.....	<b>100</b>
<b>Figura 28:</b>	A atividade das células endoteliais durante a eletrofisiologia não induz a expressão RNAm de TLR4 em anéis de aorta torácica.....	<b>101</b>
<b>Figura 29:</b>	Marcação de B1R e TLR4 em anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6.....	<b>103</b>
<b>Figura 30:</b>	Padrão de marcação de B1R e TLR4 em HBMEC.....	<b>105</b>
<b>Figura 31:</b>	Corte ortogonal e reconstrução 3D de HBMEC marcada para B1R e TLR4.....	<b>106</b>
<b>Figura 32:</b>	Quantificação relativa da marcação de B1R e TLR4 em HBMEC..	<b>107</b>
<b>Figura 33:</b>	Análise da expressão gênica de B1R e TLR4 em células endoteliais, na presença e ausência de DBK e LPS.....	<b>108</b>
<b>Figura 34:</b>	B1R e TLR4 apresentam-se com mais pontos de proximidade quando células endoteliais foram incubadas com DBK.....	<b>109</b>
<b>Figura 35:</b>	Efeito dos meios condicionados de U87MG e T98G em células endoteliais.....	<b>112</b>
<b>Figura 36:</b>	Marcação para proteína ZO-1 em HBMEC expostas aos meios condicionados de linhagens de glioblastoma.....	<b>114</b>
<b>Figura 37:</b>	Marcação para ZO-1 em HBMEC tratadas com MCT98G e MCU87 na ausência e presença de DBK.....	<b>117</b>
<b>Figura 38:</b>	O MCT98G altera a expressão de RNAm de ZO-1 e claudina-5 em células endoteliais, o que não ocorre quando adicionado DBK no meio.....	<b>119</b>
<b>Figura 39:</b>	Padrão de marcação de B1R e TLR4 em células endoteliais tratadas com MCT98G e MCU87 na ausência ou presença de DBK.....	<b>122</b>

<b>Figura 40:</b>	Níveis relativos da expressão de RNAm de B1R, B2R, TLR4 e NF-kB em células endoteliais incubadas, com MCT98G ou MCU87 com ou sem DBK.....	<b>126</b>
<b>Figura 41:</b>	Diminuição dos pontos de proximidade entre B1R e TLR4 em células HBMEC incubadas em MCT98G e MCU87 com DBK.....	<b>128</b>
<b>Figura 42:</b>	Atividade de NO em células HBMEC tratadas com meios condicionados de glioblastoma com e sem adição de DBK.....	<b>129</b>
<b>Figura 43:</b>	Passagem paracelular do complexo azul de Evans–BSA em ensaio de transwell com HBMEC.....	<b>131</b>
<b>Figura 44:</b>	A DBK promove a abertura transitória da BHE por intervalo menor que 48h.....	<b>133</b>
<b>Figura 45:</b>	Coloração histológica com cristal violeta.....	<b>134</b>
<b>Figura 46:</b>	Características histopatológicas do tumor de células C6.....	<b>134</b>
<b>Figura 47:</b>	A administração de DBK aumenta a biodisponibilidade de quimioterápico DOX no parênquima cerebral.....	<b>136</b>
<b>Figura 48:</b>	A administração de DBK aumenta a presença de quimioterápico DOX na massa tumoral de células C6.....	<b>138</b>
<b>Figura 49:</b>	Análise quantitativa de DOX no parênquima cerebral.....	<b>139</b>
<b>Figura 50:</b>	Ensaio de viabilidade celular MTT em linhagens de glioblastoma após exposição à DBK.....	<b>141</b>
<b>Figura 51:</b>	Gráfico de amplificação de RNAm de CYP2C8 em aorta torácica de camundongos C57BL/6 e em HBMEC.....	<b>143</b>
<b>Figura 52:</b>	Hipótese para resposta da relação entre B1R e TLR4.....	<b>153</b>
<b>Figura 53:</b>	Hipótese da ação de DBK para abertura transitória da barreira hematoencefálica.....	<b>165</b>
<b>Figura 54:</b>	Hipótese da ação de DBK para abertura transitória da barreira hematoencefálica para aumento da biodisponibilidade de fármacos para a massa tumoral de glioblastoma.....	<b>166</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b>	Gene-alvo e primers utilizados para detecção de sequências de RNAm.....	<b>67</b>
<b>Tabela 2:</b>	Curva padrão para Reação de Griess.....	<b>77</b>
<b>Tabela 3:</b>	Resultados do ClusPro mostrando as pontuações dos modelo escolhidos de ancoragem entre B1R e TLR4.....	<b>87</b>
<b>Tabela 4:</b>	Efeito da DBK e LPS no potencial de membrana (em mV) de anéis de artéria torácica de camundongos C57BL/6 WT, B <sub>1</sub> KO e TLR4KO.....	<b>88</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACh</b> .....	Acetilcolina (do inglês, <i>Acetylcholine</i> )
<b>AE</b> .....	Azul de Evans
<b>A.E</b> .....	Aorta Torácica Após Eletrofisiologia
<b>AgCl</b> .....	Cloreto de Prata
<b>ATP</b> .....	Trifosfato de Adenosina (do inglês, <i>Adenosine Triphosphate</i> )
<b>ATI</b> .....	Angiotensina I
<b>ATII</b> .....	Angiotensina II
<b>BHE</b> .....	Barreira Hematoencefálica
<b>BK</b> .....	Bradicinina (do inglês, <i>Bradykinin</i> )
<b>BSA</b> .....	Albumina Bovina Sérica (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>BTB</b> .....	Barreira Hematoencefálica Tumoral (do inglês, <i>Blood-Tumor Barrier</i> )
<b>B<sub>1</sub>KO</b> .....	Camundongos Nocautes para o Receptor B <sub>1</sub> de Cininas
<b>B<sub>1</sub>R</b> .....	Receptor B <sub>1</sub> de Cininas
<b>B<sub>2</sub>R</b> .....	Receptor B <sub>2</sub> de Cininas
<b>CaCl<sub>2</sub></b> .....	Cloreto de Cálcio
<b>CD14</b> .....	Cluster de Diferenciação 14 (do inglês, <i>Cluster of Differentiation Antigen 14</i> )
<b>CPM</b> .....	Carboxipeptidase M
<b>CTRL</b> .....	Controle Experimental
<b>C57BL/6</b> .....	Linhagem Isogênica de Camundongos
<b>C57BL/6J</b> .....	Linhagem Isogênica de Camundongos, criada pelo Laboratório Jackson
<b>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b> .....	Álcool Etílico
<b>C6</b> .....	Linhagem Celular de Glioma de Rato
<b>DBK</b> .....	Des-Arg <sup>9</sup> -Bradicinina (do inglês, <i>Des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin</i> )
<b>DMEM/F-12</b> .....	Meio de Eagle modificado por Dublelcco/ Mistura de nutrientes de Ham F-12 (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i> )
<b>DMEM/F-12 c/s</b> .....	Meio DMEM/F-12 com soro

<b>DMEM/F-12 s/s.....</b>	Meio DMEM/F-12 sem soro
<b>dNTP.....</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (do inglês, <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> )
<b>DOX.....</b>	Doxorrubicina
<b>ECA.....</b>	Enzima Conversora de Angiotensina
<b>EDHF.....</b>	Fator Hiperpolarizante Dependente do Endotélio (do inglês, <i>Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor</i> )
<b>EDTA.....</b>	Ácido Etilenodiamino Tetraacético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
<b>EGFR.....</b>	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
<b>eNOS.....</b>	Óxido Nítrico Sintase Endotelial (do inglês, <i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>FITC.....</b>	Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês, <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
<b>GAPDH.....</b>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> )
<b>GLI.....</b>	Glibenclamida (Inibidor de Canais K <sub>ATP</sub> )
<b>GLUT-1.....</b>	Transportador de Glicose 1 (do inglês, <i>Glucose Transporter 1</i> )
<b>GSC.....</b>	Célula-tronco de Glioblastoma (do inglês, <i>Glioblastoma Stem Cells</i> )
<b>HBMEC.....</b>	Linhagem de Células Endoteliais de Microcapilares Cerebrais Humanos (do inglês, <i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i> )
<b>HMWK.....</b>	Cinogênio de Alto Peso Molecular (do inglês, <i>High Molecular Weight Kininogen</i> )
<b>Hoe 140.....</b>	Antagonista Farmacológico para B <sub>2</sub> R
<b>IBTX.....</b>	Iberiotoxina (Inibidor de Canais K <sub>Ca</sub> )
<b>IDH1.....</b>	Gene Isocitrato Desidrogenase 1 (do inglês, <i>Isocitrate Dehydrogenase</i> )
<b>IL-6.....</b>	Interleucina-6
<b>iNOS.....</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzível (do inglês, <i>Inducible Nitric</i>

	<i>Oxide Synthase</i> )
<b>K<sub>ATP</sub></b> .....	Canais de Potássio ATP-dependentes
<b>K<sub>Ca</sub></b> .....	Canais de Potássio Dependentes de Cálcio
<b>KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b> .....	Alúmen de Potássio
<b>KNG1</b> .....	Cininogênio 1 (do inglês, <i>Kininogen 1</i> )
<b>LBP</b> .....	Proteína de Ligação ao LPS (do inglês, <i>LPS Binding Protein</i> )
<b>LMWK</b> .....	Cininogênio de Baixo Peso Molecular (do inglês, <i>Low Molecular Weight Kininogen</i> )
<b>L-NNA</b> .....	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina (Inibidor de Óxido Nítrico Sintase)
<b>LPS</b> .....	Lipopolissacarídeo
<b>Lys-BK</b> .....	Lys-Bradiginina (do inglês, <i>Lys-Bradykinin</i> )
<b>Lys-DBK</b> .....	Lys-Des-Arg <sup>9</sup> -Bradiginina (do inglês, <i>Lys-Des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin</i> )
<b>MCA</b> .....	Meio Condicionado de Astrócitos
<b>MCU87</b> .....	Meio Condicionado de Células de Linhagem U87MG
<b>MCT98G</b> .....	Meio Condicionado de Células de Linhagem T98G
<b>MD-2</b> .....	Fator de Diferenciação Mielóide 2 (do inglês, <i>Myeloid Differentiation Factor 2</i> )
<b>MgCl<sub>2</sub></b> .....	Cloreto de Magnésio
<b>MGMT</b> .....	O6-metilguanina-DNA metiltransferase (do inglês, <i>O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase</i> )
<b>MTT</b> .....	Brometo de 3-4,5-Dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (do inglês, <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i> )
<b>MyD88</b> .....	Fator de Diferenciação Mielóide 88 (do inglês, <i>Myeloid Differentiation Factor 88</i> )
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> .....	Bicarbonato de Sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> .....	Fosfato de Sódio Monobásico Anidro
<b>NaNO<sub>2</sub></b> .....	Nitrito de Sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> .....	Fosfato de Sódio Dibásico Anidro
<b>NED</b> .....	Cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (do inglês, <i>N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride</i> )

<b>NF-kB</b> .....	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (do inglês, <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )
<b>NGS</b> .....	Soro Normal de Cabra (do inglês, <i>Normal Goat Serum</i> )
<b>NH<sub>4</sub>Al(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O</b> .	Sulfato de Alumínio e Amônio
<b>NOS</b> .....	Óxido Nítrico Sintase (do inglês, <i>Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>PGI<sub>2</sub></b> .....	Prostaciclina
<b>PLA</b> .....	Ensaio de Ligação por Proximidade (do inglês, <i>Proximity Ligation Assay</i> )
<b>RMP</b> .....	Potencial de Membrana em Repouso (do inglês, <i>Resting Membrane Potential</i> )
<b>R715</b> .....	Antagonista Farmacológico para B1R
<b>R838</b> .....	Agonista Farmacológico para B1R
<b>SERCA</b> .....	Retículo Sarcoplasmático
<b>SD</b> .....	Ratos da Linhagem Sprague Dawley
<b>SDS</b> .....	Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SFB</b> .....	Soro Fetal Bovino
<b>SHR</b> .....	Ratos da Linhagem Espontaneamente Hipertensos (do inglês, <i>Spontaneously Hypertensive Rat</i> )
<b>TERT</b> .....	Transcriptase Reversa da Telomerase (do inglês, <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> )
<b>TGR(Tie2B<sub>1</sub>)</b> .....	Ratos Transgênicos que Superexpressam Receptor B <sub>1</sub> de Cininas em Células Endoteliais
<b>THAP</b> .....	Thapsigargina (Inibidor não competitivo da Ca <sup>2+</sup> -ATPase do Retículo Sarcoendoplasmático (SERCA))
<b>TLR2</b> .....	Receptor do Tipo Toll 2 (do inglês, <i>Toll-like Receptor 2</i> )
<b>TLR4</b> .....	Receptor do Tipo Toll 4 (do inglês, <i>Toll-like Receptor 4</i> )
<b>TLR4KO</b> .....	Camundongo Nocaute para o Receptor TLR4
<b>TMZ</b> .....	Temozolomida
<b>T98G</b> .....	Linhagem Celular de Glioblastoma Humano
<b>U87MG</b> .....	Linhagem Celular de Glioblastoma Humano
<b>VEGF</b> .....	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

<b>ZO-1</b> .....	Proteína de Zona Ocludente 1 (do inglês, <i>Zonula occludens-1</i> )
<b>199 c/s</b> .....	Meio 199 com soro
<b>199 s/s</b> .....	Meio 199 sem soro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
1	A ação das cininas no ambiente inflamatório.....	24
2	O TLR4 no microambiente inflamatório.....	28
3	Câncer: um panorama geral.....	31
3.1	Glioblastoma: princípios básicos.....	32
3.2	O microambiente tumoral.....	34
3.3	Tratamento para o combate ao glioblastoma.....	35
4	Angiogênese e as células endoteliais.....	37
4.1	A barreira hematoencefálica e a rede vascular em glioblastoma.....	40
4.2	A barreira hematoencefálica tumoral.....	43
4.3	A BHE/ BTB como alvo terapêutico.....	46
5	Os receptores de cininas no glioblastoma.....	49
5.1	Estratégia de ruptura da BHE via ativação dos receptores de cininas..	50
6	A ação do TLR4 e LPS no glioblastoma.....	51
6.1	Efeito da ativação de TLR4 em células endoteliais da BHE.....	52
7	A relação entre os receptores B1R e TLR4.....	54
	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
1	Objetivo geral.....	57
2	Objetivos específicos.....	57
2.1	Primeira parte.....	57
2.2	Segunda parte.....	57
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
1	Predição de interações proteína-proteína.....	59
2	Animais.....	60
3	Potencial de membrana.....	60
4	Ensaio <i>ex vivo</i> de aorta torácica.....	63
5	Cultivo celular.....	64
6	Análise da expressão gênica.....	66
7	Imunocitoquímica e imunohistoquímica.....	68

8	<i>In-Cell Western</i> .....	69
9	Coloração citológica com cristal violeta ou hematoxilina e eosina.....	71
10	Ensaio de ligação por proximidade.....	72
11	Método para determinação de nitrito e nitrato.....	76
12	Ensaio de permeabilidade paracelular.....	78
13	Experimento <i>in vivo</i> .....	79
14	Avaliação da integridade da barreira hematoencefálica <i>in vivo</i> com azul de Evans.....	80
15	Entrega de doxorrubicina em cérebro de camundongo.....	81
16	Coloração histológica com cristal violeta ou hematoxilina e eosina.....	82
17	Análise de viabilidade celular por ensaio de MTT.....	83
18	Análise de dados.....	84
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>85</b>
1	Ancoragem molecular entre B1R e TLR4.....	85
2	Parte 1: Relação entre B1R e TLR4 na resposta inflamatória.....	88
2.1	Potencial de membrana em anéis de aorta torácica.....	88
2.2	Antagonista de B2R bloqueia o efeito da DBK em aorta de camundongos B <sub>1</sub> KO.....	90
2.3	A atividade da DBK em aorta torácica dos camundongos B <sub>1</sub> KO e TLR4 é dependente de canais de K <sub>Ca</sub> e K <sub>ATP</sub> .....	91
2.4	O LPS hiperpolariza anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6 e B <sub>1</sub> KO, e essa não é inibida por antagonista de B1R.....	95
2.5	A resposta LPS/ TLR4 parece ser dependente da presença de B1R...	96
2.6	A atividade de DBK e LPS na membrana de anéis de aorta torácica é independente de NO.....	97
2.7	Não há aumento na expressão do RNAm de B1R, B2R e TLR4 em aorta torácica de camundongos após eletrofisiologia.....	99
2.8	Exposição à DBK e ao LPS induz o aumento de marcação para B1R nas células endoteliais dos anéis de aorta torácica.....	102
2.9	Alteração no padrão de marcação de B1R e TLR4 em células endoteliais expostas à DBK e ao LPS.....	104
2.10	Não há aumento na expressão do RNAm de B1R, B2R e TLR4 em	

	células HBMEC após exposição à DBK e ao LPS.....	108
2.11	DBK aumenta a proximidade de ligação entre B1R e TLR4.....	108
3	Parte 2: Modulação da barreira hematoencefálica pela DBK.....	111
3.1	Efeito dos meios condicionados de células de glioblastoma em células endoteliais.....	111
3.2	Análise de proteínas que compõem a BHE em células endoteliais expostas ao MCU87 e MCT98G na presença e ausência de DBK.....	116
3.3	Análise de B1R e TLR4 em células endoteliais expostas ao MCU87 e MCT98G na presença e ausência de DBK.....	120
3.4	DBK diminui a proximidade de ligação entre os receptores B1R e TLR4 em células endoteliais tratadas com meio condicionado de glioblastoma.....	127
3.5	A ativação de B1R por DBK gera uma resposta de NO em HBMEC cultivada em DMEM/F-12, mas não em meios condicionados de glioblastoma.....	128
3.6	DBK promove a abertura transitória da BHE.....	130
3.7	Efeito de DBK na entrega de DOX ao parênquima cerebral de camundongos.....	133
3.8	Efeito do tratamento com DBK nas linhagens de glioblastoma T98G, U87MG e C6.....	139
4	Ausência de expressão de CY2C8, candidato à EDHF, em nossos modelos experimentais.....	142
	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>146</b>
1	Interação TLR4-B1R como mecanismo de resposta inflamatória em células endoteliais.....	146
2	Modulação da barreira hematoencefálica pela des-Arg <sup>9</sup> -BK em condições normais e em ambiente tumoral de glioblastoma.....	154
3	CY2C8 não é o EDHF de células HBMEC expostas aos meios condicionados de linhagens de glioblastoma.....	166
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>169</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>170</b>



## INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta do sistema imunológico a estímulos prejudiciais, como patógenos, células danificadas, compostos tóxicos ou irradiação, atuando na remoção dos estímulos prejudiciais e iniciando o processo de cura (CHEN et al., 2017). De um modo geral, em resposta a um estímulo lesivo, o organismo animal reage com a liberação, ativação ou síntese de substâncias conhecidas como mediadores químicos ou farmacológicos da inflamação, que determinam uma série de alterações locais, que se manifestam inicialmente por dilatação de vasos da microcirculação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, controlada pela camada interna contínua de células endoteliais presente nos vasos, além do aumento da viscosidade do sangue e diminuição do fluxo sanguíneo (BOSSI et al., 2011; CHEN et al., 2017). Este processo de mitigação contribui para a restauração da homeostase tecidual e resolução da inflamação aguda que, quando não controlada, pode tornar-se crônica, contribuindo para uma variedade de doenças inflamatórias crônicas (CHEN et al., 2017).

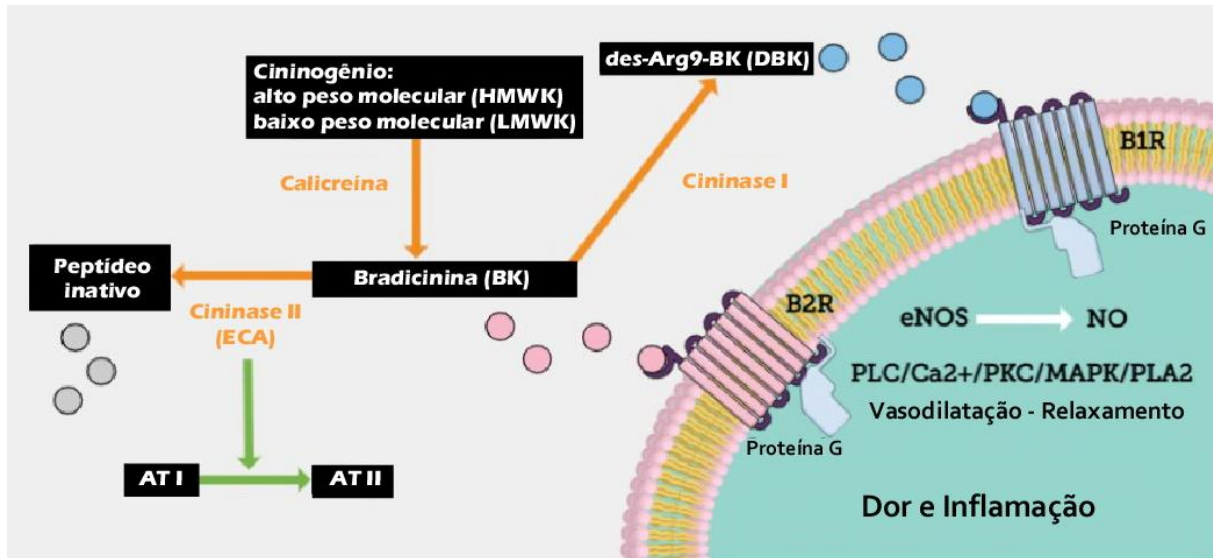
Há uma série de mediadores químicos com atuação vascular, com destaque às cininas plasmáticas, formadas pela ativação do fator XII da coagulação sanguínea, que levam à formação da bradicinina, potente agente vasodilatador e que aumenta a permeabilidade vascular (ROCHA E SILVA et al., 1949; BHOOLA et al., 1992).

### **1 A AÇÃO DAS CININAS NO AMBIENTE INFLAMATÓRIO**

A inflamação é a primeira resposta do organismo à lesão ou infecção, com o objetivo de reparar o tecido lesionado (GUEVARA-LORA, 2012). Entre uma variedade de modulares inflamatórios que desempenham papéis importantes nos tecidos nervosos temos os da família das cininas (GUEVARA-LORA, 2012; NICOLETTI et al., 2014), uma família de peptídeos vasoativos formadas no plasma e tecidos periféricos em resposta a trauma ou infecção, ou durante processos inflamatórios (REGOLI & BARABÉ, 1980; CAMPOS et al., 1999; LEVY et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; SUN et al., 2020).

O sistema das cininas é bastante complexo e interage com outros sistemas relacionados com o processo inflamatório, com a coagulação sanguínea e com o sistema complemento, da renina-angiotensina e da fibrinólise (BHOOLA et al., 1992). Com relação ao processo de formação de peptídeos bioativos, podemos dizer que, nos fluídos biológicos, ocorre ativação da pré-caliceína, transformando-a em caliceína e essa, por sua vez, atua sobre o cininogênio, liberando as cininas, que produzem seus efeitos biológicos interagindo com os seus receptores, sendo rapidamente metabolizadas pelas cininases (IMAMURA et al., 2004) **(Figura 1)**.

As cininas são oligopeptídeos sintetizados a partir da ativação de cininogênios pela ação das caliceínas, ativadas em situações de lesão tecidual e rapidamente inativadas por enzimas distribuídas pelos tecidos e no plasma, resultando na formação de metabólitos biologicamente ativos e peptídeos inativos, que contém a sequência da bradicinina (REGOLI & BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992; BOSSI et al., 2011; GUEVARA-LORA, 2012; HAMID et al., 2020) **(Figura 1)**. As cininas atuam principalmente como hormônios locais, que circulam em concentrações muito baixas (1 a 50 fmol/mL) e são rapidamente hidrolizados pelas cininases (DUTRA, 2017; HAMID et al., 2020). Seus efeitos biológicos são mediados pela ativação de dois receptores acoplados à proteína G, os receptores B1R e B<sub>2</sub> (BHOOLA et al., 1992; MARCEAU et al., 1998; DA COSTA et al., 2014), sendo que a bradicinina e a Lys-bradicinina (Lys-BK; do inglês, *Lys-Bradykinin*) exibem uma alta afinidade por B2R, e os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (Lys-DBK; do inglês, *Lys-Des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin*) por B1R (REGOLI & BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992; MARCEAU et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; SABOURIN et al., 2001; CAYLA et al., 2007) **(Figura 1)**. A liberação de BK e seus metabólitos ativos e suas interações com B1R ou B2R levam, por exemplo, a condições patológicas geralmente caracterizadas por aumento da permeabilidade vascular (MARCEAU et al., 1998; BOSSI et al., 2011).



**Figura 1: O sistema caliceína-cinina e os receptores de cininas.** O sistema caliceína-cinina inclui caliceínas teciduais e plasmáticas que atuam em cinogênios de baixo (LMWK) e alto peso molecular (HMWK) para produzir cininas bioativas, como a bradicinina (BK). Além disso, cininases circulantes e/ou teciduais, como enzima conversora de angiotensina (ECA), convertem BK em des-Arg<sup>9</sup>-BK ou em peptídeos inativos. Os efeitos celulares das cininas são mediados por dois receptores acoplados à proteína G: receptor B<sub>1</sub> de cinina (B1R) ou receptor B<sub>2</sub> de cinina (B2R), dos quais des-Arg<sup>9</sup>-BK e outros metabólitos ativos apresentam alta afinidade para B1R, enquanto BK e outros peptídeos ativos para B2R. A sinalização das cininas desempenha importantes papéis fisiológicos, como a indução de respostas vasodilatadoras, inflamatórias, formação de edema e tanto efeitos imunoproliferativos como antiproliferativos. B2R é expresso em condições fisiológicas enquanto B1R é, de preferência, induzível. A ativação de ambos os receptores de cinina promove a mobilização de cálcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>), a liberação de óxido nítrico (NO), ativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), dentre outros AT I: angiotensina I; AT II: angiotensina II; G: guanina; T: timina; A: adenina; C: citosina; Fosfolipase C (PLC); Proteína cinase C (PKC); Proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK); Fosfolipase A2 (PLA2) (Adaptado de Mind the Graph: <https://mindthegraph.com/infographic-templates/kinin-receptors> e DUTRA, 2017).

Os receptores B2R são constitutivos na maioria dos tecidos, enquanto que o receptor B1R está ausente ou fracamente expresso sob condições basais, mas pode ser regulado por mediadores pró-inflamatórios sob situações de estresse tecidual, como em câncer, sendo mediado pela MAP cinase e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (REGOLI & BARABÉ, 1980; SCHREMMER-DANNINGER et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2004; MERINO et al., 2008; DA COSTA et al., 2014; DUTRA, 2017).

Ambos os subtipos de receptores para cininas podem ser expressos pelo mesmo tipo de célula, como células endoteliais, fibroblastos e várias células tumorais, estando envolvidos em processos inflamatórios nos quais o uso de modelos animais geneticamente modificados e agonistas específicos contra esses

receptores ajudaram na determinação de seus papéis durante a inflamação aguda ou crônica (CAYLA et al., 2007; GUEVARA-LORA, 2012; RODRIGUES et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; DUTRA, 2017).

Eicosanóides, óxido nítrico, fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), ativador de plasminogênio tecidual e citocinas são reportados como mediadores de alguns dos efeitos das cininas (OZKOR & QUYYUMI, 2011; HAMID et al., 2020). A ativação desses receptores causa o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que, em células endoteliais, participa na cascata de mensageiros secundários, levando à síntese de óxido nítrico por óxido nítrico sintase (NOS) induzindo, assim, relaxamento vascular (BHOOLA et al., 1992; DA COSTA et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2019).

A fonte primária de NO nas células endoteliais da vasculatura é a eNOS (do inglês, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*) em condições normais, enquanto a iNOS (do inglês, *Inducible Nitric Oxide Synthase*) se torna proeminente em condições inflamatórias (LOWRY et al., 2013). A estimulação do B1R ou B2R ativa diferencialmente iNOS ou eNOS, respectivamente: em condições normais, B2R ativa a eNOS, resultando em uma curta explosão de produção de NO dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; em condições inflamatórias, a estimulação endotelial de B1R leva à ativação aguda de iNOS e produção prolongada e elevada de NO (MERINO et al., 2008; LOWRY et al., 2013; DA COSTA et al., 2014).

O aumento do cálcio citoplasmático das células endoteliais promove a hiperpolarização das células musculares lisas, resultante da também da abertura dos canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) no músculo liso; o aumento do cálcio intracelular livre nas células endoteliais abre canais de potássio dependentes de cálcio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), o que permitem efluxo e acúmulo de  $\text{K}^+$  para o espaço mioendotelial (MERINO et al., 2008; OZKOR & QUYYUMI, 2011). A atividade relacionada a canais  $\text{K}^+$  também podem desencadear um processo de hiperpolarização independente de NO, via EDHF, pois esses parecem trabalhar em sinergia para manter a saúde vascular (OZKOR & QUYYUMI, 2011).

Dado que os receptores de cininas envolvem vias de sinalização semelhantes, o sinal final para cada um é o ponto de diferença mais provável e estão pelo menos parcialmente subjacentes às diferenças significativas na

dessensibilização e internalização destes receptores (GUEVARA-LORA, 2012). Estudos estabeleceram que tanto B1R quanto B2R estão envolvidos no início e manutenção da inflamação, mas a fase aguda do processo inflamatório é atribuída principalmente a B2R que é rapidamente dessensibilizado após a ligação do agonista, enquanto que a inflamação crônica é atribuída principalmente ao B1R, que pode ser dessensibilizado apenas parcialmente (CAYLA et al., 2007; MEDEIROS et al., 2004; DUTRA et al., 2011; GUEVARA-LORA, 2012; DA COSTA et al., 2014). Durante condições inflamatórias existe troca de informação entre as células endoteliais e as células do músculo liso e a ligação do ligante a B1R pode gerar respostas funcionais necessárias para neutralizar alguns dos efeitos prejudiciais do processo inflamatório (BHOOLA et al., 1992; SCHREMMER-DANNINGER et al., 1998; PRAT et al., 2000).

Inflamações crônicas e infecções são importantes para o desenvolvimento tumoral (GUEVARA-LORA et al., 2013). Estudos indicam que os níveis de expressão dos receptores B1R e B2R apresentam um papel importante na transformação oncogênica que pode ser iniciada e promovida por processos inflamatórios que levam ao aparecimento do tumor, a transformação da malignidade e progressão tumoral (BHOOLA et al., 1992; RAIDOO et al., 1999; GUEVARA-LORA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; NICOLETTI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018), sendo o B1R crucial para o progresso e manutenção tumoral e B2R em mecanismos iniciais da tumorigênese (QADRI & BADER, 2018).

## **2 O TLR4 NO MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO**

No microambiente inflamado, a existência de sinalização associada a danos pode afetar o fenótipo e o status de ativação celular, bem como a infiltração de células imunes (ALVARADO et al., 2017). Essas interações celulares são mediadas por classes distintas de receptores que detectam e iniciam cascatas de sinalização pró-inflamatórias, como os receptores da família do tipo toll, que ativam vias de resposta inflamatória e são essenciais para o recrutamento de células imunes efetoras (ALVARADO et al., 2017).

Os receptores do tipo toll são uma família de proteínas transmembranares evolutivamente conservadas, classificadas como receptores de reconhecimento de

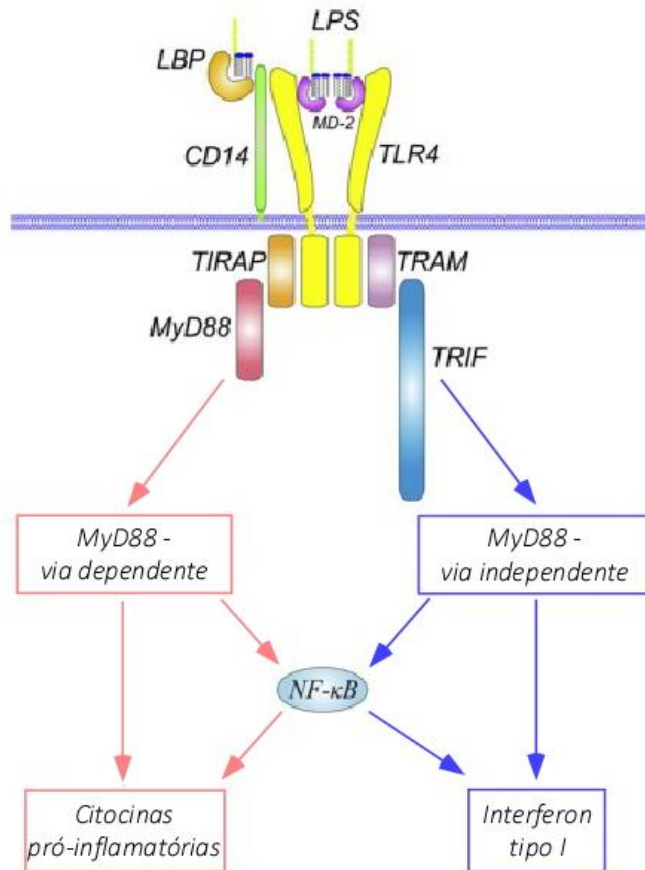
padrões, que estão presentes na superfície celular ou em vesículas endossomais (ADHIKARLA et al., 2021). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, como os bacterianos e de levedura, e também moléculas expressas por células (imunes e tumorais, por exemplo) durante o processo inflamatório (LU et al., 2008; HAN et al., 2017; QU et al., 2020; MEGÍAS et al., 2020; ADHIKARLA et al., 2021). Uma vez ativados, esses receptores medeiam liberação de citocinas e outras moléculas envolvidas na indução de mecanismos pró-inflamatórios (JOHNSON et al., 2018; ADHIKARLA et al., 2021).

TLR4 foi o primeiro membro da família identificado em muitos tipos de tumores, além de ser expresso em vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, miócitos cardíacos, células do sistema nervoso central (oligodendrócitos, microglia, astrócitos e neurônios), células-tronco e progenitoras de vários tecidos (ZEUNER et al., 2015; JOHNSON et al., 2018). Assim como os outros membros da família dos receptores do tipo toll, consiste em uma proteína transmembrana do tipo I contendo um domínio extracelular de repetições ricas em leucina e um domínio Toll/IL-1 que são essenciais para ativação das vias de sinalização (ADHIKARLA et al., 2021).

Além desses padrões moleculares associados à patógenos como o LPS, o TLR4 reconhece a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório, além de interagir com proteínas de choque térmico (COSTA et al., 2020), ácido hialurônico e beta-defensina 2 (LU et al., 2008). Para mais, o TLR4 também pode reconhecer componentes celulares, como ácidos graxos saturados, angiotensina e moléculas da matriz extracelular (GRUFFAZ et al., 2017).

A via de sinalização desencadeada pela ativação de TLR4 depende da natureza do ligante, podendo induzir cascatas de sinalização dependente ou não do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), sendo que a cascata dependente de MyD88 provoca a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a independente estimula a produção de interferon tipo I (LU et al., 2008; ZEUNER et al., 2015). Quando ativado por LPS, o processo de ativação depende da interação entre esse, TLR4 e as proteínas CD14, MD-2 e proteína de ligação ao LPS (LBP) (LU et al., 2008) (**Figura 2**). A presença do TLR4 em sua conformação normal permite a ativação correta das vias de sinalização em resposta ao LPS, mas modificações na estrutura do receptor

podem impactar na interação com outras proteínas e, conseqüentemente, alterar a resposta ao LPS (LU et al., 2008).



**Figura 2: Visão geral da sinalização LPS/TLR4.** O reconhecimento de LPS é facilitado pela proteína LBP e pela proteína CD14 (do inglês, *Cluster of Differentiation Antigen 14*), e é mediado pelo complexo receptor TLR4/MD-2 (Fator de Diferenciação Mielóide 2). A sinalização LPS/TLR4 pode ser via dependente ou independente de MyD88 (Fator de diferenciação mielóide 88); que medeiam a ativação de citocinas pró-inflamatórias e expressão de interferon tipo I. TIRAP – Proteína Adaptadora Contendo o Domínio Toll-interleucina-1 (TIR); TRAM – Glicoproteína de Translocação de Proteína de Membrana Associada à Cadeia; TRIF – Interferon Beta Indutor de Proteína Adaptadora Contendo Domínio TIR (receptor Toll/interleucina-1); NF-κB - Fator Nuclear Kappa B. (Adaptado de LU et al., 2008)

Os receptores do tipo toll são alvos cruciais de drogas porque sua ativação pode estimular respostas imunes e modificar o resultado de vários distúrbios, como infecções e câncer (MEGÍAS et al., 2020). No contexto do câncer, possuem funções pró e antitumorígenicas, a depender do tipo de receptor e de população celular (RAJPUT et al., 2013; ALVARADO et al., 2017; JOHNSON et al., 2018). A ação antitumorígenica dessa família de receptores é, geralmente, devido à indução de resposta imune antitumoral através da ativação de células dendríticas (ALVARADO

et al., 2017). Já os papéis pró-tumorigênicos são mediados diretamente por macrófagos associados a tumores, células dendríticas e células endoteliais, com a produção de citocinas mediada por receptores da referida família (ALVARADO et al., 2017).

Os receptores do tipo toll são descritos como potencial biomarcadores na biologia do câncer, especificamente o receptor do tipo toll 2 (TLR2) na progressão metastática e TLR4 na sobrevivência tumoral e quimiorresistência (KINA et al., 2019).

A importância de TLR4 em tumores de ovário, cabeça e pescoço e pulmão já está bem descrita, indicando uma clara ligação entre a sinalização de desse receptor inflamação, quimiorresistência e sensibilidade a apoptose. (TEWARI et al., 2012). Em câncer de mama, por exemplo, a ativação de TLR4 aumenta a resistência ao quimioterápico paclitaxel em células tumorais, ativando a via do NF- $\kappa$ B, levando à transcrição de genes inflamatórios que alteram o ambiente do tumoral, podendo reduzir significativamente a eficácia terapêutica por promoção da inflamação crônica, angiogênese e recuperação de células danificadas, caminhos que pode promover metástase (RAJPUT et al., 2013).

### **3 CÂNCER: UM PANORAMA GERAL**

O câncer é uma das principais causas de morte por doença no mundo, causando grandes impactos em nossa sociedade (SANTOS et al., 2023). A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em partes pelo envelhecimento e crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (FAN et al., 2022; INCA, 2023). Estima-se, para o Brasil, 704 mil novos casos de câncer para o ano de 2023 (SANTOS et al., 2023).

O câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) representa em torno de 1,6% entre todos os tipos de câncer (INCA, 2023). Apesar de relativamente raro, com cerca de 340 mil casos no ano de 2019, esse tipo de câncer possui alta relevância clínica, uma vez que é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade (FAN et al., 2022). No Brasil, eles variam entre o oitavo e décimo primeiro lugar de

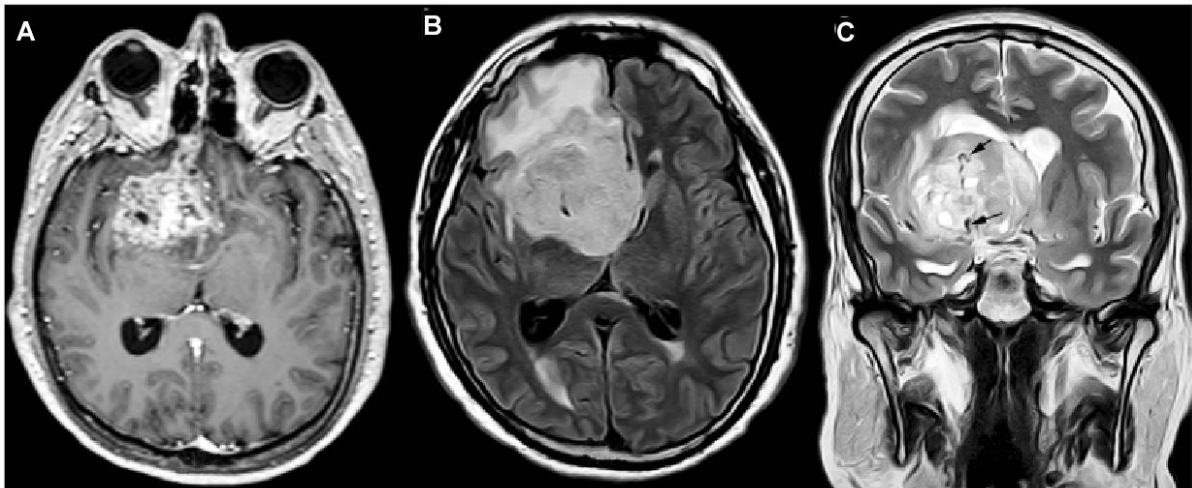


frequência, a depender da região do país e do sexo, com número estimado de 11.490 casos por ano do triênio 2023-2025 (INCA, 2023).

### 3.1 GLIOBLASTOMA: PRNCÍPIOS BÁSICOS

Os pacientes com gliomas podem apresentar vários sintomas neurológicos, como dores de cabeça, convulsões, déficits neurológicos focais, perda de memória, alterações de personalidade, vômito e alterações visuais (VAN TELLINGE et al., 2015).

O glioblastoma é o mais comum e o mais agressivo dos tumores cerebrais, com origem astrocítica (ZONG et al., 2015; KANE, 2019), apresentando atipia nuclear, alto índice de proliferação de sua massa celular, proliferação de células endoteliais na formação de novos vasos, necrose e aberrações genômicas (VAN TELLINGEN et al., 2015; KANE, 2019). Sua localização anatômica não difere dos outros tipos de gliomas, sendo normalmente localizado na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais, com maior incidência no lobo frontal (25-43%), temporal (19–28%), parietal (12–25%) e occipital (3%) (LARJAVAARA et al., 2007; PERRIN et al., 2019) (**Figura 3**).



**Figura 3: Exemplo de imagens de ressonância magnética de um paciente com glioblastoma. A)** Imagem axial indicando a massa tumoral na região frontal direita. **B)** Imagem axial indicando o líquido do edema peritumoral. **C)** Imagem coronal revelando vasos macroscópicos anormais (setas) dentro do tumor (neovascularização). (Adaptado de GUZMÁN-DE-VILLORIA et al., 2014)

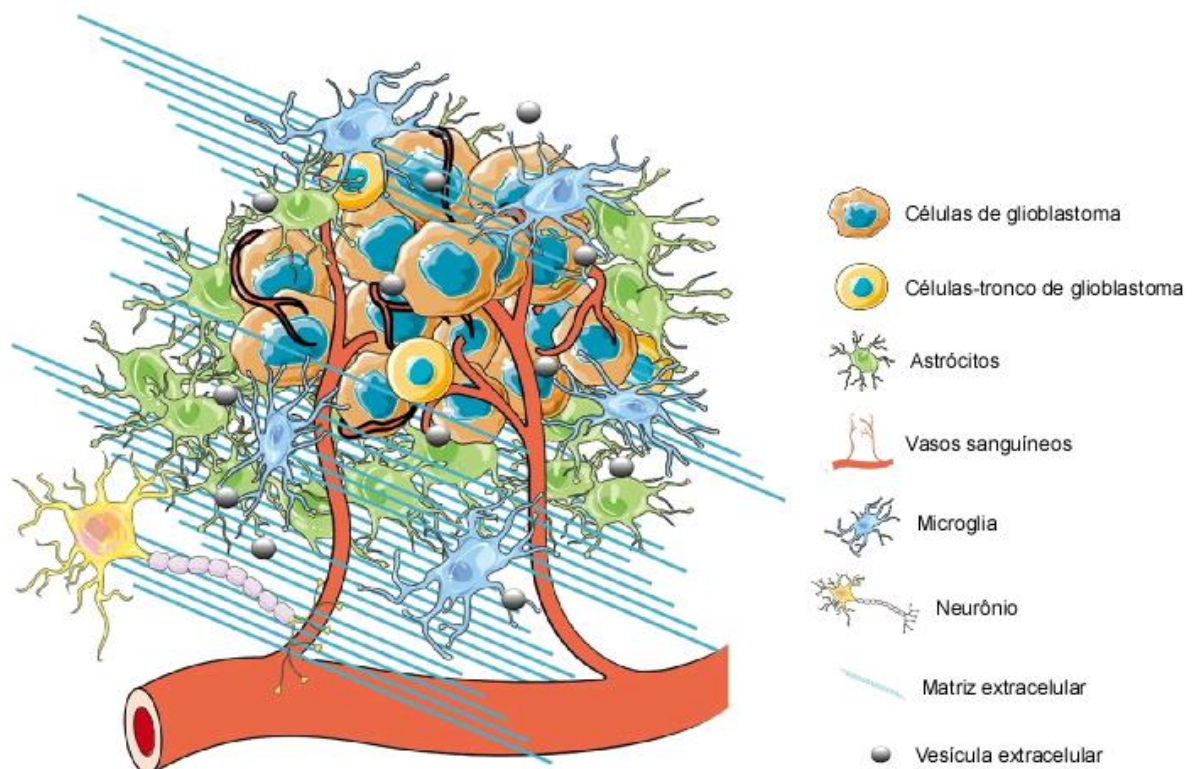
Até 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificava os tumores cerebrais do grau I ao IV, principalmente com base nas análises morfológicas,

imunológicas e moleculares (SHARMA et al., 2020), porém, uma nova classificação foi proposta pela OMS (5ª Edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da OMS), levando em consideração a análise de mutações no gene isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), relacionada ao metabolismo celular, mais especificamente ao ciclo de Krebs, e o status de codeleção de 1p19q, deleções no braço curto do cromossomo 1 e deleções no braço longo do cromossomo 19 (MOLINARO et al., 2019; LOUIS et al., 2021). A enzima IDH1 catalisa a reação do isocitrato para alfacetogluturato; a mutação nas isoformas 1 e 2 produz o oncometabólito 2-hidroxiogluturato, inibindo as funções de enzimas dependentes do alfacetogluturato. Mais de 90% dessas mutações ocorrem no resíduo 132 da IDH1, que é a alteração identificada por técnica da imuno-histoquímica, permitindo identificar o gene em mutante ou selvagem.

Assim, os gliomas difusos comuns em adultos foram classificados nos subtipos: (1) astrocitoma IDH-mutante; (2) oligodendroglioma IDH-mutante e codeleção de 1p19q; (3) glioblastoma IDH-tipo selvagem (MOLINARO et al., 2019; LOUIS et al., 2021; CRUZ et al., 2022). Molinaro e colaboradores (2019) destacam que dois aspectos do novo diagnóstico integrado da OMS são particularmente importantes: oligoastrocitomas não são mais reconhecidos como uma entidade separada, com a mutação IDH1 e status de codeleção 1p19q, refletindo o perfil genético de astrocitoma (1p19q intacto) ou oligodendroglioma (1p19q codeleção); e quando a histologia e as características moleculares são discordantes, as características moleculares muitas vezes se tornam o principal determinante da classificação. Assim, nesta nova classificação, somente são considerados glioblastoma os tumores IDH-selvagem, com a caracterização adicional: amplificação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico; do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*); ganho no cromossomo 7, perda no cromossomo 10 e a presença de mutação no promotor TERT (codifica a subunidade catalítica da telomerase responsável pelo alongamento dos telômeros no final dos cromossomos) (LOUIS et al., 2021; CRUZ et al., 2022). Independentemente da histologia do tumor, se qualquer uma dessas alterações moleculares for encontrada, o paciente agora é considerado glioma astrocítico difuso, tipo IDH-selvagem, com características moleculares de glioblastoma grau IV da OMS (MOLINARO et al., 2019).

### 3.2 O MICROAMBIENTE TUMORAL

A literatura especializada tem mostrado a importância do microambiente tumoral na regulação da progressão do tumor (OLIVEIRA et al., 2018; SIMON et al., 2020). As células de glioblastoma e as células-tronco de glioblastoma (GSC; do inglês, *Glioblastoma Stem Cells*) são incorporadas em um microambiente tumoral heterogêneo, composto pelas diversas células estromais (células vasculares, células imunes residentes e infiltrantes, e outros tipos de células gliais não neoplásicas) e compartimentado em regiões anatomicamente distintas, denominados nichos tumorais (DE VLEESCHOUWER & BERGERS, 2017; QUAIL & JOYCE, 2017; ALVES et al., 2021; SIMON et al., 2020; CRUZ et al., 2022) (**Figura 4**). Os componentes celulares mais relevantes no microambiente tumoral são as células gliais não tumorais e as células endoteliais, que podem interagir diretamente com as células de glioblastoma e/ou liberar moléculas solúveis, desencadeando vias de sinalização que promovem a invasão celular e induzem a dediferenciação de células astrocíticas (PERRIN et al., 2019; NUNNO et al., 2022; ERICES et al., 2023).



**Figura 4: A heterogeneidade celular no microambiente do glioblastoma.** A comunicação multidirecional constante entre células de glioblastoma e células normais do estroma, como células endoteliais ou astrócitos, permite que o tumor sequestre seu microambiente circundante, desencadeando um microambiente de suporte ao tumor, rico

em vesículas extracelulares, citocinas e fatores de crescimento, por exemplos. (Adaptado de SIMON et al., 2020).

No microambiente tumoral, a existência de sinalização aberrante associada a danos pode afetar o fenótipo e status de ativação de células tumorais (NUNNO et al., 2022; SHARMA et al., 2023). As células do glioma regulam as funções dos componentes celulares e não celulares do microambiente tumoral, regulando as necessidades metabólicas, vigilância imunológica, sobrevivência, invasão, bem como a manutenção das GSCs, além da proliferação microvascular e/ou necrose (ALVARADO et al., 2017; DE VLEESCHOUWER & BERGERS, 2017; NUNNO et al., 2022; ERICES et al., 2023; SHARMA et al., 2023).

Todas as mudanças no metabolismo energético têm consequências na regulação do volume celular, na síntese da matriz extracelular e aumento da motilidade celular, bem como reprogramação epigenética que é necessária para a invasão de células tumorais de glioblastoma no tecido saudável circundante (PERRIN et al., 2019).

O fornecimento de nutrientes da massa tumoral pode variar devido à heterogeneidade da neoangiogênese da rede vascular do glioblastoma, que influenciam na biodisponibilidade de oxigênio na massa tumoral, influenciando nas propriedades metabólicas do microambiente tumoral e o uso energético de suas células (PERRIN et al., 2019; SHARMA et al., 2023). O baixo teor de oxigênio da massa tumoral induz as células produzirem altos níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF; do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), principal fator responsável pelo processo angiogênico (CARMELIET, 2000; PERRIN et al., 2019).

### 3.3 TRATAMENTO PARA O COMBATE AO GLIOBLASTOMA

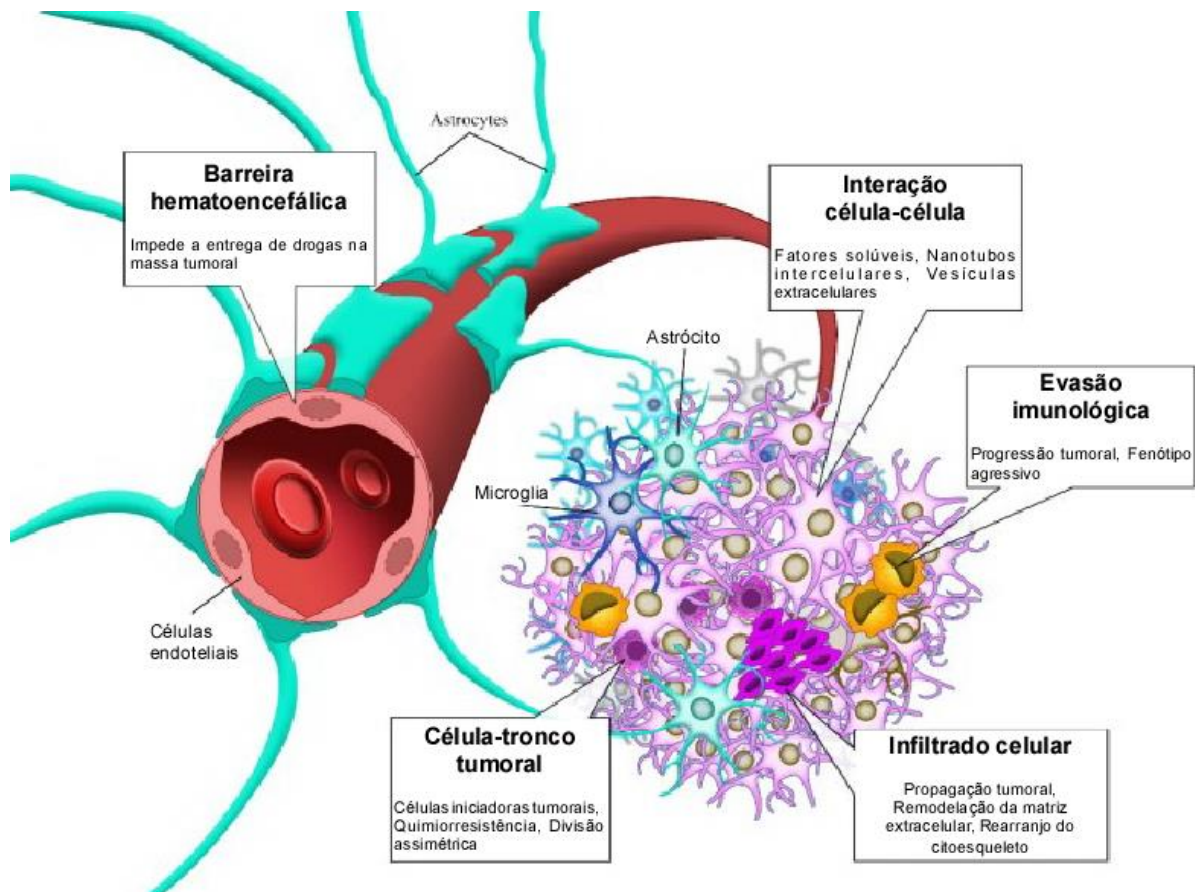
A sobrevida estimada global em cinco anos para o paciente com glioblastoma é de apenas 6,8%, com prognóstico dos pacientes recém-diagnosticados variando de 12 a 18 meses (NUNNO et al., 2022; WU et al., 2023).

Atualmente, após avaliação clínica, a realização do diagnóstico por imagem e análises histopatológicas e moleculares a partir de fragmentos tumorais, a terapia

recomendada para pacientes com glioblastoma é a ressecção cirúrgica seguida por radioterapia adjuvante em combinação com quimioterapia (SUN et al., 2020), que apresenta como principal medicamento utilizado a temozolomida (TMZ), um agente alquilante capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e considerado padrão ouro para tratamento de pacientes diagnosticados com glioblastoma (MEGÍAS et al., 2020; ABBASZADE et al., 2021; CRUZ et al., 2022). Porém, esse não descarta o prognóstico desanimador do paciente, com cerca de 25% dos pacientes apresentando sobrevida de 2 anos após o tratamento padrão (LIU et al., 2019; CHAI et al., 2021; SMITH-COHN et al., 2021).

Os quimioterápicos atualmente disponíveis não atravessam a BHE de forma eficiente, além de haver resistência das células tumorais a esses agentes (NICOLETTI et al., 2017). A maior ou menor resistência das células tumorais ao agente genotóxico depende do conjunto de alterações genéticas que ela apresenta (CHAI et al., 2021). A principal razão, por exemplo, para a resistência ao TMZ é a superexpressão de O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) pelas células tumorais, sendo essa uma enzima envolvida no reparo de danos no DNA que podem remover grupos metil ou alquil, assim invalidando o efeito da TMZ e provocando resistência aos medicamentos (ABBASZADE et al., 2021; ALVES et al., 2021; CHAI et al., 2021).

Além da resistência terapêutica ao TMZ e outros quimioterápicos, uma das causas do prognóstico tão insatisfatório é a facilidade de migração das células formadoras do glioblastoma para o tecido cerebral saudável que circunda a massa tumoral, o que impede a ressecção total (VAN TELLINGEN et al., 2015; KANE, 2019; SHARMA et al., 2020; ALVES et al., 2021; CRUZ et al., 2022) (**Figura 5**). Ademais, é importante considerar a heterogeneidade celular e plasticidade das células de glioblastoma, com alterações na expressão gênica, presença de condições específicas do microambiente tumoral e a barreira hematoencefálica (ALVES et al., 2021).



**Figura 5: Desafios no tratamento do glioblastoma.** O glioblastoma possui características que o torna tão maligno e difícil de tratar. Células infiltrativas, evasão imunológica, células-tronco capazes de repovoar a massa tumoral após tratamento e troca de fatores solúveis e vesículas entre as células tumorais, formam um complexo microambiente que, juntamente com a barreira hematoencefálica que dificulta a entrada de moléculas no tecido cerebral reduzindo as opções farmacológicas para o tratamento deste tumor, contribui para a dificuldade no avanço terapêutico do glioblastoma. (Adaptado de CRUZ et al., 2022)

Um alvo terapêutico muito estudado para combate ao glioblastoma é a sua angiogênese (BERGERS & BENJAMIN, 2003). Tratamentos antiangiogênicos têm sido extensivamente investigados, incluindo anticorpos monoclonais, como o bevacizumabe, que inibem a função do VEGF, ou pequenas moléculas que têm como alvo seu receptor, mas estes tratamentos apontam serem pouco eficazes, mesmo em combinação com a TMZ (PERRIN et al., 2019; ALVES et al., 2021).

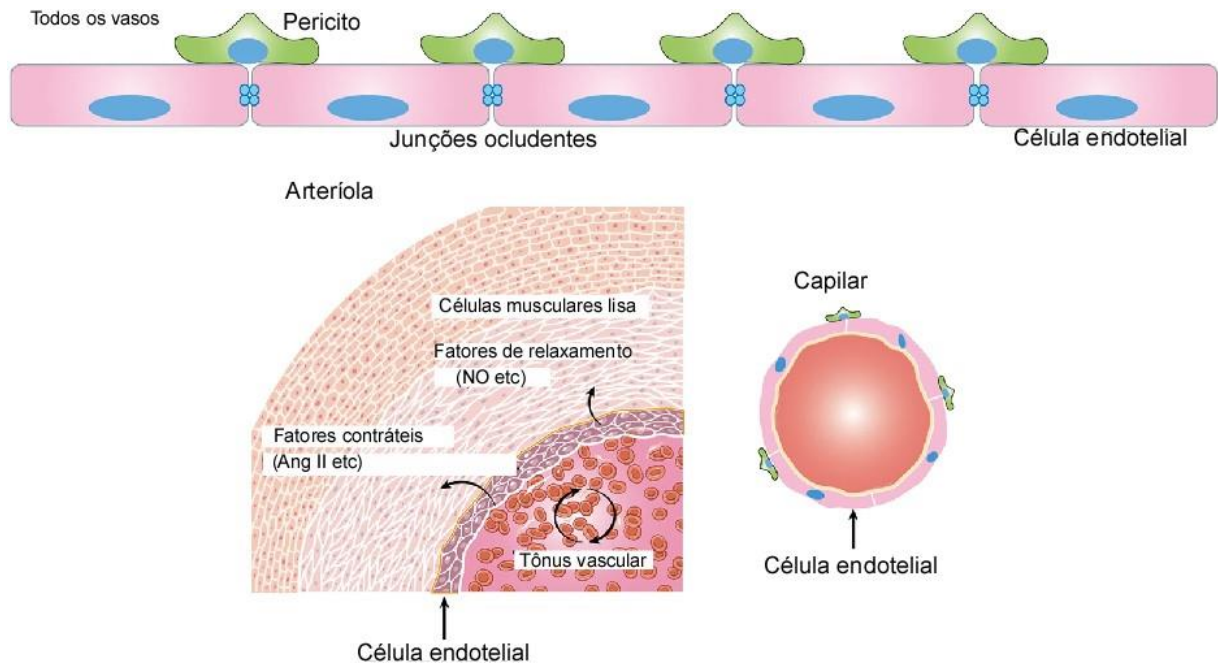
#### 4 ANGIOGÊNESE E AS CÉLULAS ENDOTELIAIS

A angiogênese é um processo normal e essencial sob circunstâncias fisiológicas controladas, estando presente no desenvolvimento embrionário e no crescimento ao longo dos primeiros anos (OLIVEIRA et al., 2013). Na idade adulta, a angiogênese pode ser observada no aparelho reprodutor feminino a cada ciclo

menstrual, na gravidez, na cicatrização de feridas e na seqüência de processos inflamatórios (PLENDL et al., 2000).

A angiogênese depende do contato quimiotático entre células endoteliais microvasculares, o que resulta de uma ordem de eventos denominado 'cascata angiogênica', que inclui migração, proliferação e maturação de células endoteliais (PLENDL et al., 2000). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos tecidos, tendo os vasos aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido, com a heterogeneidade de células endoteliais determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos, como VEGF e angiopoietina 1 e 2, que variam expressivamente nos diferentes tecidos (BENJAMIN & KESHET, 1997; CARMELIET, 2000; CARMELIET, 2003; OLIVEIRA et al., 2013).

Células endoteliais encontram-se principalmente na camada interna de todos os vasos sanguíneos (CARMELIET, 2000; JIN et al., 2020). A monocamada de células endoteliais é normalmente protegida por pericitos e essas são unidas entre si por junções ocludentes que tem como outra função importante controlar a passagem de moléculas e células para os locais extra vasculares onde serão necessários para fins nutricionais e de defesa (WEISS et al., 2009; BOSSI et al., 2011; JIN et al., 2020) (**Figura 6**). A perturbação das células endoteliais induz a ativação celular e tem consequências funcionais, resultando na perturbação das junções ocludentes e saída para regiões extra vasculares, alterações geralmente associadas a processos inflamatórios, manifestações sistêmicas, como sepse, ou reações localizadas (BOSSI et al., 2011).



**Figura 6: Camada das células endoteliais dos vasos.** As células endoteliais existem na camada interna dos vasos sanguíneos, como artérias e capilares. São normalmente protegidas por pericitos que sustentam a estrutura do vaso. As junções ocludentes ligam as células vizinhas e ajudam a manter a integridade dos tecidos, agindo como barreiras à permeabilidade. Fatores liberados pelas células endoteliais regulam o tônus vascular e a permeabilidade após serem ativados. (Adaptado de JIN et al., 2020)

A camada de células endoteliais dos vasos possui como função comum conservar o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, a permeabilidade e a regulação do tônus vascular (BAHIA et al., 2006; BOSSI et al., 2011; JIN et al., 2020). As células endoteliais são mecanossensores do sistema cardiovascular, estando expostas a forças hemodinâmicas na forma de uma força de arrasto friccional chamada tensão de cisalhamento e esta, quando em baixa tensão, está associada à proliferação de células endoteliais, juntamente com a expressão de moléculas inflamatórias e aumento da sensibilidade a estímulos inflamatórios (BAHIA et al., 2006; BOSSI et al., 2011; RIBEIRO-SILVA et al., 2021). Nesses, as células endoteliais sintetizam e liberam fatores de relaxamento derivados do endotélio, como o óxido nítrico (NO; do inglês, *Nitric Oxide*) (CARMELIET, 2000; JIN et al., 2020). Quando ativadas, as células endoteliais secretam moléculas quimioatraentes, citocinas e moléculas de adesão, levando a uma permeabilidade aumentada dos vasos sanguíneos (JIN et al., 2020).

No contexto da angiogênese tumoral, a expressão do VEGF é regulada positivamente como consequência da ativação do oncogene ou da perda do



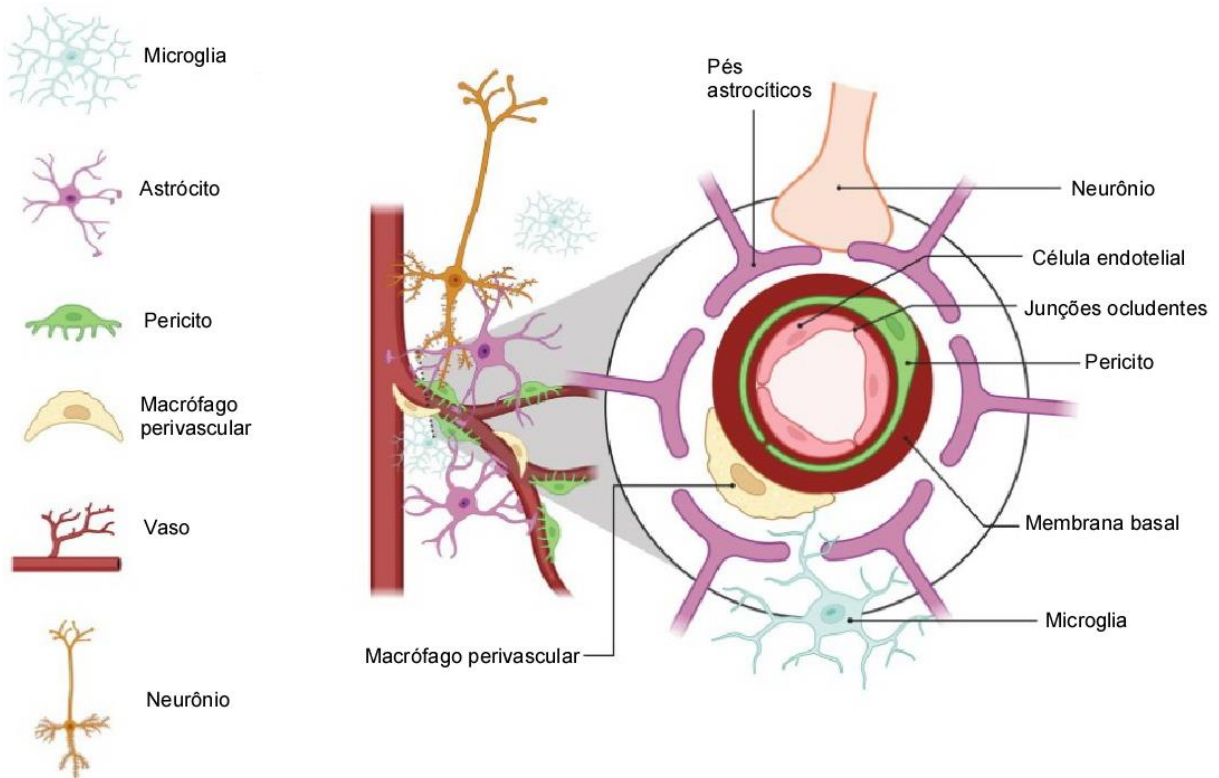
supressor tumoral (BENJAMIN & KESHET, 1997), sendo sua expressão aumentada correlacionada com o aumento do crescimento e vascularização do tumor e a inibição da produção ou função do VEGF à inibição do crescimento do tumor (BENJAMIN & KESHET, 1997).

#### 4.1 A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E A REDE VASCULAR EM GLIOBLASTOMA

A vasculatura cerebral é constituída de uma complexa rede formada por artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias que regulam o fluxo sanguíneo cerebral e a função cerebral normal (KANE, 2019). Nesses vasos, as células endoteliais estão alinhadas formando uma monocamada na parede interna e, em condições fisiológicas, é responsável pela manutenção do tônus vascular e homeostase intravascular (CHAO et al., 2017; BAHIA et al., 2006).

As células endoteliais dos vasos cerebrais são caracterizadas por uma aparência achatada, a expressão de junções ocludentes, a presença de poucas cavéolas na superfície luminal e um grande número de mitocôndrias em comparação com as células endoteliais de outros distritos vasculares (KADRY et al., 2020).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira celular seletiva, que separa os componentes sanguíneos do microambiente cerebral, regulando a entrada e saída de íons, nutrientes, macromoléculas e metabólitos, protegendo o SNC de substâncias neurotóxicas e garantindo a nutrição do cérebro (ABBOTT et al., 2006; VAN TELLINGEN et al., 2015; QUAIL & JOYCE, 2017; JOHNSON et al., 2018; KANE, 2019). Ela é formada por monocamada de células endoteliais cerebrais conectadas por junções ocludentes, e que interagem com células vizinhas, como astrócitos, pericitos e macrófagos perivasculares, formando uma unidade neurovascular (ABBOTT et al., 2006; WEISS et al., 2009; VAN TELLINGEN et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2015; QUAIL & JOYCE, 2017; KANE, 2019; ARVANITIS et al., 2020; STEEG, 2021) (**Figura 7**).



**Figura 7: Esquema da barreira hematoencefálica.** A estrutura da BHE é exibida com um corte transversal indicando o arranjo da célula endotelial, pericitos, membrana basal, macrófago perivascular, pés astrocíticos, neurônio e microglia. A lâmina basal fornece suporte e estrutura à BHE; os pericitos estão inseridos na membrana basal dos vasos, mediando o desenvolvimento vascular, fluxo sanguíneo, polarização dos pés astrocíticos e prevenção de vazamento da BHE; os macrófagos perivasculares monitoram antígenos e regulam o movimento de macromoléculas; os pés astrocíticos cercam os vasos e a membrana basal, produzindo fatores que contribuem para a manutenção da BHE e expressão de junções ocludentes; a vasculatura recebe sinais dos neurônios na área circundante, alterando o fluxo sanguíneo local. (Adaptado de MAYER & FISCHER, 2024)

Os pericitos são constituintes essenciais dos capilares cerebrais, Compartilham uma membrana basal com as células endoteliais e estabelecem contatos focais diretos com o endotélio através de N-caderina e conexinas (KADRY et al., 2020). Os astrócitos estão relacionados ao estreitamento do endotélio, contribuindo com a diminuição do transporte paracelular (KADRY et al., 2020), destacando que na interface de contato entre os pés astrocíticos e a lâmina basal superficial ou perivascular há uma grande densidade de transportadores de ânions orgânicos intramembranosos, que diminui onde a membrana da célula glial perde contato com a lâmina basal (KADRY et al., 2020; MAYER & FISCHER, 2024). Já as microglias estão associadas à neovascularização do SNC, fornecendo uma estrutura para o crescimento e desenvolvimento de vasos sanguíneos (MAYER & FISCHER, 2024). Embora não seja comumente associada à BHE, as microglias interagem e se

comunicam com as células vasculares cerebrais, auxiliando na regulação de solutos, substâncias químicas e antígenos que entram no parênquima cerebral (MAYER & FISCHER, 2024).

Com exceção de algumas moléculas muito pequenas ou gasosas, o fluxo paracelular de moléculas hidrofílicas, até pequenos íons, através do endotélio da BHE é impedido pelas junções ocludentes que selam as vias paracelulares entre as células endoteliais adjacentes, além de ser uma barreira ao redor da célula, separando sua porção luminal da região basolateral (ABBOTT et al., 2006; WEISS et al., 2009; VAN TELLINGEN et al., 2015; KANE, 2019; ARVANITIS et al., 2020; KADRY et al., 2020). Os domínios extracelulares de cada proteína transcelular se associam, formando barreiras estáveis que podem se adaptar ao ambiente e apresentar plasticidade (WHELAN et al., 2021; Mayer & Fischer, 2024).

As proteínas de junção ocludentes incluem ocludinas, claudinas e moléculas de adesão juncional (ABBOTT et al., 2006; ARVANITIS et al., 2020; Mayer & Fischer, 2024). Dentre as proteínas com domínio intra e extracitoplasmático, encontram-se as ocludinas e a claudinas, que apresentam em suas caudas citoplasmáticas sítios de ligação para as proteínas de zona ocludente (ZO) (BAZZONI & DEJANA, 2004; WHELAN et al., 2021). As ZOs ligam as proteínas de junção ocludentes ao citoesqueleto por meio de filamentos de actina, o que resulta em uma rede de proteínas ocludentes fortemente incorporadas e hermeticamente fechadas (WEISS et al., 2009; VAN TELLINGEN et al., 2015; WHELAN et al., 2021). Além dessas, caderinas, VE-caderina e conexina-43 regulam a sinalização intracelular, via proteínas ZO e  $\beta$ -catenina, modulando o rearranjo do citoesqueleto de actina para diminuir o espaço extracelular entre as células endoteliais, evitando o transporte paracelular (BAZZONI & DEJANA, 2004; ARVANITIS et al., 2020).

A presença de sistemas de transporte específicos na membrana luminal e abluminal regulam o tráfego transcelular de pequenas moléculas hidrofílicas, o que proporciona uma 'barreira de transporte' seletiva, permitindo ou facilitando a entrada de nutrientes necessários, como o transportador de glicose GLUT-1 (do inglês, *Glucose Transporter 1*), e excluindo ou efluindo compostos potencialmente nocivos (ABBOTT et al., 2006).

Como as junções ocludentes restringem severamente a entrada de fármacos hidrofílicos e há penetração limitada de moléculas maiores, como peptídeos, as estratégias para a entrega de fármacos ao SNC precisam levar essas características em consideração (ABBOTT et al., 2006).

A BHE não é homogênea, apresentando permeabilidade variável ao longo da vasculatura, com mais permeabilidade em vasos grandes e menos permeabilidade nos menores, podendo ser alterada sob condições patológicas, como esclerose múltipla, epilepsia, derrame e cânceres cerebrais (ABBOTT et al., 2006; WEISS et al., 2009; VAN TELLINGEN et al., 2015; QUAIL & JOYCE, 2017; SHARMA et al., 2020; SIMON et al., 2020; KUNIGELIS & VOGELBAUM, 2021); uma falha nessas propriedades de barreira induz a permeabilidade do vaso com plasma, com vazamento de fluido para o tecido tumoral, gerando edema cerebral e pressão intersticial (DE VLEESCHOUWER & BERGERS, 2017).

#### 4.2 A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA TUMORAL

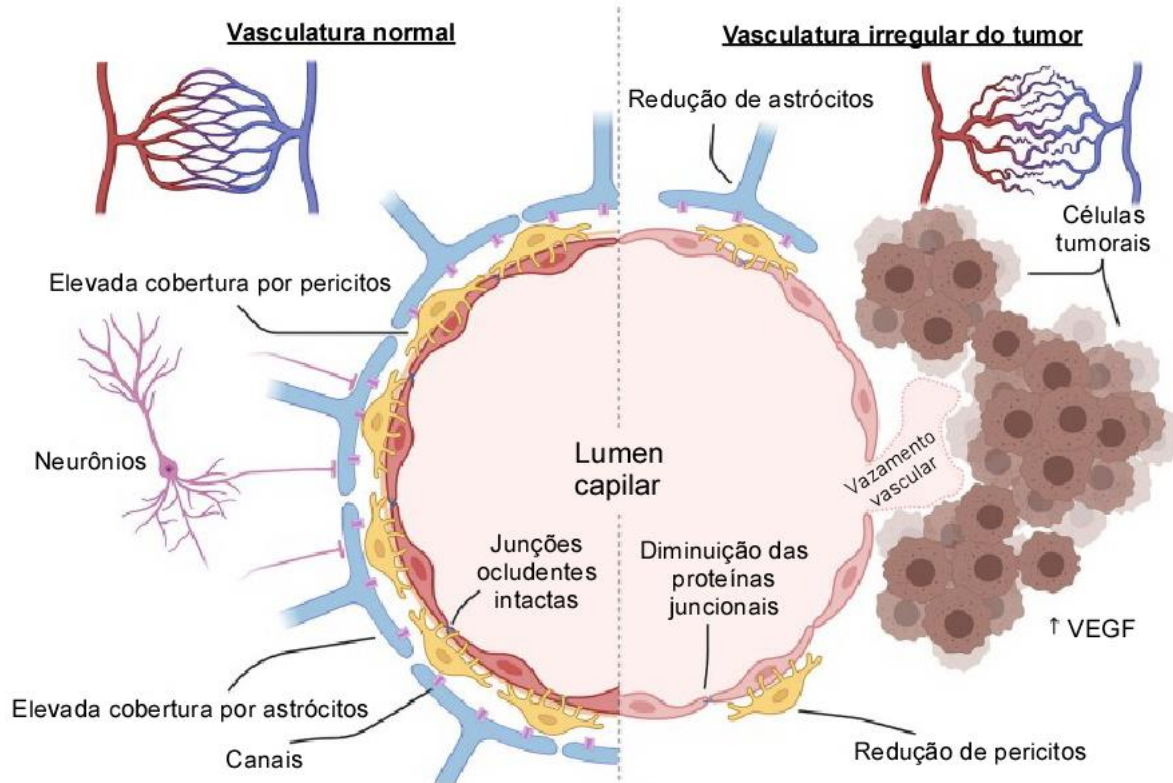
Em geral, a microvasculatura tumoral é mais permeável às macromoléculas do que os vasos normais (ISHIHARA et al., 2002). Devido ao espaço confinado dentro do cérebro, o crescimento da massa tumoral pode prejudicar o fluxo sanguíneo (ARVANITIS et al., 2020). Durante a progressão do tumor cerebral, a vasculatura do tumor torna-se cada vez mais heterogênea à medida que essa vasculatura se altera, a demanda nutricional das células cancerígenas em proliferação requer a cooptação dos vasos existentes e/ou criação de nova vasculatura com organização aberrante (QUALI & JOYCE, 2017; KANE, 2019; ARVANITIS et al., 2020).

A proliferação vascular é uma característica dos gliomas, com a massa tumoral apresentando um sistema vascular anormal e disfuncional, que difere dos vasos cerebrais normais em morfologia, funcionalidade e características moleculares (QUALI & JOYCE, 2017; KANE, 2019; CRUZ et al., 2022), com vasos de diâmetro e permeabilidade irregulares, lâmina basal irregular e distribuição irregular na massa tumoral, justificada pela expressão de fatores pró-angiogênicos pelas células tumorais das regiões necróticas (BERGERS & BENJAMIN, 2003; DE VLEESCHOUWER & BERGERS, 2017; KANE, 2019). Essas disfunções resultam

em um infiltrado tumoral pelo parênquima cerebral, resistência aos tratamentos farmacológicos e edema causado pela permeabilidade capilar (WU et al., 2023).

As células de glioblastoma e o microambiente circundante podem estimular a produção de VEGF, que pode levar as células endoteliais ao desenvolvimento de novos vasos (BERGERS & BENJAMIN, 2003; WEISS et al., 2009; ARVANITIS et al., 2020; NUNNO et al., 2022). A atividade de VEGF desencadeia a cascata de sinalização que medeia transcrição de fatores pró-angiogênicos e a permeabilidade dos vasos sanguíneos (WEISS et al., 2009; ARVANITIS et al., 2020; KUNIGELIS & VOGELBAUM, 2021; NUNNO et al., 2022).

A BHE é heterogênea dentro de diferentes regiões do tecido tumoral (RODRIGUEZ et al., 2015). Normalmente, a maior permeabilidade é encontrada em regiões onde o tecido normal foi totalmente substituído por células neoplásicas, no entanto, muitas vezes há uma BHE intacta na borda do tumor onde as células de glioblastoma se infiltram no parênquima cerebral normal (RODRIGUEZ et al., 2015). Essas perturbações nos capilares do microambiente, durante o desenvolvimento tumoral, promove a alteração da denominação da BHE para barreira hematoencefálica tumoral (BTB) (SHARMA et al., 2020; STEEG, 2021; ALLEN & LIMOLI, 2022) (**Figura 8**).



**Figura 8: Comparação da unidade neurovascular da barreira hematoencefálica e da barreira hematoencefálica tumoral.** A vasculatura normal do cérebro se desenvolve das artérias às arteríolas e aos capilares onde pode ocorrer a transferência de nutrientes e oxigênio. No tecido normal, os capilares estão espalhados de maneira uniforme para garantir uma distribuição igual. Na BTB, há presença reduzida de terminações capilares e uma sobreposição irregular criando áreas de hipóxia tecido tumoral. Nos capilares teciduais normais, a unidade neurovascular controla o influxo de agentes, formando uma camada de células endoteliais não fenestradas que está firmemente unida com proteínas de junções ocludentes. Estes são envoltos por pericitos e pés terminais astrocíticos, que auxiliam na manutenção das proteínas de transporte de células endoteliais, proteínas juncionais, indução de angiogênese e influxo de íons e fluidos. Já na BTB, a integridade é comprometida, visto que as células tumorais se fixam à parede vascular externa e induzem o crescimento vascular através da expressão VEGF, gerando um leito capilar irregular, que deixa áreas do tumor hipóxicos; a nova vasculatura tem reduções na cobertura astrocítica dos pés terminais, células de pericitos, proteínas juncionais e neurônios. (Adaptado de ALLEN & LIMOLI, 2022)

O BTB é caracterizado por pericitos aberrantes, distribuição errônea e perda de pés finais astrocíticos e conexões neuronais (ARVANITIS et al., 2020; ALLEN & LIMOLI, 2022). Além disso, as proteínas juncionais diminuem nas células endoteliais da BTB e a vasculatura intratumoral nunca se restabelece totalmente para uma BHE normal em metástases cerebrais (ARVANITIS et al., 2020).

Quando as células endoteliais da BHE/BTB respondem a lesões e inflamações há ativação de microglias, macrófagos perivasculares e recrutamento

de células imunes através de receptores do tipo toll e receptores de quimiocinas (MAYER & FISCHER, 2024).

Apesar de ser caracterizado como uma unidade neurovascular com perturbações, a BTB mantém aspectos da BHE, incluindo expressão de transportadores responsáveis pelos efluxos de substâncias tanto nas células endoteliais quanto nas células tumorais (ARVANITIS et al., 2020). As células endoteliais também possuem a propriedade de atrair as células de glioblastoma para os vasos sanguíneos através da liberação de bradicinina (BK), que pode ativar as vias de transdução de sinal para os receptores de B<sub>1</sub> (B1R) e B<sub>2</sub> (B2R) de cininas, presentes nas células tumorais de glioblastoma, através da mobilização do Ca<sup>2+</sup> intracelular (PLENDL et al., 2000; MONTANA & SONTHEIMER et al., 2011).

No glioblastoma, esses capilares que compõe a BTB apresentam permeabilidade a pequenas moléculas e algumas grandes, além da superexpressão de receptores que podem ser explorados seletivamente para ajudar no alcance dos quimioterápicos em toda a massa tumoral (NINGARAJ et al., 2002; VAN TELLINGEN et al., 2015; KANE, 2019; ARVANITIS et al., 2020; TERSTAPPEN et al., 2021).

A BTB, que apresenta certa alteração na permeabilidade durante a tumorigênese e a angiogênese, ainda se assemelha muito à BHB normal (WU et al., 2023). Apesar do comprometimento vascular da BTB, a captação de quimioterápicos, como a doxorrubicina, é relativamente baixa em tumores (ALLEN & LIMONI, 2022), o que indica que, embora o BTB possa ser mais permeável, não há clareza de que essas perturbações da barreira são suficientes para a penetração dos fármacos em quantidades significativas na massa tumoral, parecendo ser indispensáveis outras intervenções para abrir ainda mais a vasculatura dentro do tumor (VAN TELLINGEN et al., 2015; QUAIL & JOYCE, 2017; ARVANITIS et al., 2020; SHARMA et al., 2020; ALLEN & LIMONI, 2022).

### 4.3 A BHE/ BTB COMO UM ALVO TERAPÊUTICO

A regulação da BHE é um fator fortemente controlado e limitante para a penetração no SNC de produtos farmacêuticos para o tratamento de doenças como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e glioblastoma (WHELAN et al., 2021).

Apesar de uma BHE intacta ser necessária para manutenção da homeostase, isso dificulta a entrega de drogas ao cérebro para uma melhor eficácia de terapias de combate a tumores (SHARMA et al., 2020). Mesmo a BTB sendo permeável, a entrega de fármacos não alcança o tecido central do tumor porque há vários mecanismos de efluxo e transporte ainda não foi totalmente elucidado (SHARMA et al., 2020).

Embora a permeabilidade da BHE não tenha uma influência direta no sucesso de candidatos a medicamentos para o SNC em ensaios clínicos, a modulação da BBB permitiria que moléculas maiores e mais polares atingissem o SNC e tivessem sua eficácia testada no combate a patologias cerebrais (STEEG, 2021; WHELAN et al., 2021). Como a BHE relega a entrada relativamente irrestrita no parênquima para moléculas pequenas (<400 Da) e lipofílicas, aproximadamente 98% dos potenciais terapêuticos são incapazes de acessar o SNC (KUNIGELIS & VOGELBAUM, 2021).

Durante as últimas décadas, várias estratégias para melhorar a liberação de agentes para tumores cerebrais foram investigadas, mas ainda não geraram grandes mudanças nas terapias de combate ao tumor, o que os mantém ainda em aprimoramento de protocolos para a clínica (RODRIGUEZ et al., 2015; VAN TELLINGEN et al., 2015; SHARMA et al., 2020; STEEG, 2021; ALLEN & LIMOLI, 2022).

Estratégias de entrega de agentes farmacológicos no cérebro compreendem tecnologias invasivas e não invasivas, que foram desenvolvidas e testadas em laboratório, com algum avanço a estudos clínicos, mas nenhum ainda se fixando como tratamento clínico eficaz (WEISS et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2011; ITURRIOZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; ABBASZADE et al., 2021; CHAN et al., 2021; GABAY et al., 2021; TERSTAPPEN et al., 2021; WANG et al., 2021; WHELAN et al., 2021; CRUZ et al., 2022). Duas estratégias não-invasivas experimentais, tradicionalmente investigadas para melhorar a eficácia dos quimioterápicos no combate ao glioblastoma, são contornar fisicamente a barreira hematoencefálica, injetando as drogas diretamente no cérebro, e modular a permeabilidade da BHE e da BTB, via transporte transcelular ou paracelular (CÔTÉ et al., 2013; WHELAN et al., 2021).



A abordagem de abrir deliberadamente as junções ocludentes do endotélio cerebral para facilitar a entrega do medicamento ao cérebro é objeto de uma extensa literatura, onde fica claro que a abertura terapêutica da BHE precisa ser mantida tão breve quanto possível para reduzir o edema e outros efeitos colaterais (ABBOTT et al., 2006; WHELAN et al., 2021). Aberturas da BHE utilizando infusão intracarotídea de fármacos tiveram algum sucesso no aumento da entrega de medicamentos aos tumores, como aquelas em que se utilizaram análogos de mediadores inflamatórios como a bradicinina (WHELAN et al., 2021).

O uso do RMP-7 (Cereport), um peptídeo derivado da BK, que tem como alvo o receptor B2R e que mantém uma meia-vida plasmática aumentada em relação à bradicinina, mostrou eficácia como modulador da BHE e aumentou a biodisponibilidade de quimioterápicos ao parênquima cerebral em pesquisa básica (NINGARAJ et al., 2002; PRADOS et al., 2003; ABBOTT et al., 2006; KUNIGELIS & VOGELBAUM, 2021; WHELAN et al., 2021), mas os ensaios clínicos indicaram necessidade de melhorias na abordagem (PRADOS et al., 2003; ABBOTT et al., 2006; WEISS et al., 2009; CÔTÉ et al., 2013; VAN TELLINGEN et al., 2015; STEEG, 2021; WHELAN et al., 2021; ZHANG et al., 2021; WU et al., 2023).

Cálcio e óxido nítrico são importantes segundos mensageiros envolvidos no processo biológico dos receptores de cininas, aumentando a permeabilidade do BTB (LIU et al., 2008). A literatura indica que as proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e NO são caminhos propostos para serem envolvidos na regulação das proteínas associadas às proteínas de zona ocludente (ZO-1), ocludina, e claudina-5, além da proteína actina-F do citoesqueleto e proteína de junção aderente  $\beta$ -catenina (LIU et al., 2008; DUTRA et al., 2011; SILVA et al., 2019). Vários dos receptores encontrados no endotélio cerebral e em astrócitos causam um aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular quando ativados, e essa sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  é um mecanismo pelo qual as células do SNC se comunicam e modulam a atividade das células adjacentes (ABBOTT et al., 2006; WHELAN et al., 2021). Considerando que é amplamente aceito que após a ativação dos receptores de cininas ocorre a indução da inflamação através de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da permeabilidade vascular, a via das cininas poderia causar o aumento da permeabilidade através da ativação de seus receptores, desencadeando em cascata de sinalização que promove o aumento no

Ca<sup>2+</sup> intracelular e o aumento do NO das células endoteliais (NINGARAJ et al., 2002; IFUKU et al., 2007; LIU et al., 2008).

Ademais, a modulação da BHE/BTB permitiria o uso de quimioterápicos como a doxorubicina (DOX), uma antraciclina anticancerígena estabelecida agente que retarda ou inibe o crescimento das células cancerígenas, bloqueando a topoisomerase 2, mas não penetra na BHE, devido à sua afinidade por transportadores de efluxo multirresistentes (GABAY et al., 2021; WHELAN et al., 2021). O efeito da DOX no câncer cerebral foi demonstrado por injeção direta em tumores cerebrais, com potência contra células de glioma sendo relatada como 2.000 vezes maior do que o atual tratamento clínico padrão com TMZ (WHELAN et al., 2021).

## **5 OS RECEPTORES DE CININAS NO GLIOBLASTOMA**

O aparecimento de inflamação no SNC é relacionado a trauma, dor ou infecção (GUEVARA-LORA, 2012). Em glioblastoma, a função das cininas e seus receptores ainda não foi totalmente elucidada, mas dados na literatura sugerem que a expressão desses receptores pelas células de glioma tem relação com o a gradação dos tumores cerebrais e seu estágio de desenvolvimento (GUEVARA-LORA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; NICOLETTI et al., 2014; NICOLETTI et al., 2017).

A bradicinina é super regulada e se acumula em regiões do tumor onde há presença de hipóxia e inflamação, que estão correlacionados à invasão e migração das células de glioblastoma em direção aos vasos sanguíneos, em evento que envolve o influxo de Ca<sup>2+</sup>, canais de K<sub>Ca</sub> e a via do fator transcricional NF-κB (NICOLETTI et al., 2014; LIU et al., 2019; SUN et al., 2020). A presença de BK e DBK, além de citocinas inflamatórias, no microambiente tumoral desencadeia a expressão e ativação de B1R nas células de glioblastoma e endoteliais dos capilares cerebrais (IFUKU et al., 2007; NICOLETTI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018; LIU et al., 2019).

Antagonistas para B1R ou B2R foram propostos para o tratamento de vários tipos de cânceres devido a suas propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogênicas, anti-proliferativas e anti-migratórias (IFUKU et al., 2007; DA COSTA et al., 2014). Em

modelo de glioblastoma, a deleção genética ou por antagonista de B1R está associada ao crescimento acentuado do tumor e sua intensa invasão, o que é atenuado quando há o bloqueio de B2R ou sua deleção; o tratamento combinado de antagonistas de B1R e B2R ou a dupla deleção promove a diminuição do tumor, além de reduzir a proliferação e viabilidade celular e induzir a morte celular (NICOLETTI et al., 2014; NICOLETTI et al., 2017).

O aumento da permeabilidade da BHE torna os receptores B1R e B2R presentes nas células endoteliais alvos terapêuticos com objetivo de aumentar a entrega de agentes quimioterápicos à massa tumoral (LU et al., 2010; MONTANA & SONTHEIMER, 2011; NICOLETTI et al., 2014; ZHANG et al., 2021). Foi relatado que, injeções intracarótídeas de bradicinina em concentrações micromolares seriam o suficiente para aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica através do receptor B<sub>2</sub>, mas quando a bradicinina foi administrada por via intravenosa, o efeito foi alcançado apenas quando altas concentrações foram usadas, resultando em toxicidade fisiológica e endotelial (NINGARAJ et al., 2002; PRADOS et al., 2003; ABBOTT et al., 2006; ZHANG et al., 2021). No entanto, Lu e colaboradores (2010) indicam que a bradicinina induz, em células de glioma, a migração e participação em vias de sinalização relacionada ao processo inflamatório através do B1R, sendo esta resposta mimetizada por um agonista específico de B1R e bloqueada por um antagonista específico do mesmo.

## 5.1 ESTRATÉGIA DE RUPTURA DA BHE VIA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES DE CININAS

As cininas podem promover a angiogênese em diferentes modelos experimentais de células/tecidos normais e cancerígenos, através de B1R, B2R ou ambos (ISHIHARA et al., 2002; DA COSTA et al., 2014). O sistema das cininas é um sistema solúvel, envolvido na indução da permeabilidade vascular, que pode ter um efeito direto através da liberação de produtos biologicamente ativos ou pode ativar outras células que, por sua vez, liberam moléculas vasoativas (BOSSI et al., 2011; DUTRA et al., 2011; JIN et al., 2020).

Os receptores de cininas, especialmente o B1R, estão associados à ruptura da BHE (GUEVARA-LORA, 2012). Em condições inflamatórias, Prat e colaboradores

(2000) indicaram que a expressão e atividade do receptor B1 das células endoteliais de vasos cerebrais, através da ação do agonista farmacológico R838, podem contribuir para uma cascata de eventos pelo qual a permeabilidade da BHE às moléculas pode ser aumentada.

As ações combinadas de análogos farmacológicos de agonistas de B1R e B2R aumentaram a biodisponibilidade do quimioterápico carboplatina (CÔTÉ et al., 2013) ou DOX (SIKPA et al., 2020) para o tecido circundante à massa tumoral de glioblastoma, indicando o aumento da sobrevivência dos animais do modelo experimental. A combinação de agonista sintético para B2R, o RPM-7, com a carboplatina aumentou a distribuição do quimioterápico na massa tumoral do glioma, mas o efeito não foi o mesmo em estudo de fase 2 em pacientes de glioma maligno recorrente (PRADOS et al., 2003; DA COSTA et al., 2014).

Ademais, modelos de nanopartículas revestidas com ligantes para os receptores de cininas são pontuados como potenciais sistemas terapêuticos para administração de medicamentos tumores cerebrais de forma segura e eficaz (ZHANG et al., 2021; ZHENG et al., 2022).

Outra abordagem a ser explorada pela literatura é aumentar a atividade de B1R através da ação de seu agonista fisiológico, a DBK. Um caminho para aumentar a sensibilidade vascular à DBK dá-se através da interação do LPS ao TLR4 induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias (BOUTHILLIER et al., 1987; PESQUERO et al., 1996). O LPS é um lipopolissacarídeo derivado de bactérias gram-negativas, agonista do receptor TLR4, e é capaz de modificar a expressão gênica em vários tipos celulares e que já foi indicado como agente antitumoral no combate ao glioblastoma (MARCEAU et al., 1998; SCHREMMER-DANNINGER et al., 1998; CAMPOS et al., 1999; SABOURIN et al., 2001; QADRI & BADER, 2018; SHARMA et al., 2020).

## **6 A AÇÃO DO TLR4 E LPS NO GLIOBLASTOMA**

O TLR4 está presente na superfície da membrana celular (LITAK et al., 2020). Sua ativação em quadros de doenças que acometem o SNC pode ser neurotóxica ou neuroprotetora, dependendo do contexto (ADHIKARLA et al., 2021). Sua ativação pode induzir citocinas pró-inflamatórias, facilitar a adesão celular e aumentar a

promoção do glioma (crescimento e invasão) (TEWARI et al., 2012; ZEUNER et al., 2015; GRUFFAZ et al., 2017; WANG et al., 2018; KINA et al., 2019), além de associação com a diferenciação das GSCs (ALVARADO et al., 2017; MEGÍAS et al., 2020).

A elevada expressão de TLR4 em amostras de glioblastoma humano sinaliza um papel deste como biomarcador de metástase tumoral e mau prognóstico da doença (HAN et al., 2017; CASILI et al., 2018; WANG et al., 2018; KINA et al., 2019). Esses achados indicam uma possível relação de TLR4 e NF- $\kappa$ B na etiologia da tumorigênese e sugerem uma ação terapêutica no controle da modulação dessa proteína transcricional para prevenção do glioblastoma (KINA et al., 2019; LITAK et al., 2020).

Muitos estudos demonstraram que a infecção bacteriana pode afetar o prognóstico de pacientes com glioma; no entanto, os mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente elucidados (HAN et al., 2017). O tratamento de células e animais com LPS, por exemplo, induziu efeitos antitumorais nas células do glioma e nas células-tronco do glioma via seu receptor (HAN et al., 2017; ALVARADO et al., 2017; MEGÍAS et al., 2020). Porém, também já foi descrito que a exposição *in vitro* de células de glioblastoma da linhagem U87MG tratadas com LPS resultou na progressão das células tumorais, com aumento da proliferação e invasão dessas (LITAK et al., 2020), resultado que corrobora com estudos demonstrando que a ausência genética de TLR4 inibe o crescimento de xenoinxertos de U87MG (GRUFFAZ et al., 2017; CASILI et al., 2018; LITAK et al., 2020).

O amplo espectro da interação do TLR4, com variação em sua via de sinalização de acordo com o ligante e sua ampla gama de interação com outras vias tem sido alvo de estudos clínicos (LITAK et al., 2020). O ibudilast é um agente antitumoral em estudo que é capaz de difundir a barreira hematoencefálica e, dentre várias ações, estimula a sinalização de TLR4 (LITAK et al., 2020).

## 6.1 EFEITO DA ATIVAÇÃO DE TLR4 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DA BHE

A expressão de TLR4 está intimamente ligada a dano na BHE (TANG et al., 2018; WU et al., 2023), podendo variar seu padrão de expressão de acordo com a

espécie estudada (NAGYOSZI et al., 2010). Alterações no fluxo sanguíneo provocam a ativação e aumento de expressão dos receptores TLR4 presente nas células endoteliais, efeito relacionado à ativação de NF- $\kappa$ B (WANG et al., 2020) e modulação da fibronectina mostraram, em modelo de isquemia cerebral, o aumento na expressão de TLR4 da mesma população celular (QU et al., 2020).

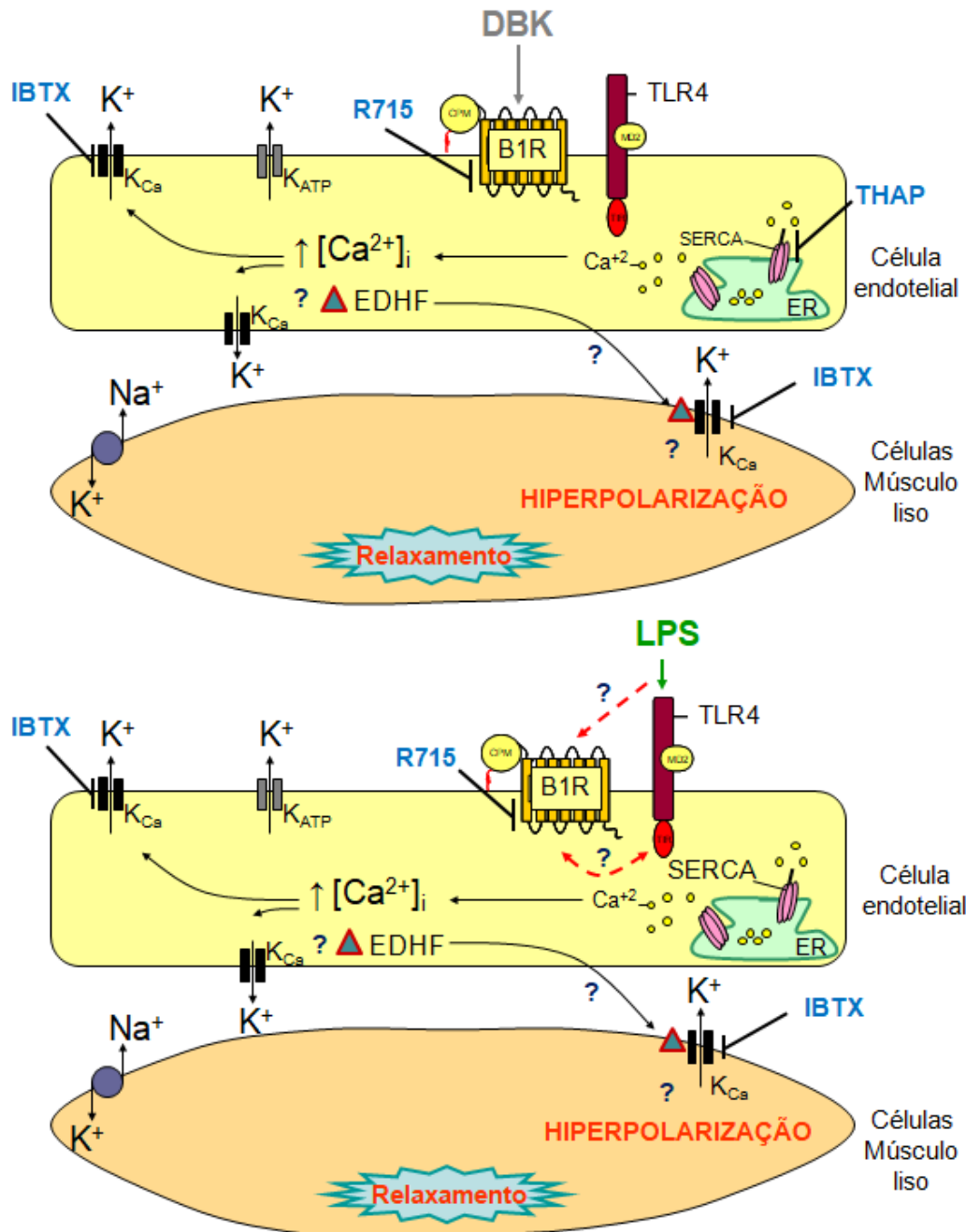
Além das infecções bacterianas promoverem a remissão do tumor (HAN et al., 2017), a ligação do LPS ao TLR4, presente na membrana das células endoteliais, leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios através da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  e ERK, causando redução na resistência da barreira (CHAO et al., 2017; JOHNSON et al., 2018; SHARMA et al., 2020). O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estaria associado à ativação de TLR4 em via que relaciona as proteínas cinase C e a ocludina em evento que culmina com rompimento da BHE (TANG et al., 2018). A presença do LPS também pode alterar a expressão de ocludina na BHE através da via TLR4/NF- $\kappa$ B (PENG et al., 2021). Em modelo de glioblastoma, a ativação de TLR4 nas células endoteliais relaciona-se com a diminuição da marcação para ZO-1 nos vasos que compõem a BTB (WU et al., 2023).

Apesar de importantes propriedades pró-inflamatórias, não há tratamento com agentes do tipo LPS autorizado pelas agências sanitárias (HAN et al., 2017; SHARMA et al., 2020). Em humanos saudáveis, uma dose de LPS de 1 ng/kg é suficiente para induzir sintomas, incluindo febre e náusea, enquanto que o nível médio de endotoxina em pacientes com sepse foi de 300 pg/mL (CHAO et al., 2017). Em modelo *in vitro* com células endoteliais humanas, 50 ng/ml de LPS induziu uma diminuição acentuada na resistência da barreira de células endoteliais da vasculatura cerebral, que após uma diminuição aguda a resistência da barreira não voltou a aumentar, com medições terminando 36 horas após o tratamento (JOHNSON et al., 2018). Importante destacar que, em animais neonatos, foi observado que a administração sistêmica de LPS promove o aumento da expressão de TLR4 das células endoteliais, mas não promove a abertura da BHE (WANG et al.; 2014).

## 7 A RELAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES B1R E TLR4

Os receptores B1R e TLR4, presentes nas células endoteliais que compõem dos vasos sanguíneos, além de possuírem papéis importantes em processos inflamatórios, parecem estar envolvidos na permeabilidade vascular (MARCEAU et al., 1998; QADRI et al., 2016; QADRI & BADER, 2018; SONG et al., 2022). O aumento seletivo de DBK no sangue arterial quando animais são expostos ao tratamento com LPS, induzindo a expressão e ativação de B1R (MARCEAU et al., 1998) e o aumento na expressão de B1R em capilares cerebrais, após administração sistêmica de LPS, são exemplo de achados da literatura que indicam a relação entre as vias de B1R e TLR4 (QADRI et al., 2016).

Para observar as respostas induzidas pelas sepses, camundongos nocautes para B1R apresentaram uma hipotensão atenuada e uma menor resposta inflamatória como resposta ao tratamento ao LPS, enquanto que ratos transgênicos que superexpressam B1R em células endoteliais (TGR(Tie2B<sub>1</sub>)) reagiu após LPS com uma resposta hipotensiva pronunciada com bradicardia acentuada e aumento da permeabilidade vascular associada ao aumento da mortalidade (QADRI & BADER, 2018). Por eletrofisiologia observou-se que, ao tratar aortas de modelos animais com antagonistas de B1R, ocorre o bloqueio do efeito hiperpolarizante causado pelo LPS e por agonistas do receptor B<sub>1</sub> de cininas (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), o mesmo ocorrendo no modelo de ratos TGR(Tie2B<sub>1</sub>), em via independente de NOS (BATISTA et al., 2022) (**Figura 9**).



**Figura 9: Hipótese de interação entre B1R e TLR4.** Os canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  no músculo liso são os mediadores finais das respostas hiperpolarizantes a DBK e LPS e o antagonista B1R inibe o efeito LPS sugerindo uma interação putativa entre os receptores B1R e LPS. O EDHF pode se difundir através das células endoteliais e se ligar aos canais de potássio ativado por cálcio expressos nas células musculares lisas vasculares, levando ao efluxo de potássio. Esse processo, por sua vez, poderia induzir a hiperpolarização do músculo liso por meio da ativação da bomba  $Na^+/K^+$ . CPM – Carboxipeptidase M; BK – Bradicidina; EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio; DBK – Des-Arg<sup>9</sup>-bradicidina; IBTX – Iberitoxina; LPS – Lipopolissacarídeo; TLR4 – Receptor Toll-like-4; MD2 - Fator 2 de Diferenciação Mieloide; TIR - Domínio de Homologia do receptor Toll / Interleucina-1; R715 – Antagonista Seletivo para B1R; THAP – Thapsigargina. (Adaptado de BATISTA et al., 2022)



Além do sistema vascular, com células endoteliais e músculo liso, já foi descrito em diferentes modelos de fibroblastos que a ativação de TLR4 ou TLR2 tanto por diferentes tipos de LPS quanto por ligantes endógenos promovem a regulação positiva da expressão tanto de B1R quanto de B2R (SOUZA et al., 2019; NI et al., 2022). Também em fibroblasto, a bradicinina potencializa o efeito do LPS, resposta que foi bloqueada na presença de antagonista para B2R, indicando a associação do efeito de BK com a superexpressão de TLR4 e TLR2 (GUTIÉRREZ-VENEGAS et al., 2012). Em fibroblasto cardíaco a atividade de LPS/TLR4 induz o aumento de expressão de B1R, o que potencializa a resposta de seu agonista, via dependente de NO (MUÑOZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

A relação entre receptores de cininas e do tipo toll também foi descrita em músculo liso de traqueia, indicando que as contrações observadas pela ação do LPS são potencializadas na presença de BK e DBK, onde a coestimulação de receptores TLR2, TLR3 e TLR4 expressos no músculo liso traqueal de camundongos resultam na transcrição via NF- $\kappa$ B de B1R e B2R (BACHAR et al., 2004). Outras evidências experimentais demonstraram que o NF- $\kappa$ B induzido por administração de LPS está envolvido no aumento de RNAm e a regulação positiva funcional do receptor B<sub>1</sub> de cininas (Passos et al., 2004).

A interação cooperativa entre as vias das cininas e dos receptores do tipo toll é indicada por Monteiro e colaboradores (2006), que demonstraram, em modelo de infecção por *Trypanossoma cruzi*, que a resposta microvascular no local de infecção pelo patógeno apresenta os níveis de bradicinina controlados por uma interação entre TLR2, B2R e ECA (Enzima Conversora de Angiotensina).

Os dados apresentados indicam um potencial terapêutico entre B1R e TLR4, porém é imperativo confirmar a interação entre esses receptores, principalmente nas células endoteliais dos vasos, o que poderia ser alvo de modulação para a abertura transitória da BHE/BTB para maior biodisponibilidade de fármacos para o cérebro.

## **OBJETIVOS**

### **1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho é expandir o conhecimento a respeito da interação entre os receptores B1R e TLR4 e observar se a modulação desses, a partir da administração da des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, pode atuar nas junções ocludentes presentes entre as células endoteliais, como alvo de futura ação terapêutica no combate ao glioblastoma.

### **2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.1 PRIMEIRA PARTE**

A primeira parte do trabalho apresenta como objetivo específico aprofundar os conhecimentos acerca da relação entre B1R e TLR4 em células endoteliais. Para tal, vamos buscar compreender mais profundamente:

- A resposta eletrofisiológica de anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO tratados com agonistas, antagonistas e bloqueadores de canais relacionados às vias de sinalização;
- A expressão gênica desses receptores e de outras proteínas envolvidas nas vias de sinalização;
- Como se apresenta a disposição desses receptores nas células endoteliais expostas ou não à DBK e/ou ao LPS.

#### **2.2 SEGUNDA PARTE**

A segunda parte deste trabalho tem como objetivo específico analisar se a ativação de B1R promove a abertura transitória da BHE, o que poderia facilitar a biodisponibilidade de fármacos para o parênquima cerebral com e sem massa tumoral de glioblastoma. Assim, buscamos compreender:

- O que ocorre com proteínas que compõe a BHE, B1R e TLR4 em cultura de células endoteliais da microvasculatura cerebral após a

administração da DBK em condições controle e na presença de meios condicionados de linhagens de glioblastoma;

- Se modular a atividade de B1R, através da administração de DBK, promove a abertura transitória da BHE tanto em cérebro sem injúrias quanto na presença de tumor cerebral de glioblastoma, aumentando a biodisponibilidade de fármaco (quimioterápico) para o parênquima cerebral e se algum residual de DBK pode prejudicar o combate às células tumorais, visto seu efeito pró-tumoral.

## MATERIAS E MÉTODOS

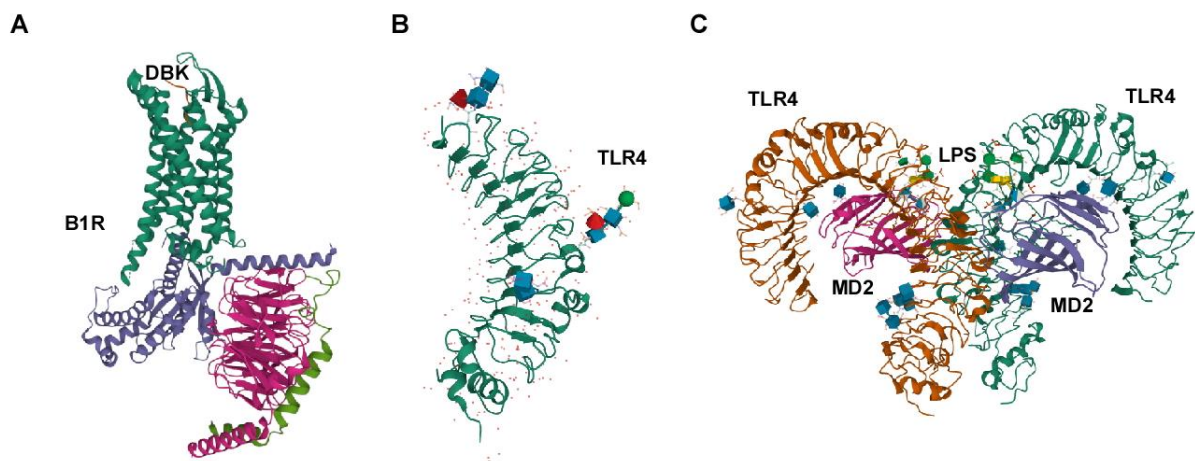
### 1 PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Para buscar evidências acerca das interações entre os receptores B1R e TLR4 foi utilizada a ferramenta STRING, a qual pode ser acessada gratuitamente através do link: <https://string-db.org/>.

O STRING (do inglês, *Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) é um banco de dados biológicos que busca coletar, pontuar e integrar todas as fontes disponíveis que contenham informação da interação entre proteínas em diversos organismos (SZKLARCZYK et al. 2023).

Para prever se há alguma possibilidade de interação física entre os receptores B1R e TLR4 foram executados experimentos de ancoragem molecular através do servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/home.php>) (KOZAKOV et al., 2013; KOZAKOV et al., 2017).

Foram utilizadas como referência as estruturas dos receptores B<sub>1</sub> de cininas e TLR4 de proteínas obtidas no RCSB PDB, um banco de dados de proteínas e ácidos nucléicos, e UniProt, base de dados com a sequência de proteínas e suas funções. Para B1R foi utilizado a estrutura de código 7EIB/ UniProtKB – P46663 (YIN et al., 2021) (**Figura 10A**), enquanto as estruturas de TLR4 foram as 3FXI (PARK et al., 2009) e 2Z62/UniProtKB – O00206 (KIM et al., 2007) (**Figura 10B e C**).



**Figura 10: A base estrutural de B1R e TLR4 para ancoragem molecular. (A)** Estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica do complexo B1R-DBK (YIN et al., 2021). **(B)**

Estrutura obtida por cristalografia de TLR4 (KIM et al., 2007). **(C)** Complexo dimérico da estrutura do receptor TLR4, formado com a ligação do agonista LPS (PARK et al., 2009).

Na configuração do servidor ClusPro, não foram selecionadas nenhuma das opções avançadas para os cálculos de ancoragem proteína-proteína, ou seja, não foram definidos os contatos de atração e repulsão entre resíduos (TOMAN et al., 2021). Os modelos de interação levaram em consideração serem dois receptores de membrana. Como o programa funciona denominando um receptor e um ligante e, no nosso caso temos dois receptores, a ancoragem foi solicitada denominando o TLR4 como ligante e B1R como receptor e depois, B1R como ligante e TLR4 como receptor, com o objetivo de evitar qualquer diferença e a análise dos dados foi feita de acordo com a orientação dos artigos citados pelo servidor (KOZAKOV et al., 2013; KOZAKOV et al., 2017; VAJDA et al., 2017; DESTA et al., 2020).

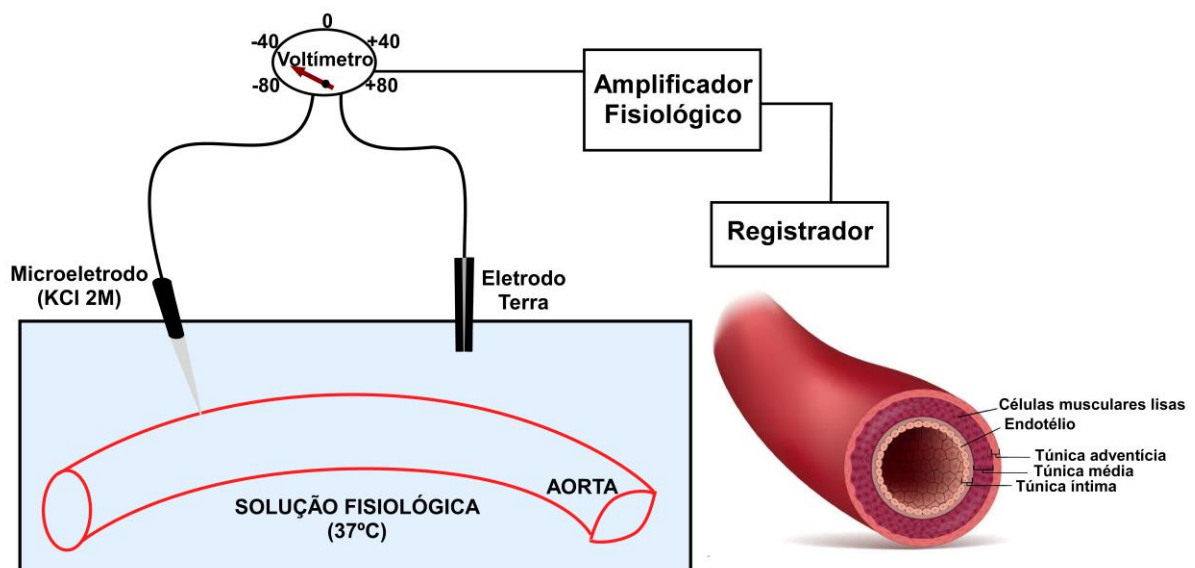
## **2 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C57BL/6 WT (n = 30), nocautes para o receptor B<sub>1</sub> de cinina (B<sub>1</sub>KO) (n = 31) (PESQUERO et al., 2000), nocautes para o receptor TLR4 (TLR4KO) (n = 10) e linhagem Swiss (camundongos albinos) (n = 72) em torno de 8 semanas de vida e entre 20-30 g. Os animais foram mantidos a 21-23°C e em ciclos de 12h de luz/ escuro e acesso *ad libitum* para comida e água, com ração padrão para camundongos. Camundongos C57BL/6 WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO foram obtidos junto ao Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina/ Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil, em protocolos que estavam de acordo com as diretrizes para o cuidado de animais de laboratório e diretrizes éticas para investigações, aprovadas pela UNIFESP em protocolo nº 2011/1403. Camundongos C57BL/6 WT e Swiss foram obtidos junto ao Biotério de ratos e camundongos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em protocolo CEUA-UFRJ nº 023/19 e nº 134/22.

## **3 POTENCIAL DE MEMBRANA**

Os protocolos utilizados para os procedimentos de eletrofisiologia foram descritos por Farias e colaboradores (2004).

Para investigar as características bioelétricas que existem através da membrana de uma célula se faz necessária utilização de eletrodos transmembrana, sendo um colocado no interior da célula e outro no líquido circundante. Anéis de artéria aorta de camundongos C57BL/6 WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO foram usados para registros de potencial de membrana, por meio de microeletrodos de vidro acoplados a um micromanipulador e conectados a um eletrômetro. As medidas de potencial de membrana foram obtidas por meio de registros intracelulares, feitos a partir da camada adventícia dos vasos com ou sem endotélio (**Figura 11**).



**Figura 11: Figura esquemática do procedimento de eletrofisiologia.** Um pedaço da aorta torácica (1 cm) do animal a ser estudado é retirado. Parte dos animais será controle, com a camada endotelial retirada do anel aórtico submetido à eletrofisiologia (controle experimental). Os anéis de aorta ficarão submersos em cuba de 2 ml, sofrendo perfusão pela solução fisiológica específica para aorta (solução de Krebs), a 37°C, com mistura de 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>, e tensão de 1g. O anel de aorta estará estável para início do experimento após 2h de repouso. Os registros intracelulares foram feitos em músculo liso vascular tanto através da camada íntima, como através da adventícia.

Os anéis de aorta foram mantidos em uma placa com uma pequena câmara com volume de 2 ml, onde receberam por perfusão uma solução de Krebs com NaCl 122 mM, KCl 5.9 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 15 mM, glicose 11 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, pH 7.4. A perfusão se deu na velocidade de 3 ml/ min, borbulhando a mistura de gás 5%CO<sub>2</sub>-95% no meio mantido a pH7.4 e temperatura de 37°C.

Micropipetas (capilares de vidro borossilicato 1B120F-6, World Precision Instruments, WPI) foram feitas em um puxador vertical de capilar (Modelo PN-3, Narishige, Tokio, Japão) e preenchidas com KCl 2M (resistência da ponta 20-40 MΩ

e potencial da ponta < 6 mV). Os microelétrodos, com fio de prata (Ag) revestidos com cloreto de prata (AgCl), foram montados em um micromanipulador (Leitz, Leica) e conectados ao amplificador (Intra 767, WPI). Essas micropipetas apresentam diâmetro de ponta inferior a 1  $\mu\text{m}$ , que irá penetrar na célula.

Os anéis de aorta torácica, com ou sem endotélio, foram inicialmente equilibrados por 2 horas sob uma tensão de repouso de 1g (NELSON et al., 1990; FARIAS et al., 2004). Os registros intracelulares foram feitos em músculo liso vascular tanto através da camada íntima quanto através da camada adventícia. Os sinais elétricos foram continuamente monitorados por um osciloscópio (Modelo 54645A, Hewlett Packard) e registrado em um gravador de gráfico potenciométrico (Modelo 2210, LKB-Produkter AB). O sucesso na implantação da micropipeta com o eletrodo é evidenciado pela queda acentuada de voltagem ao entrar em uma célula, seguido por uma estabilidade do potencial ( $\pm 3$  mV) por pelo menos 1 minuto após o empalamento, daí sim estando pronto para iniciar o registro (FARIAS et al., 2004). Após o registro há um acentuado retorno ao zero na saída e uma mudança mínima (< 10%) na resistência do microeletrodo após o empalamento (FARIAS et al., 2004).

O potencial de membrana dos anéis de aorta foi medido antes e depois da estimulação com: thapsigargina (THAP, 1  $\mu\text{M}$ ) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), um inibidor não competitivo da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoendoplasmático (SERCA), que aumenta a concentração de cálcio intracelular no citoplasma bloqueando a capacidade da célula de bombear cálcio até o interior dos retículos sarcoplasmático e endoplasmático; DBK (1  $\mu\text{M}$ ) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005) e Sar-[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina (R838, 1  $\mu\text{M}$ ), agonistas de B1R; LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (L4391; Sigma) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), agonista de TLR4. Esses agonistas foram testados na presença ou ausência de R715 (10  $\mu\text{M}$ ), antagonista de B1R, e Hoe 140 (10  $\mu\text{M}$ ), antagonista de B2R, em concentrações determinadas em experimentos prévios. Para investigar o mecanismo envolvido na resposta hiperpolarizante de B1R, pré-incubamos os anéis de aorta com iberiotoxina (IBTX, 10 nM) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), um inibidor de canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ; glibenclamida (GLI, 1  $\mu\text{M}$ ) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), um inibidor de canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ; ou N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 50  $\mu\text{M}$ ) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), inibidor de

(NOS). O tempo de contato do fármaco com a preparação antes de iniciar os registros foi de 10 minutos.

Antes da incubação dos anéis de aorta com os fármacos, foi observado o potencial de membrana em repouso (RMP); em todos os anéis de aorta torácica. A acetilcolina (ACh, 10  $\mu$ M) (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005) foi usada para confirmar a integridade do endotélio e sua funcionalidade (FURCHGOTT, 1981). Após isso é que os anéis de aorta foram incubados com DBK ou LPS. Quando observada as respostas aos fármacos citados anteriormente, as aortas eram pré-incubadas com Hoe 140 e R715.

Mais de um empalamento foi feito na mesma aorta quando da incubação de um fármaco. As medidas calculadas e consideradas consistem no n=1.

Todos os reagentes e fármacos utilizados para este protocolo experimental foram da marca Sigma.

#### **4 ENSAIO EX VIVO DE AORTA TORÁCICA**

Camundongos C57BL/6 WT foram eutanasiados com overdose do anestésico cloridrato de cetamina, na dose de 300 mg/ kg, associado ao relaxante muscular cloridrato de xilasina, na dose de 30 mg/ kg. As aortas torácicas de camundongos C57BL/6 (n = 4) foram removidas, limpas e seccionadas em meio de cultivo celular DMEM/F-12 (12500092; Thermo/ Gibco) sem suplementos. Assim, foram colocadas em placa de cultura de 24 poços (um anel de aorta por poço) com 400  $\mu$ l de meio DMEM/F-12 contendo soro fetal bovino na concentração 10% (SFB; 12657029; Thermo/ Gibco) e 1% de penicilina/ estreptomicina/ glutamina (concentração 100x, 50 mg/ ml) (10378-016; Thermo/ Gibco) e levadas para estufa de cultivo celular por 2h até iniciar o tratamento com DBK 1  $\mu$ M e LPS 10  $\mu$ g/ml.

As aortas foram incubadas por 30 minutos com DMEM/F-12 ou DMEM/F-12 com DBK ou DMEM/F-12 com LPS, por três vezes alternadas, com 10 minutos de lavagem entre as exposições aos fármacos. Anéis de aortas em condição controle não receberam DBK e LPS. Ao final, as aortas foram fixadas em paraformaldeído na concentração 4% (PFA 4%; ISO FAR) em Tampão Fosfato Salina 1x (PBS 0.1 M, pH 7.2) (2.7 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (ISO FAR), 11.358 g fosfato de sódio dibásico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$



(ISOFAR), 9 g NaCl (ISOFAR), completar para 1L de água destilada), por 24h, criopreservadas em sacarose 10%, 20% e 30% (ISOFAR) (100 ml de PBS 1x com 10 g de sacarose (sacarose 10%), 20 g de sacarose (sacarose 20%) ou 30 g de sacarose (sacarose 30%)) e emblocadas em meio de inclusão (Tissue Tek O.C.T.; Sakura) para secções em criostato (10 µm) (Leica). Os cortes, coletados em lâminas silanizadas (StarFrost; Knittel), foram armazenados em congelador até o uso para imunohistoquímica.

## 5 CULTIVO CELULAR

Para experimentos *in vitro*, foram feitas culturas de linhagem de células endoteliais de microcapilares cerebrais humanos (HBMEC), linhagem celular de glioma humano U87-MG, linhagem celular de glioma humano T98G e linhagem celular de glioma de rato C6.

A linhagem HBMEC foi gentilmente cedida à prof<sup>a</sup> Joice Stipursky (ICB/ UFRJ) pela professora Ana Paula Cabral de Araújo Lima, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/ UFRJ), em anuência com o Dr. Dennis Grab (Associate Professor, Johns Hopkins University, Department of Pathology, Baltimore, USA). As HBMECs, utilizadas nas passagens entre 35 e 40, foram cultivadas em meio 199 (31100-035; Thermo/ Invitrogen) suplementado com 1% de penicilina/ estreptomicina/ glutamina e 10% de SFB (concentração 100x, 50 mg/ ml), e seu meio trocado a cada 2 dias (SIQUEIRA et al., 2018). Foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços, com ou sem lamínulas (Knittel), de acordo com a pergunta experimental realizada, ou em insertos transwell (0.4 µm) (Thermo) para ensaio de permeabilidade da barreira.

As linhagens tumorais escolhidas foram U87MG e T98G, sendo a linhagem U87MG sensível à TMZ e T98G resistente. As células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/ estreptomicina/ glutamina (concentração 100x, 50 mg/ ml). Foram plaqueadas células em placas de 35x10 mm. Os meios foram retirados após 24h em contato com a cultura (meios condicionados MCU87 ou MCT98G), filtrados (filtro de 0.22 µm) e armazenados congelados a -80°C em tubos de estéreis de 15 ml.

A linhagem C6 foi gentilmente cedida pela professora Patrícia Pestana Garcez (ICB/ UFRJ) e foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/ estreptomicina/ glutamina (concentração 100x, 50 mg/ ml). Após a confluência (80-90%), 5-7 dias depois, as células foram colocadas em suspensão, soltas da placa quimicamente com auxílio de 3 ml de tripsina/ EDTA (0.5%) (15400054; Thermo/ Gibco) e suspensas novamente em 1 ml de DMEM/F-12 com SFB. Após a contagem em câmara de Neubauer as células foram suspendidas novamente para conter 300 mil células a cada 1 µl, para injeção do volume de 3 µl no parênquima cerebral de camundongos linhagem Swiss.

Os estoques das linhagens celulares foram mantidos em tubos criogênicos armazenados em N<sub>2</sub> líquido. As células HBMEC foram mantidas em solução 90% SFB e 10% dimetilsulfóxido (DMSO; D4540; Sigma) (volume de 1 ml por criotubo) e as linhagens C6, T98G e U87MG em solução com meio DMEM-F12 com 10% SFB e 10% DMSO (volume de 1 ml por criotubo).

Células HBMEC cultivadas em meio 199 até confluência de 100%, 5-7 dias depois de plaqueadas, foram expostas, por 24h, a diferentes condições: meio DMEM/F-12 sem soro (DMEM/F-12 s/s), meio DMEM/F-12 com soro (DMEM/F-12 c/s), meio 199 sem soro (199 s/s), meio 199 com soro (199 c/s), meio condicionado de astrócitos (MCA), MCU87 e MCT98G. Após 24h, as células endoteliais tiveram suas imagens capturadas em microscópio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific) em objetivas de magnitude 20x e 40x, abertura numérica (NA) 0.45, em contraste de fase, para análises futuras de densidade celular e morfologia.

Células HBMEC, confluentes em 100%, também foram incubadas, por 24h, em meio DMEM/F12, em MCU87 ou em MCT98G, na presença ou ausência de DBK 1 µM e/ ou LPS 10 µg /ml. Após 24h as células tiveram seus meios coletados em tubos de 1,5 ml e direcionados para protocolo de reação de Griess; aquelas plaqueadas em lamínulas foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos para serem destinadas a protocolo de imunofluorescência ou ensaio de ligação por proximidade; células plaqueadas sem lamínulas receberam TRIzol® e foram destinadas ao protocolo de extração de RNA.

## 6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Foram analisadas amostras de anéis de aorta de camundongos C57BL/6 WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO controle (sem tratamento) e expostas ao protocolo de eletrofisiologia, e células da linhagem HBMEC cultivadas em meio 199 e DMEM/F-12 e expostas aos meios condicionados de células tumorais da linhagem U87MG ou T98G na presença ou ausência de DBK e/ou LPS.

Tanto os anéis aórticos quanto as células tiveram seu RNA extraído a partir de protocolo para reagente TRIzol® (15596026; Thermo/ Life Technologies) (200 µl/anel de aorta e 100 µl/ poço HBMEC cultivada em de placa de 24 poços). Os materiais ficaram, no máximo 15 dias, armazenados em TRIzol®, na temperatura de -80°C.

Foram adicionados 200 µl (aorta) e 100 µl (HBMEC) de clorofórmio (372978; Sigma), seguindo-se agitação e centrifugação (14000 rpm, 20 min, 4°C) (centrífuga Eppendorf, modelo 5418 R). O sobrenadante (fase aquosa correspondente ao RNA) foi coletado para um novo tubo junto com a adição de 500 µl de isopropanol, para precipitação do RNA por 12h a -80°C, seguido de centrifugação (14000 rpm, 20 minutos, 4°C). O precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 70% (459844; Sigma) e centrifugado (9000 rpm, 10 minutos, 4°C). Após evaporação do etanol, o RNA foi dissolvido em volume entre 12 e 50 µl de água livre de nuclease (W4502; Sigma) para análise de concentração e pureza em nanodrop (Thermo) determinadas pela absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) e pela razão das absorvâncias  $A_{260}/A_{280}$ , respectivamente. O RNA foi armazenado a -80°C até o uso.

1 µg do RNA total foi transcrito de forma reversa (cDNA) usando o kit high-capacity (4368814; Thermo/ Invitrogen) para produção do cDNA, com protocolo indicado pelo fabricante. O produto da reação foi amplificado por RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (7500 Real-Time PCR System, StepOne Real-Time PCR System ou QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR, todos da marca Thermo/ Life Technologies) usando o cDNA na concentração de 10 ng/poço, diluído em água, os primers de interesse na concentração 600 nM e o tampão de reação SYBRGreen (A25742; Thermo/ Applied Biosystems), em um volume total de reação de 10 µl. As condições do ciclo seguiram a configuração padrão de cada

equipamento para modo de ciclagem “standard”. Cada amostra foi analisada em duplicata para cada gene estudado.

Os RNAm de interesse foram quantificados comparando seu valor relativo com o GAPDH, o gene de referência escolhido. As curvas de melting foram analisadas para observar se houve a presença de amplificação não específica. A expressão foi obtida do ciclo mínimo (Ct) de amplificação, associado ao crescimento exponencial dos produtos da PCR.

Para análise dos dados obtidos do RT-qPCR, os valores quantitativos para a expressão foram obtidos do parâmetro  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que  $\Delta Ct$  representa a subtração dos valores do Ct do gene de referência daqueles do gene alvo e o  $\Delta\Delta Ct$  a normalização das amostras em relação à média do grupo amostral. Os dados finais são expressos na razão da expressão relativa (*fold-change*) da alteração no gene alvo dos grupos experimentais tratados sobre a variação no gene alvo das células endoteliais dos grupos experimentais controle. Para uma melhor análise e visualização de alterações de dobra nos dados obtidos, os gráficos serão apresentados pela relação logarítmica para a base 2.

Os primers utilizados para a RT-qPCR foram sintetizados pela Exxtend (Exxtend Biotechnologia) e estão indicados na **Tabela 1**.

**Tabela 1: Gene-alvo e primers utilizados para detecção de sequências de RNAm.**

Gene-alvo	Especificidade	Sequência
GAPDH	Humano, Camundongo	F: CCC ATC ACC ATC TTC CAG GA R: ATG ATG ACC CTT TTG GCT CC
B1R (Bdkrb1)	Humano, Camundongo	F: TGC CCT TCT GGG CAG AGA A R: CTG ATG GCC ACC ACC AGG AA
B2R (Bdkrb2)	Humano, Camundongo	F: CAT GAA CCT GTA CAG CAG CA R: GTA CAG CCC CAG ATC ACC
TLR4	Humano, Camundongo	F: GCT GGA TTT ATC CAG GTG TG R: TTT GTC TCC ACA GCC ACC
eNOS	Humano, Camundongo	F: CCC CAA GAC CTA CGT GCA R: TCG TGG TAG CGT TGC TGA TC
iNOS	Humano, Camundongo	F: CCA AGG TTG TCT GCA TGG A R: GGC TCC AGC ATG TAC CCT C
NF-kB	Humano, Camundongo	F: CTT CCG GCT GAG TCC TGC TC R: AGG CTG CCT GGA TCA CTT CA
ZO-1	Humano	F: ACC AGT AAG TCG TCC TGA TCC R: TCG GCC AAA TCT TCT CAC TCC
Claudina-5	Humano	F: TCT CTC CTG TCT GAA GGC CA

		R: GGC TTC CCA GAC CTC TCA ATC
GLUT-1	Humano	F: GCC AAG AGT GTG CTA AAG A R: GAA GAT GCT CGT GGA GTA ATA G
Citocromo P4502C8 (CYP2C8)	Humano, Camundongo	F: CTG CTC CGT TGT TTT CCA GA R: TCC AGT GAT GCT TGG TGT TC

Os dados obtidos foram analisados em programa Excel (Microsoft Office 2010), com gráfico e análise estatística gerados em programa GraphPad Prism 8.0.2 (La Jolla, CA, USA).

## 7 IMUNOCITOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes de aortas torácicas e as células HBMEC plaqueadas em lamínulas foram submetidos ao mesmo protocolo de imunofluorescência.

As aortas foram fixadas em PFA 4% pelo período de 24h, assim que o experimento foi finalizado. As lamínulas com células HBMEC foram fixadas com o mesmo fixador por 20 minutos, logo após o final do experimento.

Tanto os cortes de aorta quanto as lamínulas foram lavados com PBS por duas vezes de 5 minutos cada para, então, serem permeabilizados com PBS/ Triton 0.1% (Triton X-100; Sigma) por 5 minutos. Os sítios não específicos foram bloqueados com soro normal de cabra a 5% (NGS 5%; 16210064; Thermo) (16210064; Thermo) e albumina sérica bovina a 1% (BSA 1%; A7906; Sigma), diluídos em PBS/ Triton 0.1% por 2h antes da imunorreação com os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal ZO-1, feito em coelho, utilizado na concentração 1:100 (61-7300; Thermo/ Invitrogen); anticorpo policlonal BDKRB1, feito em coelho, utilizado na concentração 1:300 (BS8675R; Thermo/ Bioss); anticorpo monoclonal TLR4, feito em camundongo, utilizado na concentração 1:300 (MA5-16216; Thermo/ Invitrogen). Os anticorpos primários foram diluídos em solução bloqueio.

A incubação com os anticorpos primários deu-se pelo período de 8-12h a 4°C, em câmara úmida (umedecida com PBS) e escura. Após a incubação, as células e/ou secções de aorta foram lavadas com PBS por três vezes, de 10 minutos cada lavagem, e incubadas com anticorpos secundários em PBS/ BSA 1%, por 2h, à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários foram: cabra anti-camundongo

IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:1000) (A11029; Thermo/ Invitrogen); cabra anti-coelho IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (1:1000) (A11034; Thermo/ Invitrogen); cabra anti-camundongo IgG conjugado com Alexa Fluor 546 (1:1000) (A11030; Thermo/ Invitrogen); cabra anti-coelho IgG conjugado com Alexa Fluor 546 (1:1000) (A1135; Thermo/ Invitrogen).

Após a marcação com anticorpo, as células foram lavadas três vezes com PBS, por 10 minutos cada lavagem. Em alguns casos houve a marcação do citoesqueleto, actina-F, com faloidina-FITC (P5282; Sigma) com incubação de 1h30, à temperatura ambiente, em câmara escura e úmida. Por fim, os núcleos foram marcados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI; D1306; Thermo/ Invitrogen), por 10 minutos. As lamínulas e lâminas foram fechadas com solução de mowiol, após última lavagem com PBS. O material foi mantido em caixa de lâmina, protegido da luz e a -20°C, até a análise.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência (Axio Imager A.1; Zeiss), em objetiva de 20x e 40x, e em microscópio confocal (TCS SPE; Leica), em objetiva de 63x, com ou sem zoom digital de 4x.

Para produção do meio de montagem mowiol, seguiu-se o protocolo: misturar 4.75 ml glicerol (Isofar), 2.4 g mowiol 4-88 (81381, Sigma) em 6 ml de água destilada e deixar em repouso por 2 horas, à temperatura ambiente; adicionar 12 ml Tris base 0.2M (pH 8.5) (Sigma) e azida de sódio 0.02% (opcional) e incubar por, no mínimo, 10 minutos, em temperatura entre 50-60°C; centrifugar entre 4000-5000 rpm por 15 minutos; fazer alíquotas do sobrenadante e manter a -20°C.

## **8 IN-CELL WESTERN**

As células HBMEC foram colocadas para crescer em placa de 96 poços até confluência de 80-100%.

As células foram incubadas, pelo período de 24h, em meio DMEM/F-12 com na presença ou ausência de DBK 1 µM e/ ou LPS 10 µg/ml.

Após os tratamentos, as células foram lavadas três vezes, de 5 minutos cada, com 200 µl PBS, à temperatura ambiente, para então serem fixadas com 200 µl de PFA4% por 20 minutos, também à temperatura ambiente. Três novas lavagens de 5

minutos, com PBS foram feitas antes das células serem permeabilizadas com PBS/ Triton X-100 0.1%, por 5 minutos, e incubadas com 200 µl da solução bloqueio por 2h, à temperatura ambiente. Para 25 ml da solução de bloqueio foram adicionados a 21.25 ml de H<sub>2</sub>O destila, 2.5 ml de PBS 10x, 1.25 ml de NGS (mesma espécie do secundário) e 75 µl de Triton X-100 (100%).

As células foram incubadas em 20 µl da solução de diluição de anticorpos pelo período de 8-12h, à 4°C. Para 40 ml de solução de diluição dos anticorpos foram adicionados a 36 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 4 ml de PBS 10x, 0.4g de BSA e 120 µl de Triton X-100 (100%).

Após o período de incubação, as células foram lavadas com 200 µl de PBS/ Triton X-100 0.1%, por três vezes, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente, para então serem incubadas com os anticorpos secundários, diluídos em 50 µl da solução de diluição de anticorpos, por 2h, à temperatura ambiente e com a placa protegida da luz.

Por fim, as células foram lavadas com 200 µl de PBS/ Tween-20 0.1%, por cinco vezes, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. A placa foi deixada invertida sobre papel toalha para secar e então ser lida em aparelho Odyssey (LI-COR Bioscience) nos comprimentos de onda de 700 nm e 800 nm.

Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policlonal BDKRB1, feito em coelho, utilizado na concentração 1:300 (BS8675R; Bioss/ Thermo); anticorpo monoclonal TLR4, feito em camundongo, utilizado na concentração 1:300 (MA5-16216; Invitrogen/ Thermo); anticorpo anti-beta actina, feito em coelho, utilizado na concentração 1:500 (ab8227; Abcam). Os anticorpos secundários utilizados foram o cabra anti-camundongo IRDye<sup>®</sup>800 CW (1:800) e o cabra anti-camundongo IRDye<sup>®</sup>680 LT (1:800), ambos da LI-COR.

A superfície de vidro do scanner LI-COR Odyssey foi limpa com água Millipore-Q e a placa foi escaneada usando canais de 700 e 800 nm. Os dados foram analisados pelo software UN-SCAN-IT gel (Silk Scientific), com planilha feita em Excel e gráfico em GraphPad Prism 8.0.2.

## 9 COLORAÇÃO CITOLÓGICA COM CRISTAL VIOLETA OU HEMATOXILINA E EOSINA

A coloração de células fixadas de cultura tem como objetivo obter informação qualitativa sobre a densidade de células em cultura. O cristal violeta cora o núcleo em azul escuro e o citoplasma em azul claro, uma vez que se liga a proteína e a DNA. As células expostas ao corante ficam coradas e o excesso de corante é removido.

Após protocolo de *In-Cell Western*, os poços foram lavados em PBS por três vezes, de 5 minutos cada seguindo de adição de solução de cristal violeta (50 µl/ poço de placa de 96) para incubação por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida as células foram novamente lavadas com PBS por três vezes, de 5 minutos cada. Após a terceira lavagem, as placas foram invertidas em guardanapo de papel para que todo o líquido fosse drenado para adição de solução de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS 1%) (200 µl/ poço de placa de 96), para solubilizar as manchas e deixar somente o corante absorvido pelas células. Após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente, o líquido foi retirado e as placas, assim que secas, foram fotografadas.

A coloração hematoxilina e eosina (H&E) foram feitas em lamínulas com células HBMEC submetidas a diferentes condições de cultivo, fixadas com PFA 4% por 20 minutos e lavadas com PBS por duas vezes de 5 minutos cada.

Para coloração das lamínulas com HBMEC, temos a seguinte sequência: (1) H<sub>2</sub>O destilada, 2 minutos; (2) Hematoxilina, 5 minutos; (3) H<sub>2</sub>O corrente, 5 minutos; (4) Eosina, 1 minuto; (5) H<sub>2</sub>O destilada, 2 minutos; (6) Etanol 70% (ISOFAR), 1 minuto; (7) Etanol 80%, 1 minuto; (8) Etanol 90%, 1 minuto; (9) Etanol 100%, 1 minuto; (10) Xileno I ((ISOFAR), 1 minuto; (11) Xileno II, 1 minuto; (12) 10 µl resina Entellan® (Sigma); (13) Colocar lamínula na lâmina e deixar secar por, pelo menos, 2 horas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico (Axio Imager A.1, Zeiss), em objetivas de 20x ou 40x.



Para 100 ml de solução de cristal violeta (0,5%): 0.5 g de pó de cristal violeta (C.I. 42555; Synth) foi diluído em 80 ml de H<sub>2</sub>O destilada e 20 ml metanol (Isofar). A solução foi mantida à temperatura ambiente, protegida da luz.

Para 500 ml de solução SDS 1%: 5 g de SDS (Sigma) foram dissolvidos em 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada. A solução foi mantida à temperatura ambiente.

Para fazer 1L do corante Hematoxilina de Harris, utilizamos: hematoxilina (5 g) (Synth), etanol 100% (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O 100%) (50 ml), sulfato de alumínio e amônio (NH<sub>4</sub>Al(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O) (ISO FAR) ou alúmen de potássio (KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) (100 mg) (ISO FAR), óxido de mercúrio vermelho (2.5 g) (ISO FAR) e H<sub>2</sub>O destilada (completar para 1L). A hematoxilina foi dissolvida no álcool e o alúmen em metade da quantidade de água (água quente, de 70 a 80°C). As soluções foram misturadas e levadas a uma fonte de calor até atingir fervura. Após a fervura, foi retirada da fonte de calor e adicionou-se o óxido de mercúrio. A solução foi aquecida novamente até ficar vermelho escuro; deixada no aquecimento por mais 1 minuto e retirada da fonte de calor. Por fim, a solução corante atingiu a temperatura ambiente, foi filtrada e armazenada em recipiente âmbar. Para a solução de uso, adicionou-se 10 gotas de ácido acético (ISO FAR) para um volume de 200 ml de corante.

Para volume final de 1L do corante Eosina, utilizamos: eosina amarela (5 g) (Synth), H<sub>2</sub>O destilada (100 ml) e etanol 95% (900 ml). Após dissolver a eosina em água destilada, adicionou-se o álcool 95%. Na solução de eosina em uso, adicionou-se ácido acético (200 µl para cada 100 ml).

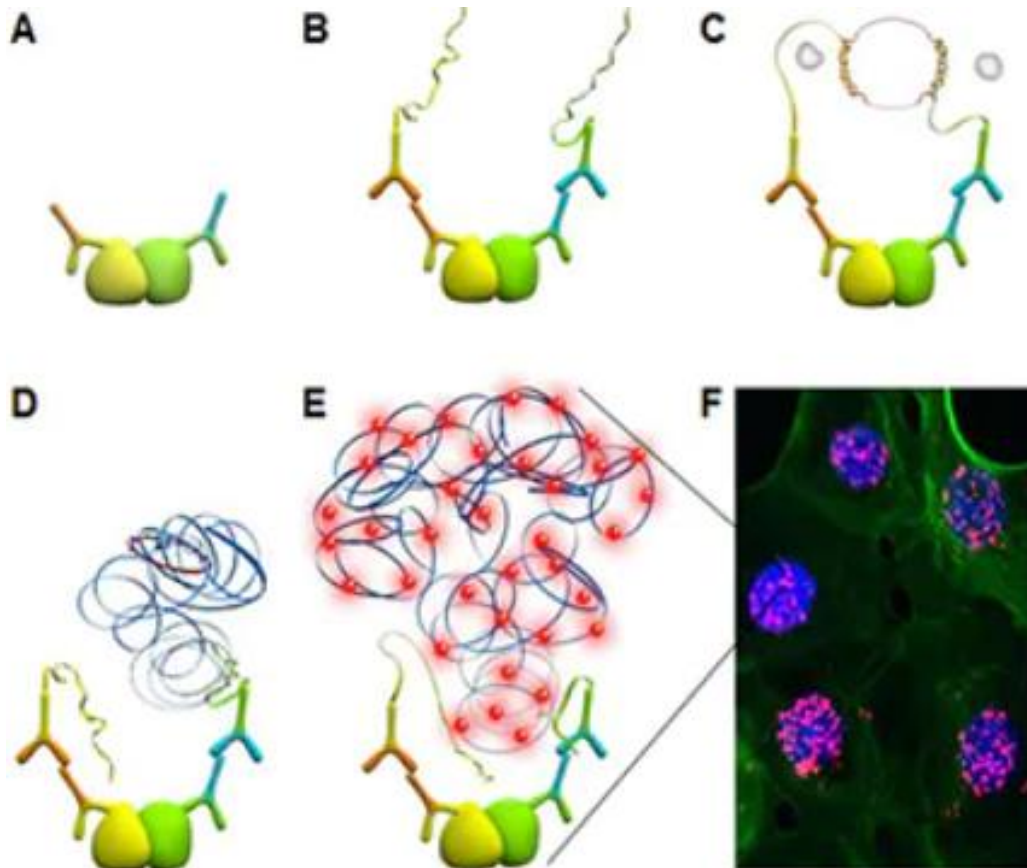
## 10 ENSAIO DE LIGAÇÃO POR PROXIMIDADE

O ensaio de ligação por proximidade Duolink® (PLA, do inglês, *Proximity Ligation Assay*) (Sigma) é uma ferramenta que permite a detecção *in situ* de interações proteicas com alta especificidade e sensibilidade (KLAESSON et al., 2018). Esta tecnologia utiliza primers de DNA específicos ligados covalentemente aos anticorpos; uma etapa de hibridização seguida de amplificação de DNA com sondas fluorescentes, gerando um sinal, localizada em uma discreta forma de pontos fluorescentes, revelando a posição exata do evento de reconhecimento (ALAM, 2018).

A técnica foi realizada em lamínulas com células HBMEC entre 80% e 100% de confluência, incubadas, por 24h, nos meios DMEM/F-12, MCU87 e MCT98G presença ou ausência de DBK 1  $\mu$ M e/ ou LPS 10  $\mu$ g/ ml.

Para a técnica de PLA faz-se necessário dois anticorpos primários criados em espécies diferentes, que são usados para detectar dois alvos proteicos próximos. Os anticorpos primários para B1R e TLR4 foram: anticorpo policlonal BDKRB1, feito em coelho, utilizado na concentração 1:300 (BS8675R; Bioss/ Thermo); anticorpo monoclonal TLR4, feito em camundongo, utilizado na concentração 1:300 (MA5-16216; Invitrogen/ Thermo).

Como exemplificado na **Figura 12**, será respeitada uma sequência de imunocitoquímica para detecção *in situ* das proteínas B1R e TLR4, utilizando-se anticorpos de espécies diferentes, ambos covalentemente ligados a uma sequência de deoxinucleotídeos fita-simples, distintas e não complementares entre si (ALAM, 2018). Essas quimeras moleculares são denominadas provas de PLA, sendo uma positiva (+, anti-B1R) e uma negativa (-, anti-TLR4). Segue-se a essa imunomarcagem com anticorpos primários (+ e -) a adição de oligômeros fita-simples de deoxinucleotídeos capazes de anelarem-se com as extremidades do DNA covalentemente ligado aos anticorpos, além de uma ligase capaz de selar as extremidades aneladas em uma peça circular de DNA fita-simples. Os processos de anelamento e ligação ocorrem se as provas de PLA (+ e -) estiverem em proximidade suficiente (< 40 nm) para que ocorra interação dos oligômeros. Em seguida, são adicionados à reação dNTPs e DNA-polimerase, que irão permitir a amplificação do DNA circular formado em um processo denominado amplificação em círculos. A enzima DNA-polimerase permite a formação de uma longa fita simples de DNA com sucessivas cópias, complementares ao DNA circular original. A terminação do processo e a adição de sondas marcadas com fluoróforo - que consistem de peças de DNA fita-simples complementares à regiões do amplicon da amplificação em círculo permitem, então, a detecção de pontuações fluorescentes que correspondem a eventos de co-localização de B1R e TLR4. Sugere-se que essa colocalização seja decorrente da formação de heterocomplexos constituídos pelos receptores, que estariam, dessa forma, interagindo em um complexo proteico detectável por PLA.



**Figura 12: Esquema de uma reação Duolink® PLA.** (A) Dois anticorpos primários reconhecem proteínas específicas de interesse na célula. Os glóbulos amarelos e verdes representam dois epítomos de uma única proteína ou epítomos em duas proteínas diferentes que estão interagindo. (B) Anticorpos secundários acoplados com oligonucleotídeos (sondas PLA) ligam-se aos anticorpos primários. (C) Quando as sondas de PLA estão próximas, os oligos conectores juntam-se às sondas de PLA e ligam-se. (D) O molde de DNA circular fechado resultante é amplificado pela DNA polimerase. (E) Os oligos de detecção complementar acoplados a fluorocromos hibridizam com sequências repetidas nos amplicons. (F) Os sinais de PLA são detectados por microscopia fluorescente como pontos e fornecem a localização da interação entre proteínas. (Adaptado Sigma: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/how-pla-works>)

Foi utilizado o Duolink® in situ red starter kit mouse/ rabbit (DUO92101; Sigma), seguindo prontamente toda a sua orientação protocolar (<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/duolink-fluorescence-user-manual>).

As lamínulas fixadas em PFA 4%, por 20 minutos, foram lavadas em PBS por 5 minutos para, então, serem permeabilizadas com PBS/ Triton 0.3% por 15 minutos. À seguir, as lamínulas foram incubadas com 40 µl/ lamínula da solução bloqueio (Duolink blocking solution), em câmara úmida, por 60 minutos, a 37 °C.

Na segunda etapa, a solução bloqueio foi retirada das lamínulas com HBMEC para a adição de solução para anticorpo primário, na qual os anticorpos primários serão diluídos no Duolink antibody diluent (40 µl/ lamínula). As lamínulas foram incubadas em câmara úmida, na temperatura de 4°C, pelo período de 8 à 12h.

Para a terceira etapa, a de incubação da sonda PLA, a solução com anticorpos primários é retirada, as lamínulas lavadas com o Tampão A 1x, por duas vezes, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Então, as lamínulas foram incubadas com 40 µl de solução PLA probes PLUS e MINUS (para 40 µl: 8 µl MINUS, 8 µl PLUS, 24 µl diluente de anticorpo), em câmara úmida e escura, por 1h, a 37°C.

Para a reação de ligação, foi retirada a solução da sonda de PLA e as lamínulas foram lavadas com o Tampão A 1x, por duas vezes, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente. A seguir as lamínulas foram incubadas com 40 µl de solução de ligação (para 40 µl: 39 µl da solução de ligação 1x e 1 µl de ligase; para a solução de ligação 1x, diluir 8 µl do Duolink ligation buffer em 32 µl de água ultrapura), em câmara úmida e escura, por 30 minutos, a 37°C.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com o Tampão A 1x, por duas vezes, de 5 minutos cada, à temperatura ambiente, para, então, serem incubadas com 40 µl/ lamínula da solução de amplificação (para 40 µl: 39.5 µl da reação de amplificação e 0.5 µl de polimerase 1x; para a solução de amplificação, diluir 8 µl do tampão 5x de amplificação em 32 µl de água ultrapura), em câmara úmida e escura, por 100 minutos, a 37°C.

A solução de amplificação foi retirada, a lamínulas lavadas com o Tampão B 1x, por duas vezes, de 10 minutos cada, à temperatura ambiente para que as lamínulas fossem incubadas com faloidina-FITC por 1h30, à temperatura ambiente, em câmara escura e úmida.

Para a lavagem final foi retirada a solução de amplificação, que foram lavadas com o Tampão B 1x, por duas vezes, de 10 minutos cada, à temperatura ambiente, seguido de lavagem de 1 minuto com Tampão B 0.01x.

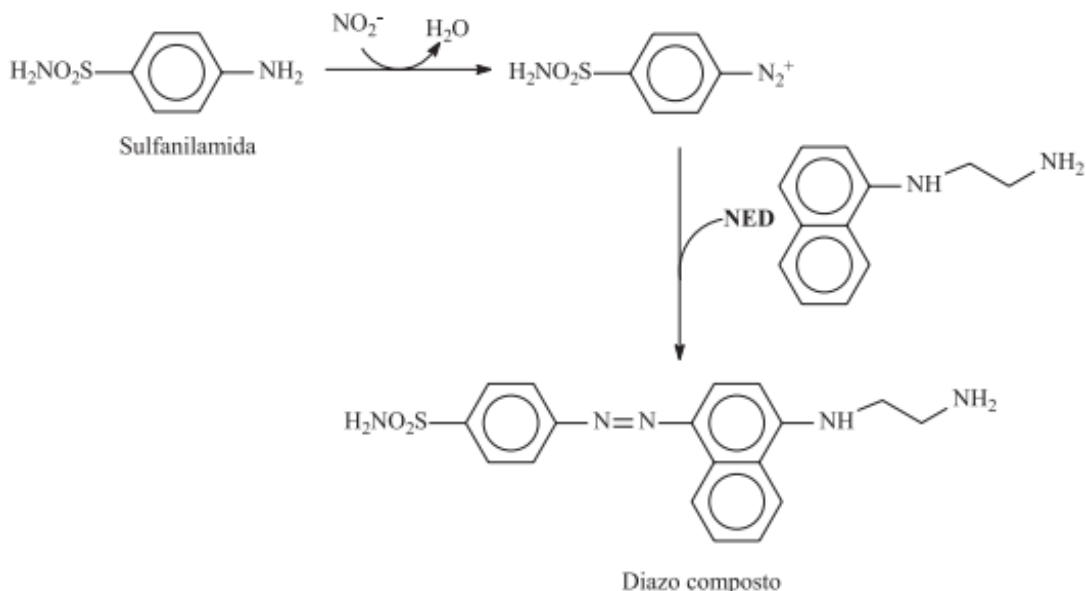
O excesso de líquido foi retirado das lamínulas para que as lâminas fossem montadas com volume mínimo do meio de montagem com DAPI.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência (Axio Imager A.1, Zeiss), em objetivas de 20x ou 40x, e em microscópio confocal TCS SPE (Leica), em objetiva de 63x, com ou sem zoom digital de 4x.

## 11 MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE NITRITO E NITRATO

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples que, quando diluído, tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. No organismo, o NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). A demonstração da produção de NO é ainda difícil, sendo sempre feita de maneira indireta, considerando-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A produção de NO foi determinada indiretamente através do ensaio de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), um metabólito estável do NO, baseado na reação de Griess (TSIKAS, 2007; DINIZ et al., 2017). Nesta reação, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido; o diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa (RAMOS et al., 2006) (Figura 13).



**Figura 13: Reação de Griess.** Para determinação do nitrito os procedimentos são baseados na reação de Griess, na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O

diázo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa. A reação é controlada pelo tempo, e o produto deve ser determinado entre 10 min e 2 h após a mistura dos reagentes. (Adaptado de RAMOS et al., 2006)

Em uma placa de 96 poços, uma alíquota de 50 µl de meio condicionado foi misturada com 50 µl da solução de sulfanilamida 1%, deixando incubar por 5-10 minutos, a temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, adicionou-se 50 µl da solução NED 0.1%, também incubada por 5-10 minutos, a temperatura ambiente e protegido da luz. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices), em programa SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices).

As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) variando de 0 a 100 µM (**Tabela 2**). A quantidade de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi subtraída dos valores experimentais.

**Tabela 2: Curva padrão para Reação de Griess.**

	Concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µM)	Volume de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (µl)	Volume do meio (µl)	Volume final (µl)
<b>A</b>	0	0	50	50
<b>B</b>	1,56	0,78	49,2	50
<b>C</b>	3,33	1,57	48,4	50
<b>D</b>	6,25	3,13	46,9	50
<b>E</b>	12,50	6,25	43,8	50
<b>F</b>	25,00	12,5	37,5	50
<b>G</b>	50,00	25	25	50
<b>H</b>	100,00	50	0	50

A solução padrão de íons nitrito foi preparada dissolvendo 0.1 M nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em água destilada.

A solução de sulfanilamida 1% foi feita dissolvendo o pó da sulfanilamida em ácido fosfórico 10%. A solução deve ficar protegida da luz.

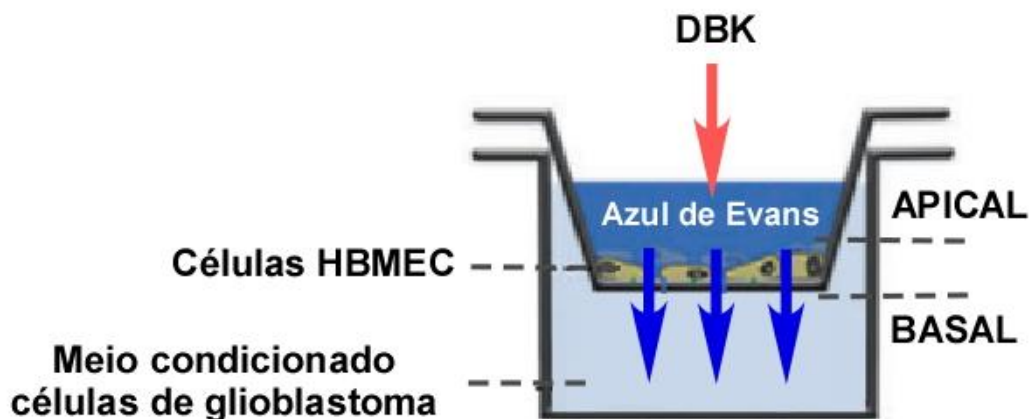
A solução NED 0.1% foi feita dissolvendo o pó N-(1-naftil) etilenodiamina em água destilada. A solução deve ficar protegida da luz.

Tanto a análise dos meios condicionados quanto a curva padrão foram feitas em triplicata.

## 12 ENSAIO DE PERMEABILIDADE PARECELULAR

Células de linhagem HBMEC foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$  células) em insertos transwell com  $0.4 \mu\text{m}$  de tamanho do poro (140620, Thermo). Após confluência de 100%, foram adicionados 400  $\mu\text{l}$  de meio DMEM/F12 ou meios condicionados de T98G ou de U87MG na porção basal dos insertos de cultura. Na porção apical da monocamada de células confluentes foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  meio DMEM/F12 com ou sem DBK  $1 \mu\text{M}$  (**Figura 14**).

Após 23 h da administração da DBK, 200  $\mu\text{l}$  de azul de Evans 1% foi adicionado na porção apical do inserto, e o meio da porção basal foi coletado 1h depois (24h da administração da DBK).



**Figura 14: Permeabilidade das HBMECs cultivadas em Transwell.** A permeabilidade das HBMECs cultivadas em insertos Transwell foi avaliada usando o corante azul de Evans ligado ao BSA. Na porção basal foram adicionados meio DMEM/F-12 com soro (condição controle), MCT98G ou MCU87. Na porção apical foi adicionado DBK  $1 \mu\text{M}$  em meio DMEM/F-12 com soro, para tratamento de 24h. Com 23h de tratamento, foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  de azul de Evans 1% na porção apical do inserto. Completadas as 24h do tratamento e 1h de corante, o meio da porção basal foi coletado para leitura a 620 nm.

O meio coletado da porção basal foi plaqueado em placa de 96 poços (50  $\mu\text{l}$ /poço), em triplicata. A presença do corante foi medida na absorbância de 620 nm em leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices), em programa SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices). Os dados foram analisados em programa Excel e gráfico e análise estatística em programa GraphPad Prism 8.0.2.

A concentração de corante no meio basal foi calculada em relação à curva padrão (mg/ml), com pontos entre 0 e 10 mg/ml.

Para a solução estoque de Azul de Evans 2%, utilizamos: 10 ml de meio DMEM/F-12 com soro, 0.02 g BSA, 0.2 g azul de Evans (Merck). Para uso, diluímos 1 ml da solução estoque em 1 ml de meio DMEM/F-12 com soro.

### **13 EXPERIMENTO *IN VIVO***

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos da linhagem Swiss (n = 72), que foram divididos em grupo controle (CTRL) e grupo C6, camundongos que foram inoculados com células de linhagem C6 de glioblastoma para indução de tumor no parênquima cerebral.

Para o procedimento cirúrgico, cada animal recebeu para anestesia uma associação de relaxante muscular e anestésico, cetamina e xilazina por via intraperitoneal (100mg/ kg e 20 mg/ kg, respectivamente). Após determinação do plano anestésico adequado e avaliação de ausência nos reflexos flexores, o animal foi posicionado em aparelho estereotáxico, com controle/monitoramento de temperatura corporal e de suas condições vitais. Seguindo coordenadas estereotáxicas pré-determinadas para injeção no caudado putamen (coordenadas a partir do bregma: 0.5mm posterior, 2.0 mm para esquerda e 3.5 mm de profundidade), e com o auxílio de uma seringa do tipo Hamilton (5 µl), serão injetadas 500 mil células C6 diluídas em 1 µl de meio de cultivo sem soro (DMEM/F-12), numa velocidade de 10 minutos entre cada microlitro injetado, totalizando 3 µl. Os animais CTRL foram submetidos ao procedimento cirúrgico, recebendo 3 µl de DMEM/F-12 sem células.

Após a lenta retirada da seringa, o local da incisão será suturado com fio monofilamentado de nylon 4/0. O animal será, então, retirado do aparelho estereotáxico e recolocado na gaiola. O cuidado pós-operatório envolve administração de analgésico cloridrato de tramadol na dose 10 mg/ kg via IP, imediatamente após o procedimento de sutura, com repetição a cada 12h por, no mínimo 48h (será avaliada a necessidade e uma manutenção por mais tempo em caso de sinais de dor); após o término da cirurgia e da devida recuperação anestésica, o animal irá retornar ao biotério, por onde ficará pelo período entre 18 e 20 dias.



## 14 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA *IN VIVO* COM AZUL DE EVANS

No décimo nono dia da cirurgia, os animais foram separados em grupos. Em primeiro experimento, para análise de abertura transitória da BHE, animais controles e inoculados com C6 foram tratados com DBK 1  $\mu$ M (diluído em 100  $\mu$ l de salina para injeção subcutânea na região da virilha) e, 23h ou 47h após essa, receberam a injeção de solução de azul de Evans 2% (100  $\mu$ l, veia da cauda, seringa com agulha hipodérmica 6x0.25 mm) (JUN-XIA et al., 2015; GOLDIM et al., 2019). Após 24h ou 48h da injeção de DBK, 1h da injeção de azul de Evans, os animais receberam dose letal de anestésico (cetamina e xilazina) em concentração três vezes maior que a necessária para anestesia e submetidos à perfusão transcardíaca com perfusão de salina 0.9% através de bomba peristáltica, por 10 minutos. Após a perfusão, os cérebros destinados à extração de azul de Evans. Para tal, os cérebros foram removidos da caixa craniana, pesados e imersos em 500  $\mu$ l de formalina (Merck), pelo período de 48h, à temperatura ambiente, para a extração do corante presente no tecido cerebral.

A formalina de cada amostra foi plaqueada em placa de 96 poços (triplicata de cada amostra), em volume de 100  $\mu$ l/poço. A quantidade de corante presente na formamida foi medida em absorbância de 620 nm (RADU & Chernoff, 2013; WICK et al., 2018) em leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices), em programa SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices). 100  $\mu$ l de formamida pura foram adicionadas em poço da placa para ser o branco, controle da leitura.

A concentração de corante foi calculada na razão de absorção em relação à quantidade de tecido (OD620 nm/g tecido) (RADU & Chernoff, 2013; JUN-XIA et al., 2015; WICK et al., 2018). Os dados foram analisados em programa Excel e gráfico e análise estatística em programa GraphPad Prism 8.0.2.

Para a solução Azul de Evans 2%, utilizamos: 10 ml de soro fisiológico 0.9%, 0.2 g azul de Evans (Merck).

## 15 ENTREGA DE DOXORRUBICINA EM CÉREBRO DE CAMUNDONGO

Em um segundo experimento *in vivo*, fomos observar se DBK 1  $\mu\text{M}$  permite abertura transitória da barreira permitindo a passagem de agente quimioterápico que não ultrapassa a BHE quando esta se encontra intacta. Para tal, foi utilizado o quimioterápico doxorubicina.

Neste experimento, animais controles e inoculados com células de linhagem C6 de glioma de rato foram tratados com DOX 4 mg/ kg (100  $\mu\text{l}$ , veia da cauda) (SIKPA et al., 2020), na presença ou ausência de DBK 1  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{l}$ , injeção subcutânea na região da virilha). A DOX foi injetada 1h após a injeção da DBK. Quando completado 24 horas da injeção do peptídeo, os animais receberam dose letal de anestésico (cetamina e xilazina) em concentração três vezes maior que a necessária para anestesia e submetidos à perfusão transcardíaca com perfusão de salina 0.9% através de bomba peristáltica, por 10 minutos. Após a perfusão, os cérebros foram removidos da caixa craniana e divididos em aqueles destinados à secção histológica e destinados à extração do quimioterápico presente no parênquima cerebral.

O material destinado à histologia, para que fosse observado a biodistribuição de DOX no tecido cerebral, foi imerso em PFA 4%, em temperatura ambiente. Após 24h os cérebros foram criopreservados em sacarose 10%, sacarose 20% e sacarose 30%, ficando cerca de 24h em casa uma delas. Ao final o material foi emblocado em meio de montagem para inclusão de cortes em criostato (Meio Tissue-Tek O.C.T.; Sakura). Os tecidos cerebrais foram cortados em criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em secções coronais de 10  $\mu\text{m}$  de espessura coletadas em lâminas Starfrost (Knitell). As secções coletadas foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para observar as características de fluorescência do DOX, os núcleos foram corados com DAPI e as lâminas fechadas com mowiol. As imagens foram feitas em microscópio Axiolmager A.1 (Zeiss) (objetiva de 10x e 20x), microscópio confocal TCS SPE (Leica) (objetiva de 20x) e microscópio EVOS M5000 (Invitrogen/ Thermo) (objetiva de 20x).

Os cérebros destinados à extração do quimioterápico foram pesados e imersos em 500  $\mu\text{l}$  de etanol acidificado (etanol 50% em HCl 0.3 N). Após serem

picotadas e mantidas a 4°C por 24h, as amostras foram centrifugadas a 16.000xg por 25 minutos para coleta do sobrenadante.

O etanol ácido de cada amostra foi plaqueado em placas de 96 poços (triplicata de cada amostra), em volume de 100 µl/poço. A quantidade de DOX presente no diluente foi medida na absorbância de 496 nm (SIKPA et al., 2020), em leitor de placa FlexStation 3 (Molecular Devices), em programa SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices). 100 µl de etanol acidificado puro foram adicionados em poço da placa para ser o branco, controle da leitura.

A concentração do quimioterápico foi calculada na razão de absorção em relação à quantidade de tecido (OD496 nm/g tecido). Os dados foram analisados em programa Excel e gráfico e análise estatística em programa GraphPad Prism 8.0.2.

Para 20 ml de etanol ácido, utilizamos: 10 ml de álcool etílico P.A. (ISO FAR), 10 ml de HCl 0.3 N (248 µl HCl 37% (ISO FAR), 9.752 ml água destilada.

## **16 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM CRISTAL VIOLETA OU HEMATOXILINA E EOSINA**

Parte das lâminas com secções histológicas (espessura de 6 µm) de tecido cerebral dos animais controle e aqueles inoculados com células C6 foram destinadas à coloração com cristal violeta ou H&E.

Para coloração dos cortes com cristal violeta, temos a seguinte sequência: (1) H<sub>2</sub>O destilada, 5 minutos; (2) Solução cristal violeta, 5 h; (3) H<sub>2</sub>O corrente, 15 minutos; (4) Deixar os cortes secarem; (5) Adicionar 10 µl resina Entellan® (Sigma); (13) Colocar lamínula na lâmina e deixar secar por, pelo menos, 2 horas.

Para coloração das lâminas com secções cerebrais com e sem tumor de C6 com H&E, temos a seguinte sequência: (1) H<sub>2</sub>O destilada, 5 minutos; (2) Hematoxilina, 10 minutos; (3) H<sub>2</sub>O corrente, 10 minutos; (4) Eosina, 2 minutos; (5) H<sub>2</sub>O destilada, 5 minutos; (6) Etanol 70% (ISO FAR), 5 minutos; (7) Etanol 80%, 5 minutos; (8) Etanol 90%, 5 minutos; (9) Etanol 100%, 5 minutos; (10) Xileno I ((ISO FAR), 5 minutos; (11) Xileno II, 5 minutos; (12) 50 µl resina Entellan® (Sigma); (13) Colocar lamínula na lâmina e deixar secar por, pelo menos, 2 horas.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico (Axio Imager A.1, Zeiss), em objetivas de 20x ou 40x.

Para a solução estoque de cristal violeta, utilizamos: 14 g de cristal violeta (ISOFAR), 100 ml de etanol 95% (95 ml etanol P.A. + 5 ml H<sub>2</sub>O destilada).

Para a solução funcionante de cristal violeta, utilizamos: 10 ml da solução estoque de cristal violeta, 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 1 ml de ácido clorídrico P.A.

## **17 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT**

O efeito citotóxico do tratamento da DBK 1  $\mu$ M (administração em dose única) sob as células de linhagem de glioblastoma (T98G, U87MG e C6) foi analisado pelo ensaio de MTT (Brometo de 3-4,5-Dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio; do inglês, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (M6494; Thermo).

As linhagens celulares T98G, U87MG e C6 foram plaqueadas em placa de 96 poços (20.000 células/ poço) e mantidas em 100  $\mu$ l de meio DMEM/F12 com soro. Após 24h de crescimento em estufa apropriada para cultivo celular, as células foram tratadas, em volume final de 100  $\mu$ l de DMEM/F-12 + fármacos, em triplicada de cada condição. As condições de tratamento foram: controle, DBK 1  $\mu$ M, DOX 5  $\mu$ M (DU et al., 2020), DBK + DOX, TMZ 500  $\mu$ M (LEE et al., 2016; WANG et al., 2016; SONI et al., 2021), TMZ 750  $\mu$ M, TMZ 1000  $\mu$ M, TMZ 500 + DOX, TMZ 750 + DOX, TMZ 1000 + DOX, TMZ 500 + DOX + DBK, TMZ 750 + DOX + DBK, TMZ 1000 + DOX + DBK.

Após 72h de tratamento, foi adicionado 10  $\mu$ l de MTT em cada poço. As placas ficaram em estufa de cultivo celular, por 2h. Então, todo o meio foi retirado, com muito cuidado por conta de pequenos cristais que se formaram na reação, para que fosse adicionado 100  $\mu$ l de DMSO, o qual vai dissolver os cristais. Quanto mais cristais, mais células vivas.

A intensidade MTT (100  $\mu$ l/ poço), foi medida em leitor de placa, FlexStation 3 (Molecular Devices), em programa SoftMax Pro 5.4 (Molecular Devices), na absorbância de 570 nm. A viabilidade celular foi calculada considerando a curva padrão com diferentes concentrações de MTT em DMSO e os dados foram

analisados em programa Excel e gráfico e análise estatística em programa GraphPad Prism 8.0.2.

Para estoque de MTT: 2 ml de DMSO estéril (D4540, Sigma), 1 mg de MTT. O estoque foi mantido a -20°C até o uso.

## **18 ANÁLISES DE DADOS**

As planilhas de dados foram feitas em programa Excel (Microsoft Office 2010).

As análises estatísticas foram feitas no programa Graphpad Prism 8.0.2 (La Jolla, CA, USA), com análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ou teste de Holm-Sidak, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ou teste t, de acordo com a especificidade de cada experimento.

As imagens capturadas em microscopia confocal foram analisadas em Fiji-ImageJ (NIH, Maryland, Estados Unidos). Cada lamínula teve de três a cinco regiões fotografadas e analisadas de acordo com o interesse.

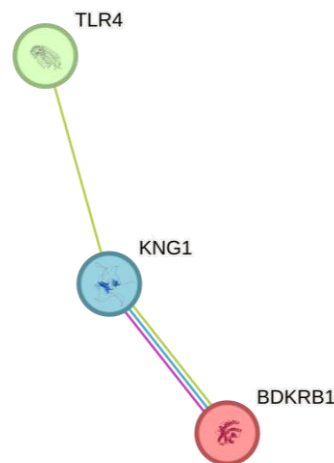
As imagens foram trabalhadas em ajuste de brilho e contraste em programa ACDSsee Canvas 11.

Para as imagens fotografadas em microscopia de contraste de fase, todas as células das imagens foram contadas para a quantificação total e, depois, contadas somente as células de perfil não alongado.

## RESULTADOS

### 1 ANCORAGEM MOLECULAR DE B1R E TLR4

Tendo em vista dados da literatura que indicam uma possível relação entre as vias dos receptores B1R e TLR4 através da resposta de seus agonistas, fomos observar o perfil de interação proteína-proteína em humano e em camundongo. O perfil obtido pelo STRING pode ser observado na **Figura 15**, onde vemos que o banco de dados indica como proteína de interação entre as vias o cininogênio 1 (KNG1), proteína precursora da bradicinina.



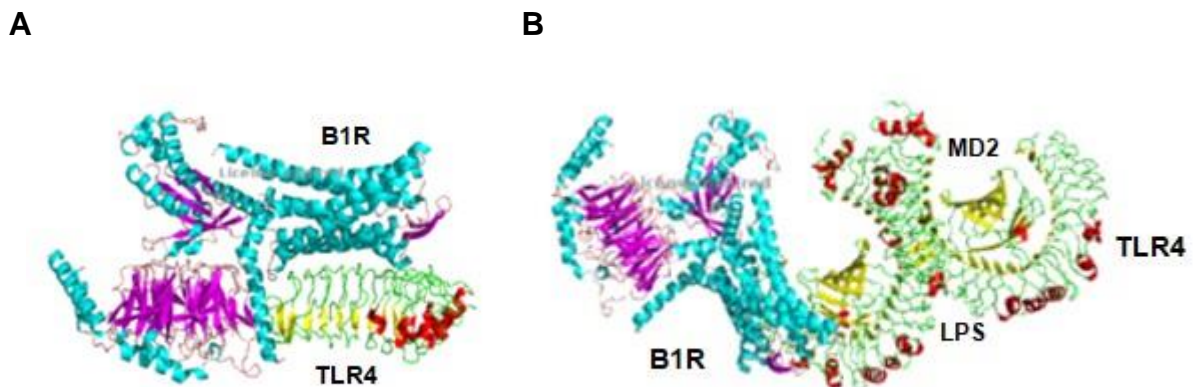
**Figura 15: Perfil de interação B1R–TLR4 fornecido pelo STRING.** Tanto em humanos quanto em camundongos o programa indicou interações conhecidas entre B1R (BDKRB1) e KNG1, em linha azul (de banco de dados selecionados) e linha roxa (determinado experimentalmente). A linha verde tanto entre KNG1 e B1R e TLR4 indica relação encontrada em textos do banco de dados. As associações indicam que as proteínas contribuem conjuntamente para uma função partilhada, mas isso não significa necessariamente que elas estejam fisicamente ligadas uma à outra.

Considerando que as associações indicam que as proteínas contribuem conjuntamente para uma função partilhada, mas não significando que necessariamente estejam fisicamente vinculadas entre si, fizemos a análise de ancoragem através do servidor ClusPro (KOZAKOV et al., 2017).

Para configuração do servidor, consideramos quatro situações experimentais: (1) receptor: B1R, ligante: TLR4; (2) receptor: TLR4, ligante: B1R; (3) receptor: B1R, ligante: TLR4 (complexo dimérico); (4) receptor: TLR4 (complexo dimérico), ligante: B1R.

Foram selecionados os resultados levando em consideração que são dois receptores, interações que seriam na parte intracelular ou extracelular dos receptores, e de Kozakov e colaboradores (2017), com a seleção do modelo também levando em consideração os diferentes conjuntos de parâmetros produziram o mesmo modelo.

Na **Figura 16** apresentamos conformações de ancoragens indicadas pelo servidor, considerando TLR4 como estrutura monomérica (**A**) ou um complexo dimérico (**B**). Não houve diferença entre colocar B1R ou TLR4 como receptor ou ligante, quando feita a configuração do servidor.



**Figura 16: Modelos de ancoragem dos receptores B1R e TLR4. (A)** Ancoragem B1R-TLR4 (monômero); **(B)** Ancoragem B1R-TLR4 (complexo dimérico).

Para cada configuração, foram gerados quatro conjuntos de modelos usando os esquemas de pontuação chamados (1) balanceado, (2) favorecido eletrostático, (3) favorecido hidrofóbico e (4) Van der Waals + eletrostático (KOZAKOV et al., 2017). As diferenças na ponderação dos coeficientes de energia representam diferenças reais nas forças biofísicas que dominam as interações entre duas proteínas (KOZAKOV et al., 2017). Conforme orientação da literatura para uma simples análise das ligações, escolhemos os modelos do tipo balanceados (KOZAKOV et al., 2017; YUEH et al., 2017).

Selecionado os modelos, analisamos a tabela com as pontuações de cada modelo, seguindo configurações do sistema (KOZAKOV et al., 2013; KOZAKOV et al., 2017). A tabela fornecida pelo programa lista os agrupamentos de estruturas na ordem do tamanho do cluster, sendo que para cada cluster a tabela mostra o tamanho (o número de estruturas ancoradas), a energia do centro do cluster (a

estrutura que tem o maior número de estruturas vizinhas no cluster), e a menor energia na estrutura (KOZAKOV et al., 2017). Quanto menor o valor de energia, mais forte a interação entre os grupos químicos do ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína (KOZAKOV et al., 2017). Assim, na **Tabela 3** indicamos os valores dos modelos escolhidos no resultado do ClusPro para cada uma das configurações propostas ao programa.

**Tabela 3: Resultados do ClusPro mostrando as pontuações dos modelos escolhidos da ancoragem entre B1R e TLR4.**

<b>Cluster Receptor/Receptor</b>	<b>Membros no cluster</b>	<b>Representante</b>	<b>Pontuação ponderada</b>
<b>TLR4/ B1R</b>	94	Energia no centro do cluster	-1035.0
		Estrutura de menor energia no cluster	-1219.7
<b>TLR4 (complexo dimérico)/ B1R</b>	99	Energia no centro do cluster	-1325.5
		Estrutura de menor energia no cluster	-1435.8

Com base nesses resultados obtidos dos ensaios *in silico* e nos dados da literatura, fomos aprofundar os conhecimentos na interação entre os receptores B1R e TLR4 e como esta pode ser explorada para avanços terapêuticos.

Assim, os resultados foram divididos em duas partes. Na primeira parte fomos buscar entender a relação do LPS com o receptor B<sub>1</sub> de cininas, visto as evidências na literatura que indicam as respostas de B1R quando as células endoteliais *in vivo* e *in vitro* são expostas ao LPS. Na segunda parte, buscamos saber se a administração da DBK promove a modulação das junções ocludentes que limitam o transporte paracelular da camada endotelial de vasos e assim, permite a passagem de fármacos para o parênquima cerebral.



## 2 PARTE 1: RELAÇÃO ENTRE B1R E TLR4 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

### 2.1 POTENCIAL DE MEMBRANA EM ANÉIS DE AORTA TORÁCICA

Registros intracelulares foram utilizados para medir o potencial de membrana de células musculares lisas através do empalamento com microeletrodos na camada íntima, bem como na adventícia, dos anéis de artéria torácica.

Neste estudo, comparamos as respostas do potencial de membrana aos agonistas de B1R (DBK e R838) e TLR4 (LPS) em aortas de camundongos C57BL/6 WT, camundongos nocautes para o receptor B<sub>1</sub> de bradicinina (B<sub>1</sub>KO) e camundongos nocautes para o receptor TLR4 (TLR4KO). A presença de um endotélio funcional foi testada em todas as preparações para verificar se a ACh induz hiperpolarização das preparações, uma resposta que é característica para vasos com endotélio intacto (FURCHGOTT, 1981).

Nos modelos animais escolhidos deste estudo não houve diferença no potencial de membrana em repouso dos anéis de aorta de camundongos WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO (**Tabela 4**) (**Figura 17**).

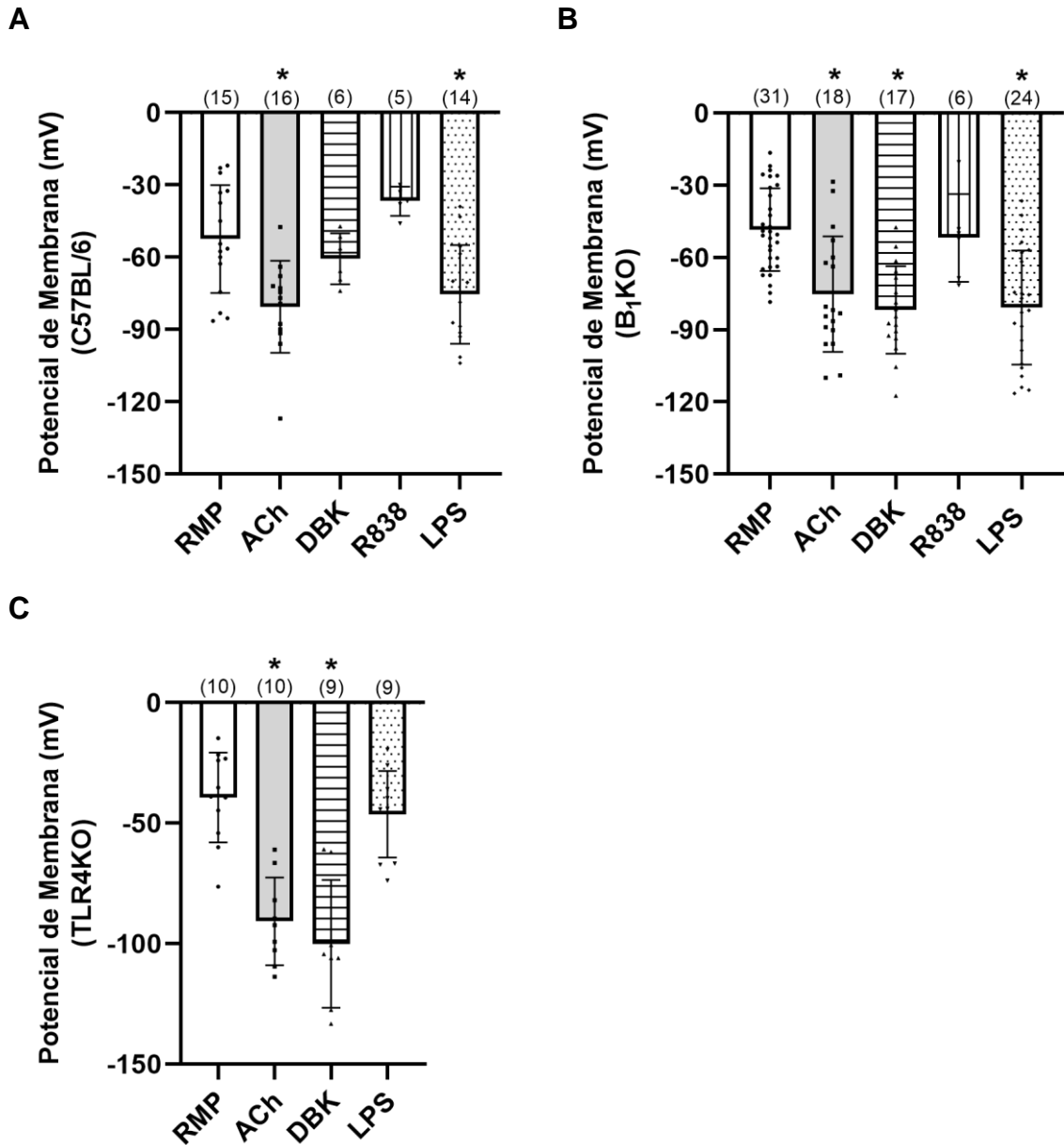
**Tabela 4: Efeito da DBK e LPS no potencial de membrana (em mV) de anéis de artéria torácica de camundongos C57BL/6 WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO.**

	RMP	DBK	R838	LPS
<b>C57BL/6 WT</b>	-52.42±5.58	-60.66±4.32	-36.75±2.70	-75.44±5.48*
<b>B<sub>1</sub>KO</b>	-48.40±3.08	-81.77±4.40*	-51.82±7.47	-80.73±4.84*
<b>TLR4KO</b>	-39.30±5.62	-100.10±9.38**		-46.28±5.68

RMP, potencial de membrana em repouso (*do inglês*, Resting Membrane Potential); DBK, des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina; R838, Sar-[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina; LPS, lipopolissacarídeo. Para cada anel de artéria aorta analisado, foram feitos 5 empalamentos e as médias das respectivas medidas foram usadas para obtermos a média + desvio padrão. \*p<0.05 versus RMP e R838. \*\*p<0.05 versus RMP e LPS (TLR4KO) (Teste de Tukey).

Os agonistas de B1R, DBK e R838, não afetaram o potencial de membrana dos anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT, ao contrário do LPS (**Figura 17A**). Em anéis de aorta torácica de camundongos B<sub>1</sub>KO, houve a hiperpolarização da membrana pela DBK e LPS, mas não pelo R838, agonista farmacológico seletivo de B1R (**Figura 17B**). Já em camundongos TLR4KO

observamos hiperpolarização pela DBK e não por LPS (**Figura 17C**) dos anéis aórticos.



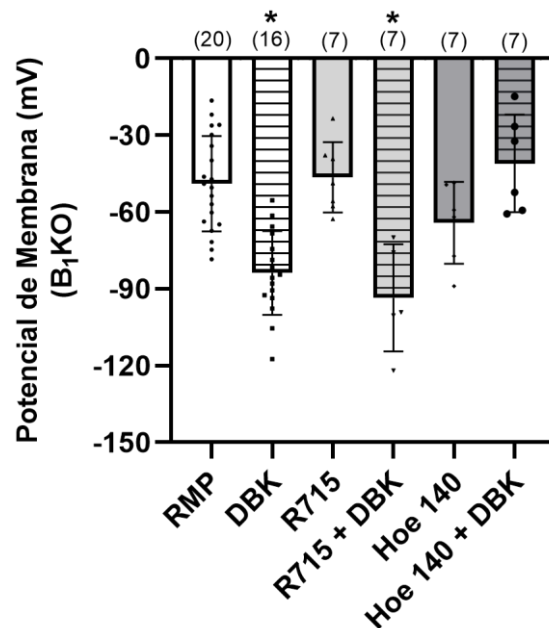
**Figura 17: Efeito dos agonistas de B<sub>1</sub>R e TLR4 em aorta torácica. (A)** LPS hiperpolariza a aorta torácica de camundongo C57BL/6 WT sem estímulo de abertura ou fechamento de canais. DBK e R838 não hiperpolarizam a membrana em repouso. **(B)** DBK e LPS hiperpolarizaram a membrana de artéria aorta de camundongos B<sub>1</sub>KO, enquanto que o R838 não. **(C)** DBK hiperpolarizou a membrana de artéria aorta de camundongos TLR4KO, enquanto que o LPS não. **(A)** \* $p < 0.05$  versus RMP, DBK e R838; **(B)** \* $p < 0.05$  versus RMP e R838; **(C)** \* $p < 0.05$  versus RMP e LPS (Teste de Tukey).

Esses dados indicam que a resposta de LPS é específica e via seu receptor TLR4, e não via ligação ao receptor B<sub>1</sub>R. Já a DBK parece estimular a resposta de outro receptor que não seja o B<sub>1</sub>R, quando este está ausente.

## 2.2 ANTAGONISTA DE B2R BLOQUEIA O EFEITO DA DBK EM AORTA DE CAMUNDONGOS B<sub>1</sub>KO

Como observamos hiperpolarização pela DBK em aorta de camundongos B<sub>1</sub>KO, buscamos rapidamente analisar a hipótese de que este efeito se deu via receptor B2R.

O antagonista de B1R, R715, não inibiu a hiperpolarização estimulada pela DBK; porém, após incubação com Hoe 140, antagonista de B2R, houve inibição do efeito observado após incubação com a DBK (**Figura 18**).



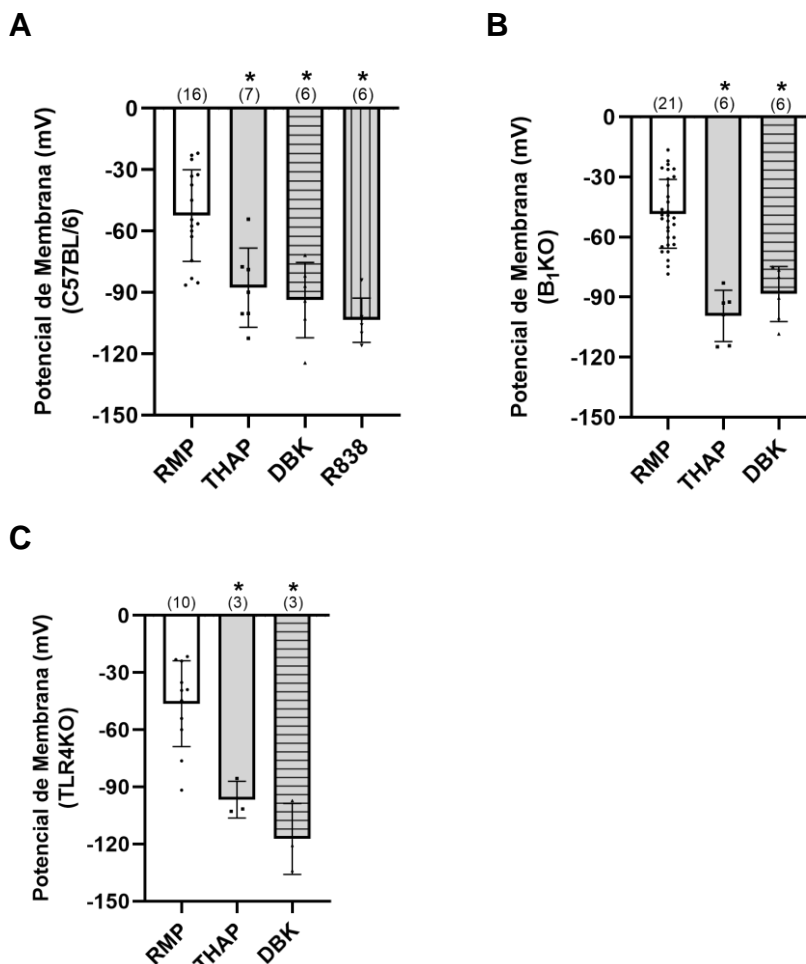
**Figura 18: Hoe 140 inibe o efeito da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos B<sub>1</sub>KO.** DBK hiperpolariza a aorta torácica de camundongo B<sub>1</sub>KO, efeito inibido pela Hoe 140, antagonista de B2R, mas não pela R715, antagonista de B1R. \*p<0.05 versus RMP, R715 e Hoe140 + DBK (Teste de Tukey).

Com a constatação de que, na ausência de B1R, a DBK se liga a B2R (LEEB-LUNDBERG et al., 2005), fomos analisar canais de K<sup>+</sup> e a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> na resposta de DBK e LPS (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005) nas aortas dos modelos analisados neste estudo.

### 2.3 A ATIVIDADE DA DBK EM AORTA TORÁCICA DOS CAMUNDONGOS B<sub>1</sub>KO E TLR4KO É DEPENDENTE DE CANAIS DE K<sub>Ca</sub> E K<sub>ATP</sub>

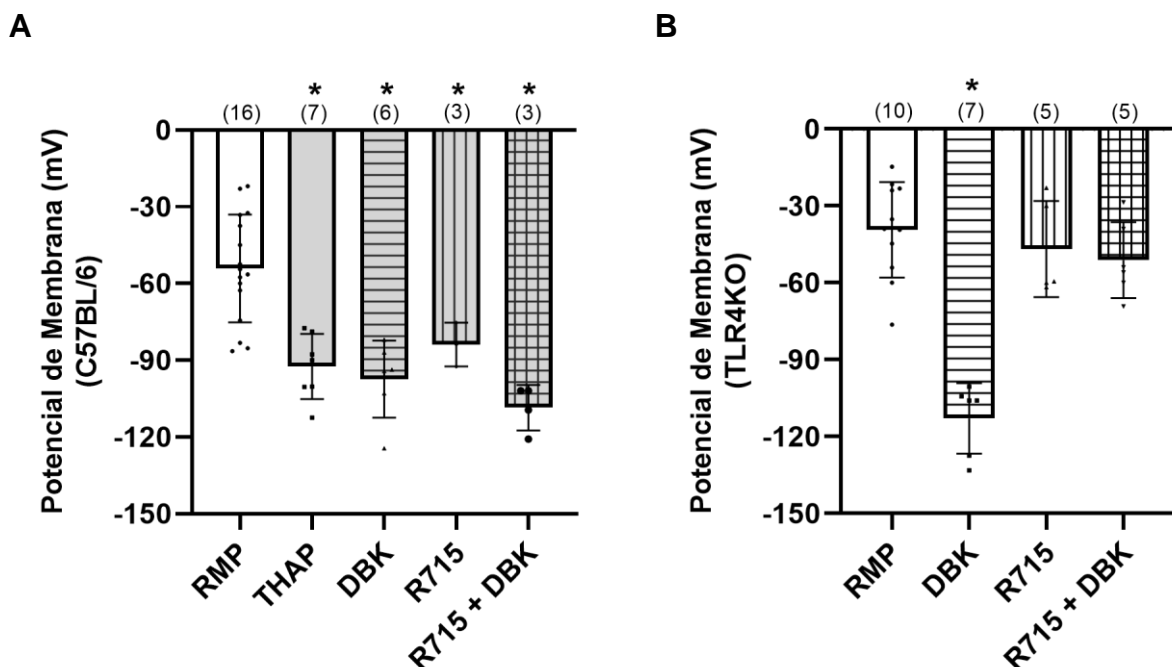
Em modelos de aortas de ratos, a adição de THAP, inibidor da SERCA (Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático), bomba que transporta íons de cálcio do citoplasma para o retículo sarcoendoplasmático, promove o aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular, o que causa uma acentuada hiperpolarização que não é revertida lavando a preparação por pelo menos 2 h e é completamente inibida pela adição de IBTX, indicando a relação dos canais K<sub>Ca</sub> (FARIAS et al., 2005). Em nossos modelos observamos a mesma dinâmica de efeito da THAP (**Figura 19**), mas esta não foi acentuada pela DBK tanto nas aortas de C57BL/6 (**Figura 19A**) quanto de B<sub>1</sub>KO (**Figura 19B**), enquanto que nos anéis aórticos de TLR4KO sim (**Figura 19C**).

Como nas aortas de C57BL/6 a DBK não promoveu a atividade de B1R nem antes ou depois de THAP, repetimos o experimento com R838 e tivemos o mesmo resultado (**Figura 19A**).



**Figura 19: A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO é independente do influxo de cálcio.** A aorta do camundongo foi perfundida com THAP 1  $\mu$ M, causando uma hiperpolarização que não foi revertida após lavagem com solução de Krebs. Esse efeito não provocou uma hiperpolarização ainda maior pela DBK tanto em aortas de C57BL/6 WT **(A)** quanto nas aortas dos animais nocautes B<sub>1</sub>KO **(B)**. A hiperpolarização é intensificada em TLR4KO quando estas foram incubadas com DBK, após THAP **(C)**, mas nesses animais parte dos receptores já estavam ativos em situação controle, como indicado na Figura 10. **(A – C)** \* $p < 0.05$  versus RMP (Teste de Tukey).

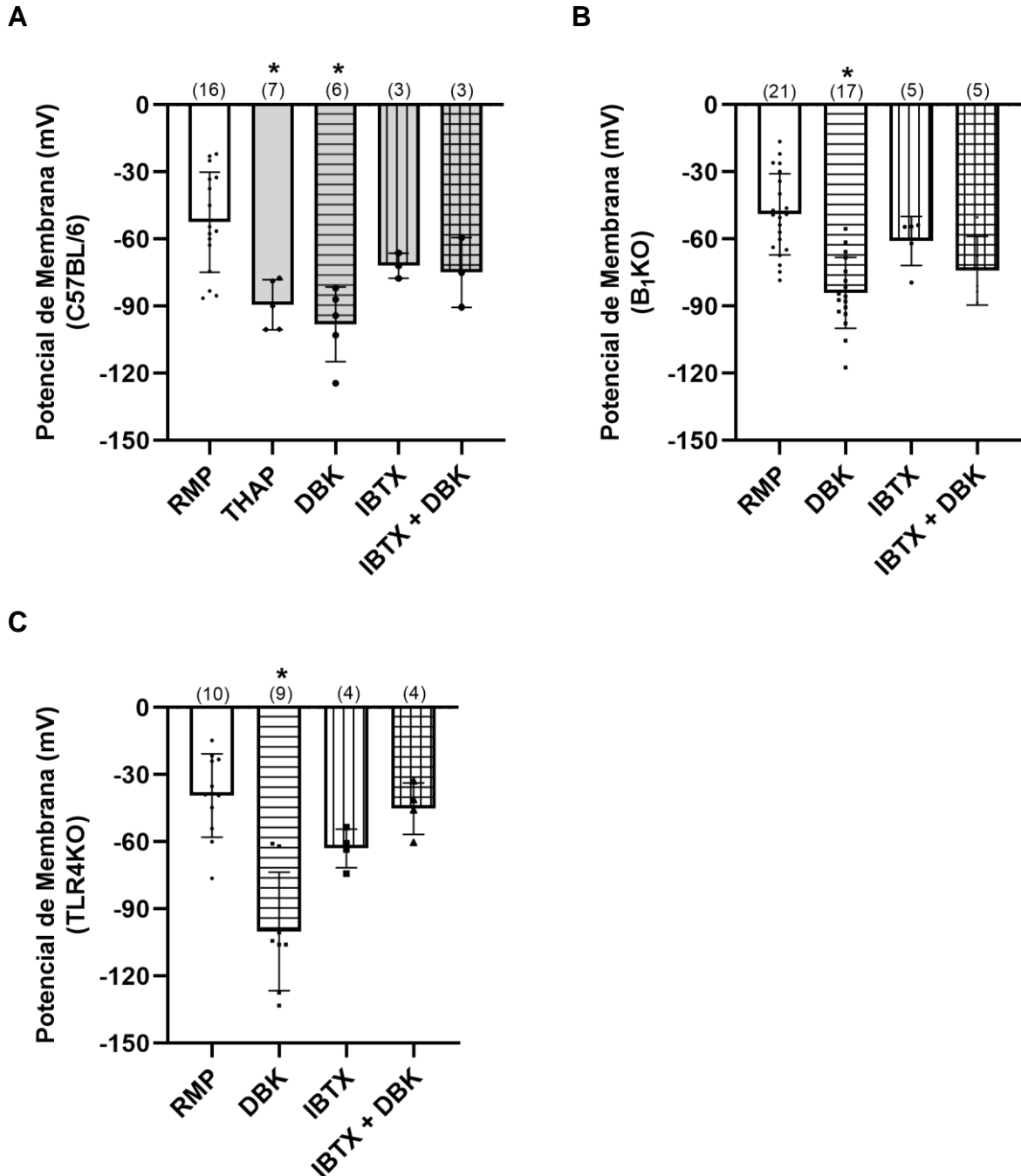
A ausência de atividade de B1R na hiperpolarização observada em C57BL/6 WT foi confirmada ao incubarmos as aortas com R715 e DBK, fato que não gerou variação no potencial de membrana **(Figura 20A)**. A atividade da DBK em camundongos TLR4KO foi inibida após os anéis de aortas serem incubadas com R715, antagonista de B1R **(Figura 20B)**.



**Figura 20: A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos TLR4KO é constitutiva.** **(A)** Não foi observada atividade de B1R nas aortas torácicas de C57BL/6 WT. R715, antagonista de B1R, não altera o potencial de membrana de aortas perfundidas com THAP e DBK. **(B)** A aorta do camundongo TLR4 foi perfundida com DBK e apresentou hiperpolarização direta, mostrando que o receptor está expresso, ativo de modo constitutivo. A resposta foi bloqueada após aorta ser incubada com R715. **(A)** \* $p < 0.05$  versus RMP, THAP, THAP + DBK, THAP + R715 + DBK; **(B)** \* $p < 0.05$  versus RMP, R75 e R715 + DBK (Teste de Tukey).

Como esperado e observado em outras linhagens animais, a incubação da aorta pela IBTX 10 nM (FARIAS et al., 2005), inibidor seletivo de canais de K<sup>+</sup> dependente de Ca<sup>2+</sup>, inibiu a hiperpolarização causada pela thapsigargina em anéis

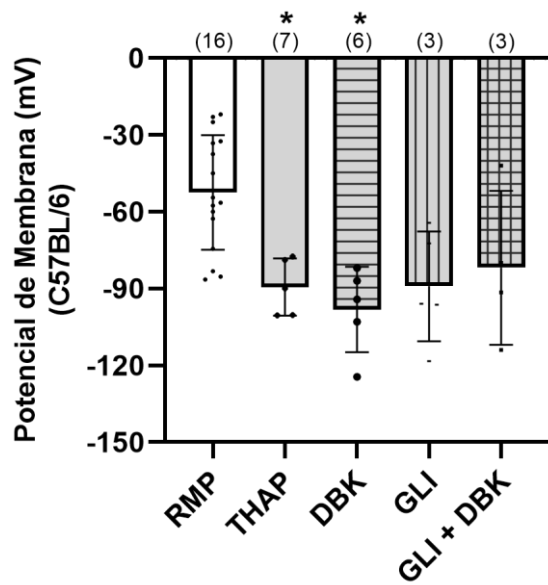
de aorta torácica de C57BL/6 WT, e manteve a ausência de resposta à DBK (**Figura 21A**). Em anéis de aorta de  $B_1$ KO (**Figura 21B**) e TLR4KO (**Figura 21C**), a ação de IBTX também inibiu de modo significativo a hiperpolarização induzida por DBK, apesar da grande variação encontrada entre as amostras.



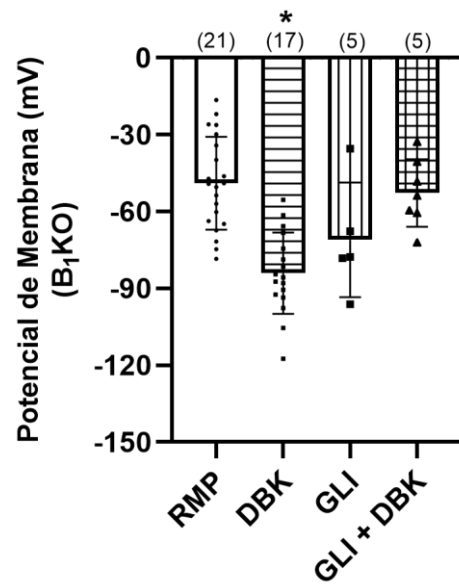
**Figura 21: A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos  $B_1$ KO e TLR4KO é dependente de  $K_{Ca}$ .** (A) A IBTX inibe a resposta celular a THAP e mantém a ausência de resposta à DBK. O bloqueio dos canais de  $K_{Ca}$  inibe a resposta de hiperpolarização da membrana de aorta torácica de camundongos  $B_1$ KO (B) e TLR4KO (C). (A) \* $p < 0.05$  versus RMP, IBTX e IBTX + DBK; (B e C) \* $p < 0.05$  versus RMP, IBTX, IBTX + DBK (Teste de Tukey).

O bloqueio de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, que estão diretamente ligados à via das cininas (AUDET et al, 1997; KATORI et al., 2001; KAMATA et al., 2009), não alterou a resposta induzida pela THAP em aortas de animais C57BL/6 WT (**Figura 22A**), indicando ausência de atividade via receptor  $B_1$  de cininas. Como observado em outros modelos animais (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005), após os anéis de artéria aorta torácica dos animais nocautes serem incubadas com glibenclamida, houve inibição da resposta observada após incubação com DBK (**Figuras 22B e C**).

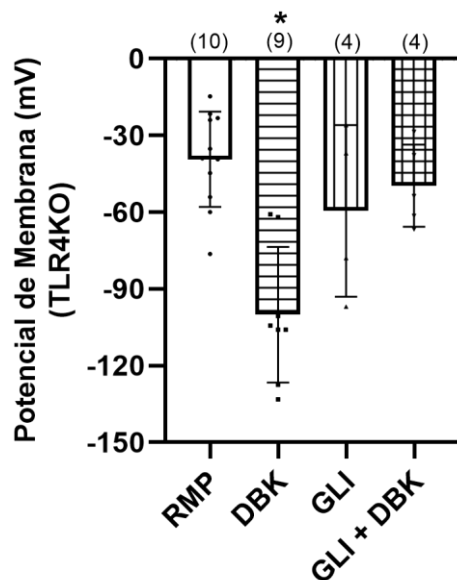
A



B



C

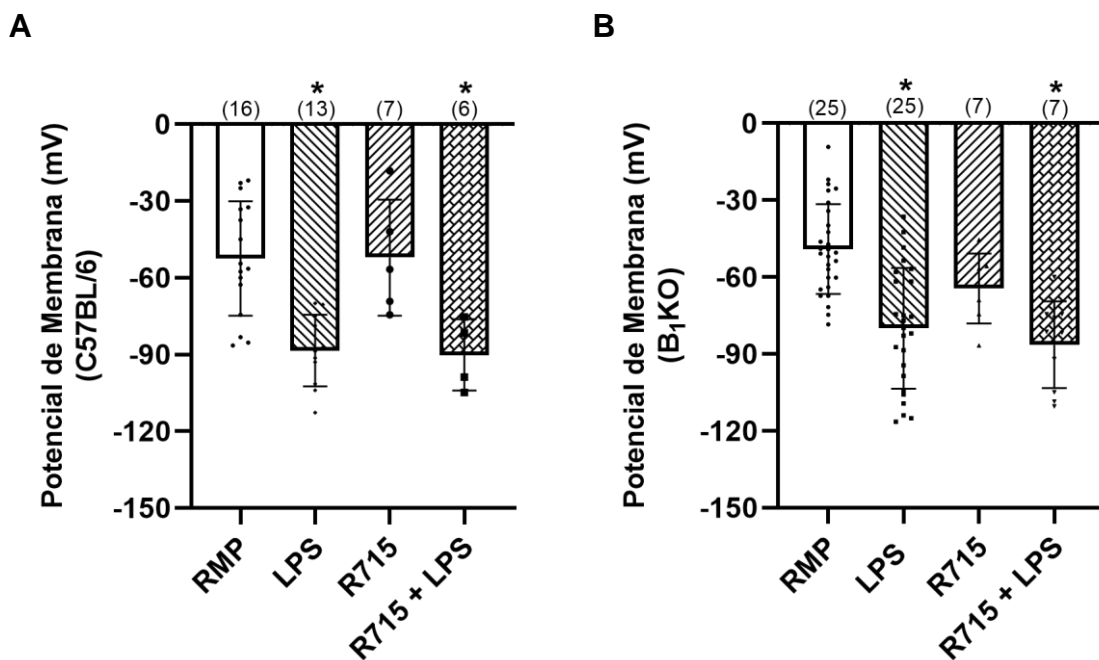


**Figura 22: A atividade da DBK em anéis de aorta torácica de camundongos B<sub>1</sub>KO e TLR4KO é dependente de canais K<sub>ATP</sub>.** (A) O efeito hiperpolarizante da THAP 1  $\mu$ M nas aortas de camundongo C57BL/6 WT não foi revertida após incubação dessas com glibenclamida, e a união de aumento de Ca<sub>2+</sub> intracelular e bloqueio de K<sub>ATP</sub> não estimulou a atividade de B1R. Perfusão com GLI 1  $\mu$ M causou despolarização tanto nas aortas torácicas de B<sub>1</sub>KO (B) quanto de TLR4KO (C). (A) \*p<0.05 versus RMP; (B e C) \*p<0.05 versus RMP e GLI + DBK (Teste de Tukey).

Assim, temos que a DBK tem resposta seletiva via B1R e, na ausência deste, o peptídeo liga-se a B2R; quando há ausência de TLR4, B1R está presente na membrana das células endoteliais, respondendo à interação com DBK sem a necessidade de estímulos, como aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Ademais, a resposta DBK – B1R é inibida quando há bloqueio de canais de K<sup>+</sup>.

2.4 O LPS HIPERPOLARIZA ANÉIS DE AORTA TORÁCICA DE CAMUNDONGO C57BL/6 E B<sub>1</sub>KO, E ESSA NÃO É INIBIDA POR ANTAGONISTA DE B1R

Tanto nas aortas torácicas de C57BL/6 (Figura 23A) quanto nas de B<sub>1</sub>KO (Figura 23B), o LPS promoveu a hiperpolarização da membrana e esta não é inibida por R715, o que é diferente do que ocorre em outros modelos animais já citados neste estudo.



**Figura 23: O LPS causa efeito na polarização de membrana de anéis de artéria aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT e B<sub>1</sub>KO.** A hiperpolarização da aorta do camundongo perfundida com LPS não é revertida após incubação desta com R715,

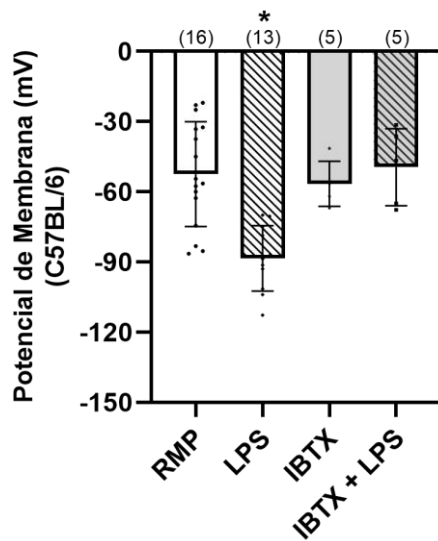


antagonista do receptor  $B_1$  de cininas, tanto no modelo de C57BL/6 WT (**A**) quanto no de  $B_1$ KO (**B**). (**A e B**) \* $p < 0.05$  versus RMP e R715 (Teste de Tukey).

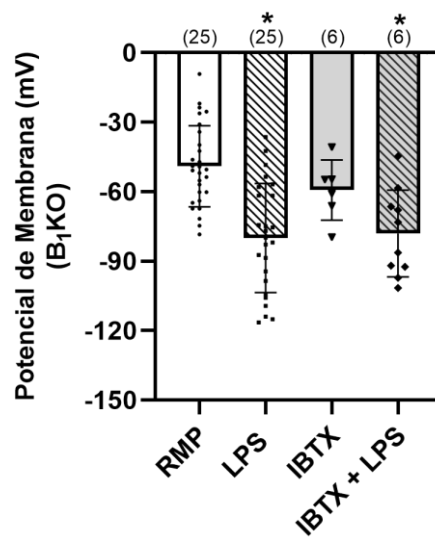
## 2.5 A RESPOSTA LPS/ TLR4 PARECE SER DEPENDENTE DA PRESENÇA DE $B_1$ R

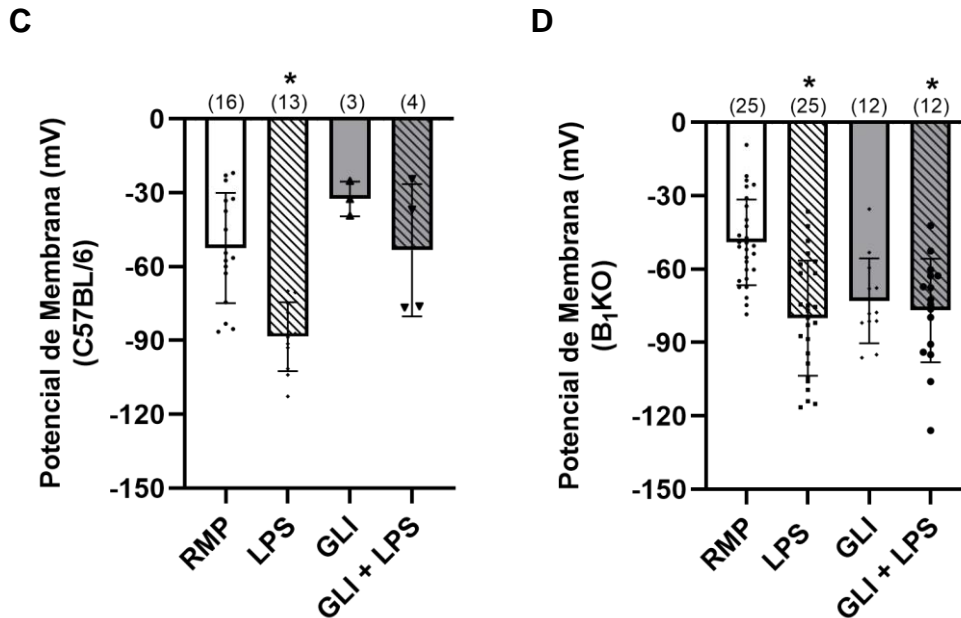
Nos anéis da aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT, a hiperpolarização da membrana após a incubação com LPS se mostrou dependente de canais de K (**Figuras 24A e C**), o que foi diferente nas aortas proveniente de camundongos  $B_1$ KO (**Figuras 24B e D**), nas quais bloquear  $K_{Ca}$  e  $K_{ATP}$  não interferiu na hiperpolarização causada por LPS. Note que nas aortas de  $B_1$ KO a presença de glibenclamida já parece alterar os valores da polarização de repouso, tendendo a uma hiperpolarização (**Figura 24D**).

**A**



**B**





**Figura 24: A retirada de B1R modifica ao LPS.** A aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT deixa de responder ao LPS quando perfundida com IBTX **(A)** e GLI **(C)**, ou seja, quando há bloqueio de canais de  $K^+$ . O mesmo não é observado em aortas torácicas de camundongos B1KO, indicando uma relação de B1R à resposta da membrana ao LPS **(B e D)**. **(A)** \* $p < 0.05$  versus RMP, IBTX e IBTX+LPS; **(B)** \* $p < 0.05$  versus RMP e IBTX; **(C)** \* $p < 0.05$  versus RMP, GLI e GLI+LPS; **(D)** \* $p < 0.05$  versus RMP (Teste de Tukey).

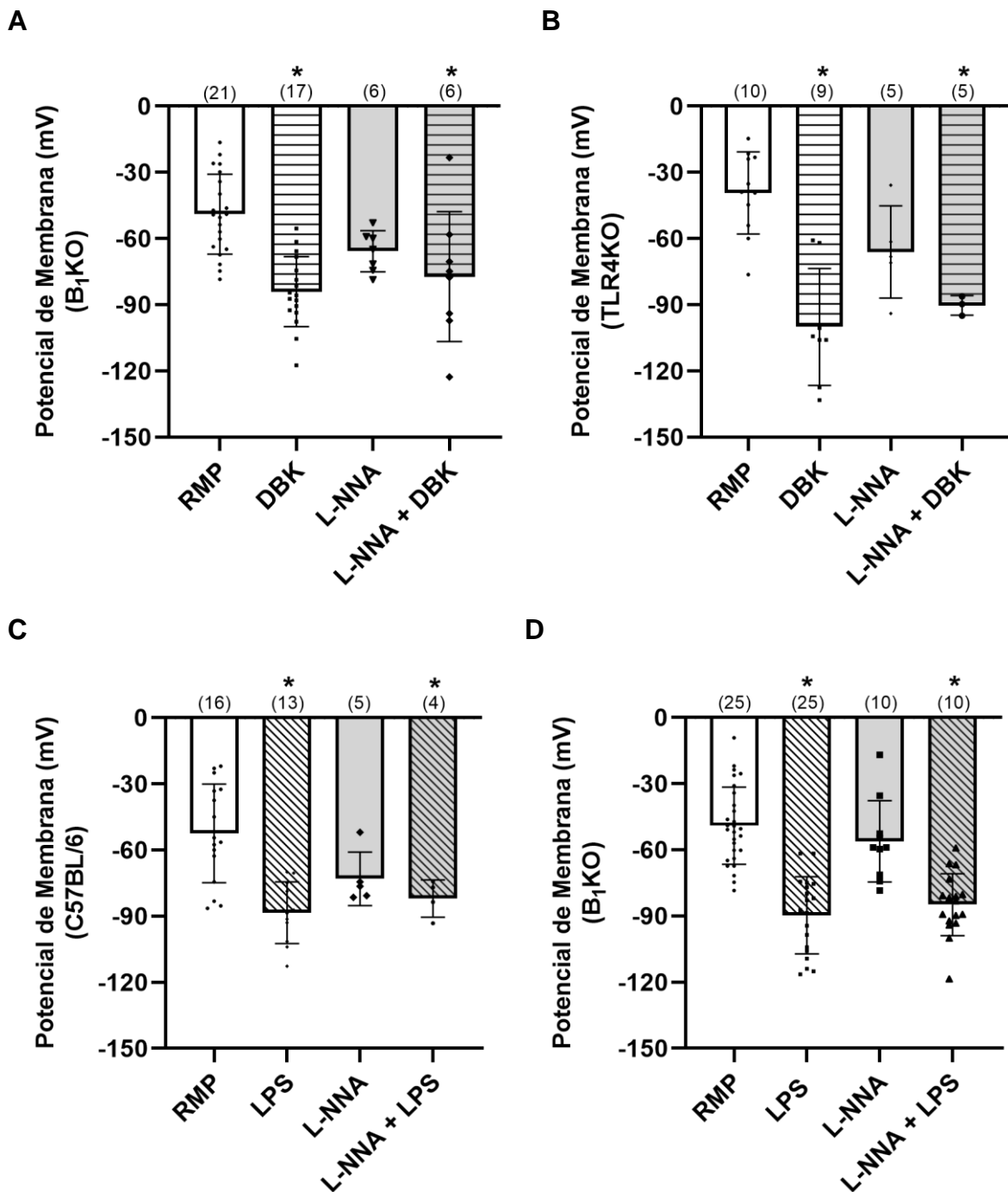
Observamos, portanto, que o LPS interage com TLR4 nas células endoteliais de aorta torácica, desencadeando cascata de sinalização que leva à hiperpolarização dessa. A resposta à interação LPS – TLR4 sofre influência de B1R, visto que sua ausência interfere na resposta do lipopolissacarídeo quando há bloqueio de canais de  $K^+$ .

Como as mudanças na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  está relacionada com a liberação de NO, como resultado da ação de eNOS, na vasodilatação dependente do endotélio na aorta de camundongos (MESQUITA et al., 2017), aortas torácicas foram

## 2.6 A ATIVIDADE DE DBK E LPS NA MEMBRANA DE ANÉIS DE AORTA TORÁCICA É INDEPENDENTE DE NO

Como mudanças na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  regula a ação de eNOS, associada à liberação de NO na vasodilatação dependente do endotélio, observamos se, em nossos modelos há o envolvimento da NOS na via das cininas, através da N-nitro-L-arginina (L-NNA), inibidor competitivo da NOS (FARHY et al., 1993; LINZ et al., 1999; KUHR et al., 2010; LOIOLA et al., 2011; MESQUITA et al.,

2017). Como em todas as situações estudadas até então não indicou a resposta do receptor  $B_1$  de cininas após as aortas de C57BL/6 WT serem incubadas com DBK, não fizemos a incubação dessas com a L-NNA. Nossos dados de eletrofisiologia (**Figuras 25A e B**) indicam que, quando  $B_1R$  é ativado diretamente pela DBK, quando ele já se encontra presente e ativo na membrana das células endoteliais, a inibição da NOS não interfere em sua atividade. O mesmo padrão foi observado em aortas torácicas incubadas com LPS (**Figuras 25C e D**).

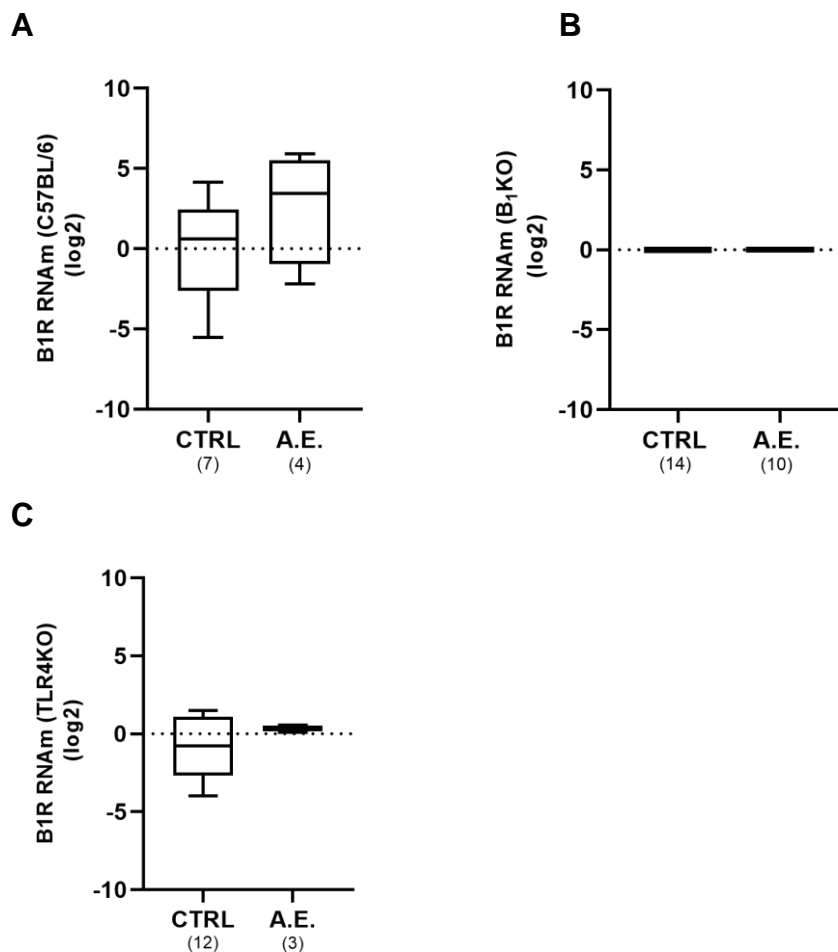


**Figura 25: A atividade da DBK e LPS, em anéis de aorta torácica de camundongos, é independente de NOS.** A inibição de NOS por L-NNA não inibiu a hiperpolarização promovida pela incubação das aortas torácicas tanto por DBK (**A e B**) quanto por LPS (**C e D**). (**A**) \* $p < 0.05$  versus RMP; (**B**) \* $p < 0.05$  versus RMP; (**C**) \* $p < 0.05$  versus RMP; (**D**) \* $p < 0.05$  versus RMP e L-NNA (Teste de Tukey).

Após a observação eletrofisiológica da resposta dos vasos a diferentes fármacos, apontando a presença ou ausência de atividade dos receptores alvos do estudo, nos perguntamos como está a expressão desses receptores antes, em repouso, e após todo o processo de eletrofisiologia. Será que todo o estresse metabólico induziu a expressão de RNAm dos receptores de interesse?

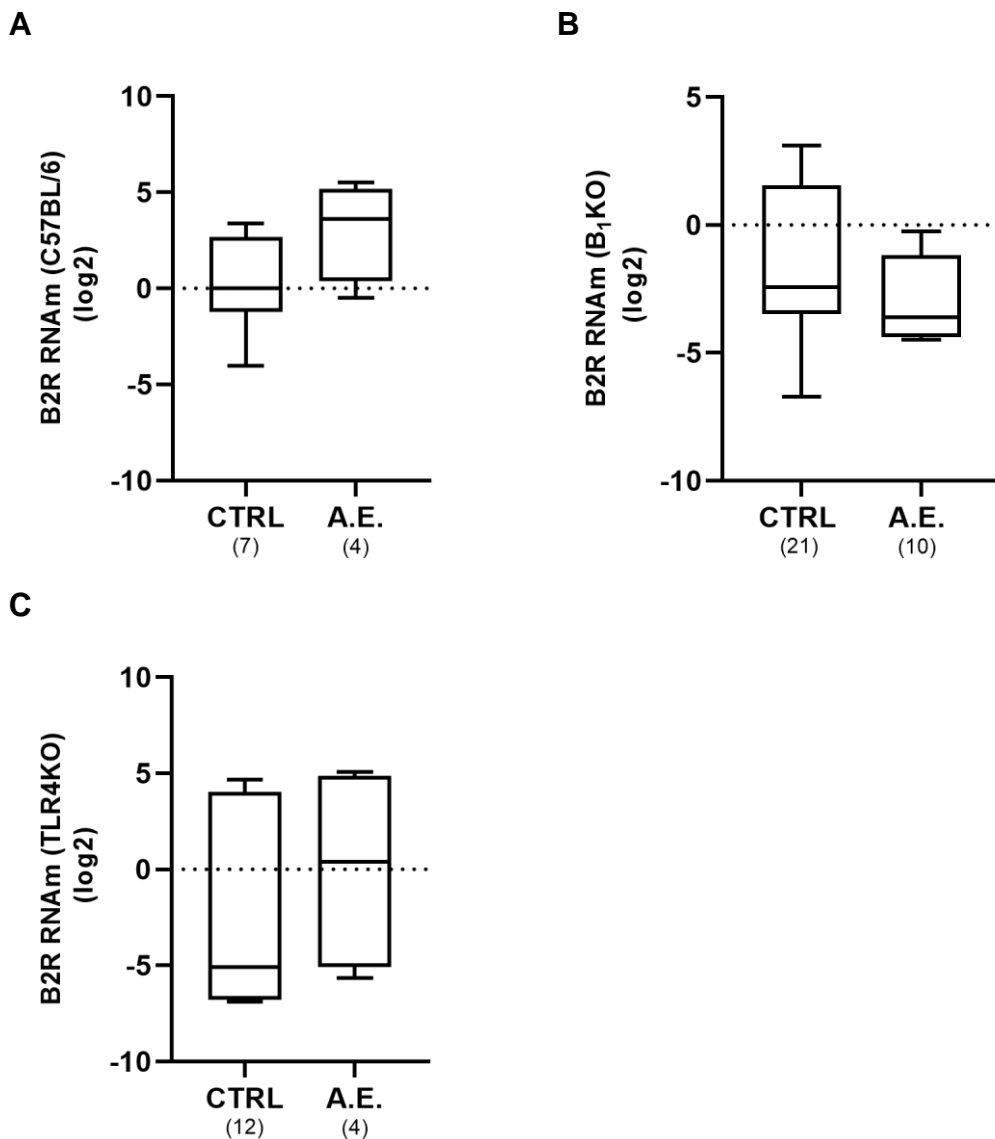
## 2.7 NÃO HÁ AUMENTO NA EXPRESSÃO DO RNAm DE B1R, B2R E TLR4 EM AORTA TORÁCICA DE CAMUNDONGOS APÓS ELETROFISIOLOGIA

A análise da expressão de RNAm de B1R indica que não houve aumento de sua expressão nos anéis de aorta torácica de C57BL/6 WT (**Figura 26A**) e de TLR4KO (**Figura 26C**) após a técnica de eletrofisiologia (A.E.) (**Figura 26B**).

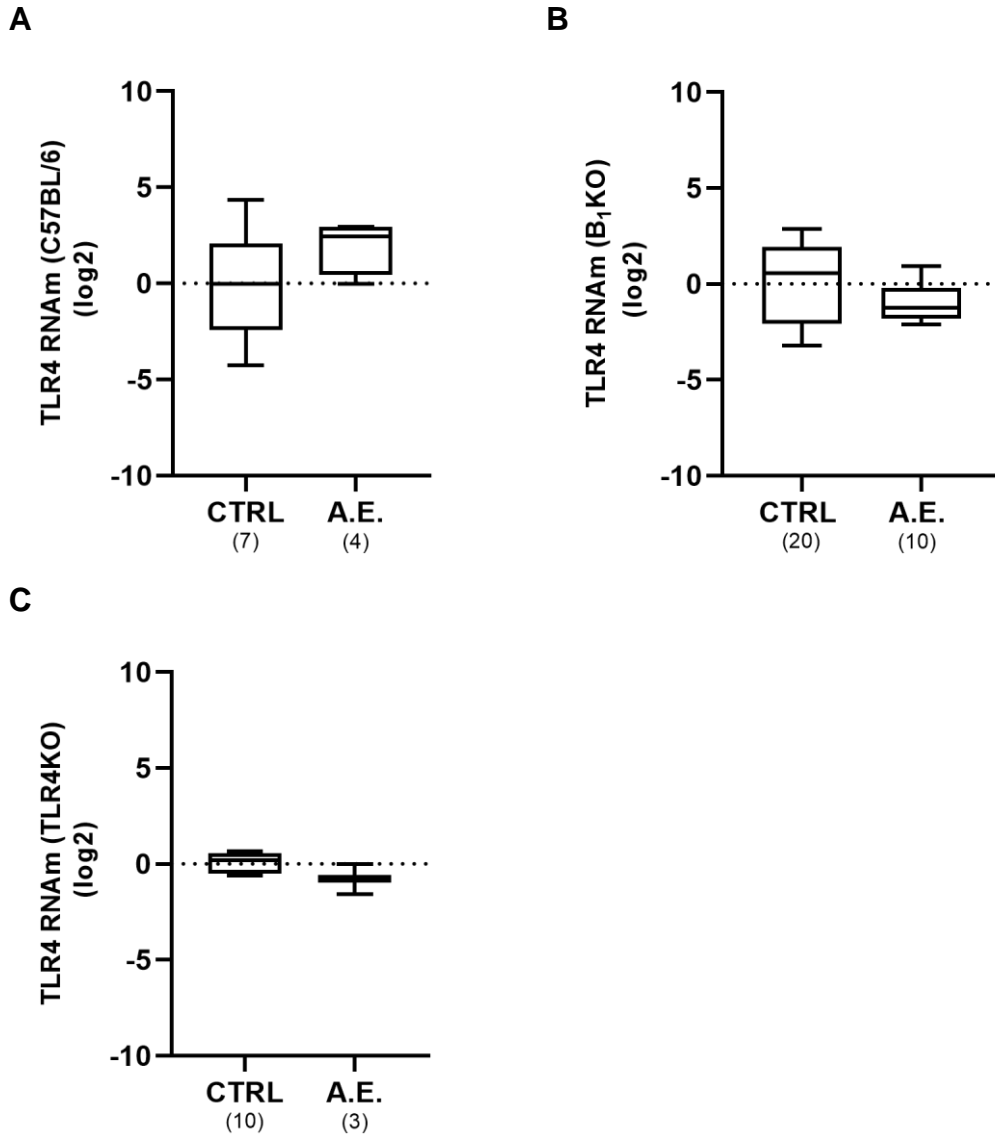


**Figura 26: Não há variação na expressão de RNAm de B1R em anéis de aorta torácica dos modelos animais estudados.** A incubação de anéis de aorta pelos fármacos estudados na eletrofisiologia (A.E.) não alteram o padrão de expressão de RNAm de B1R em anéis de aorta de camundongos C57BL/6 WT **(A)**, B<sub>1</sub>KO **(B)** e TLR4KO **(C)**. Entre parênteses apresentamos o número de amostras analisadas de cada condição. **(A e C** Teste t – Teste de Mann-Whitney; **B** Teste Kruskal-Wallis). Número de experimentos = 5.

Assim como o RNAm de B1R, as análises de RNAm de B2R **(Figura 27)** e de TLR4 **(Figura 28)** indicam que ausência de aumento nos níveis de expressão gênica após a eletrofisiologia nas linhagens de camundongos alvo desse estudo.



**Figura 27: Expressão de RNAm de B2R em anel de aorta torácica.** A incubação de anel de aorta pelos fármacos estudados pela técnica de eletrofisiologia (A.E.) não alteram o padrão de expressão de RNAm de B2R em anel de aorta de camundongos C57BL/6 WT **(A)**, B<sub>1</sub>KO **(B)** e TLR4KO **(C)**. **(A e C** Teste t – Teste de Mann-Whitney; **B** Teste Kruskal-Wallis). Número de experimentos = 5.



**Figura 28: A atividade das células endoteliais durante a eletrofisiologia não induz a expressão RNAm de TLR4 em anéis de aorta torácica.** A incubação de anéis de aorta pelos fármacos estudados pela técnica de eletrofisiologia (A.E.) não alteram o padrão de expressão de RNAm de TLR4 em anéis de aorta de camundongos C57BL/6 WT **(A)** e B<sub>1</sub>KO **(B)**. Como esperado, não foi identificada expressão nas aortas de camundongos TLR4KO **(C)**. **(A e C)** Teste t – Teste de Mann-Whitney; **B** Teste Kruskal-Wallis). Número de experimentos = 5.

Os dados de expressão gênica sugerem que não há tradução dos receptores para a membrana, que o que tem presente em situação fisiológica já é o suficiente para a resposta celular ou que o mecanismo de tradução e transcrição ocorre rapidamente, logo após as aortas serem incubadas com os fármacos.

## 2.8 EXPOSIÇÃO À DBK E AO LPS INDUZ O AUMENTO DE MARCAÇÃO PARA B1R NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DOS ANÉIS DE AORTA TORÁCICA

Foi feita a análise qualitativa da presença de marcação de B1R e TLR4 em aortas controle, incubadas em meio DMEM/F-12 com soro, e tratadas com DBK e LPS. Observamos alteração no padrão de expressão de TLR4 em todas as camadas celulares que compõe a aorta quando comparamos controles (**Figuras 29A e B**) com as tratadas (**Figuras 29C e D**), sendo que esta parece diminuir após o tratamento, com destaque para a célula endotelial (seta branca nas imagens) (**Figuras 29B e D**). Já a marcação para B1R parece aumentar na camada endotelial das aortas expostas a DBK e a LPS e diminuir nas outras camadas que compõe a aorta (**Figuras 29G e H**) em relação à aorta controle experimental (**Figuras 29E e F**). A reconstrução 3D (**Figuras 29Q e R**) da camada endotelial da aorta deixa evidente a mudança no padrão de marcação de B1R e TLR4 após exposição alternada à DBK e ao LPS, com o aumento de B1R e diminuição de TLR4.

As imagens representativas dos controles negativos do anticorpo para TLR4 (**Figura 29S**), B1R (**Figura 29T**) e marcação nuclear com DAPI (**Figura 29U**) em aortas torácicas estão em destaque, circundados pelo retângulo vermelho.

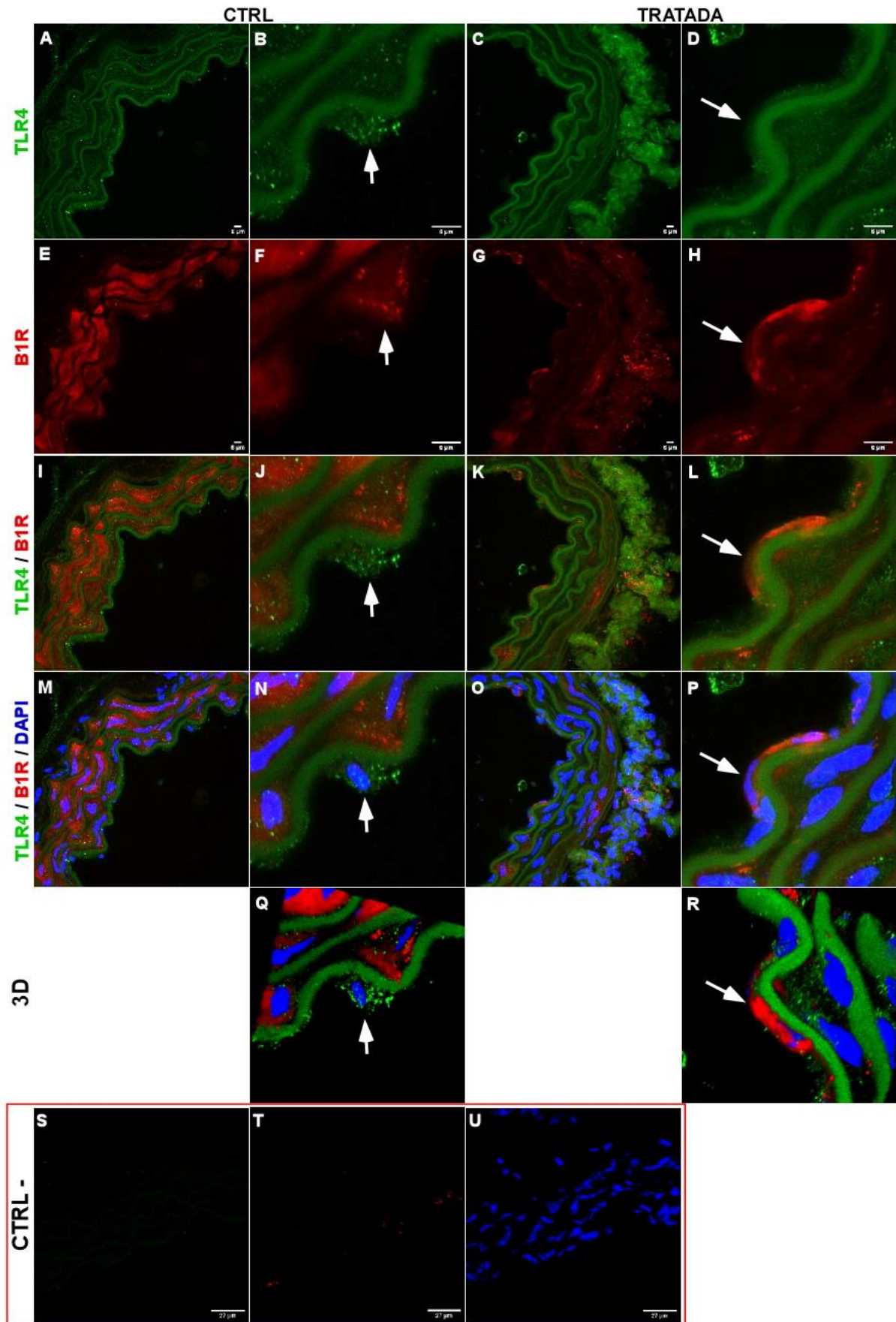


Figura 29: Marcação de B1R e TLR4 em anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6. Análise qualitativa das culturas indica a marcação de TLR4 por todas as camadas celulares que compõem a aorta (A e B), mas esta diminui após o tratamento desta com DBK



e LPS, principalmente na camada de células endoteliais **(C e D)**. Em secções de aortas não expostas a DBK e LPS podemos observar uma fraquíssima marcação para B1R no endotélio **(E e F)**, tornando-se mais intensa na camada endotelial após exposição das aortas à DBK e ao LPS **(G e H)**. **(I-L)** Fusão das imagens de TLR4 e B1R. **(M-P)** Fusão das imagens de TLR4, B1R e DAPI. **(A, C, E, G, I, K, M, O)** Barra de escala de 6 µm. **(B, D, F, H, J, L, N, P)** Barra de escala de 6 µm. **(Q)** Reconstrução 3D da imagem apresentada em **(N)**. **(R)** Reconstrução 3D da imagem apresentada em **(P)**. **(S-U)** Controle negativo da reação imunohistoquímica em aorta torácica para os anticorpos TLR4 **(S)** e B1R **(T)**, além da marcação nuclear com DAPI **(U)** Barra de escala de 27 µm. Microscopia confocal. Número de experimentos = 7.

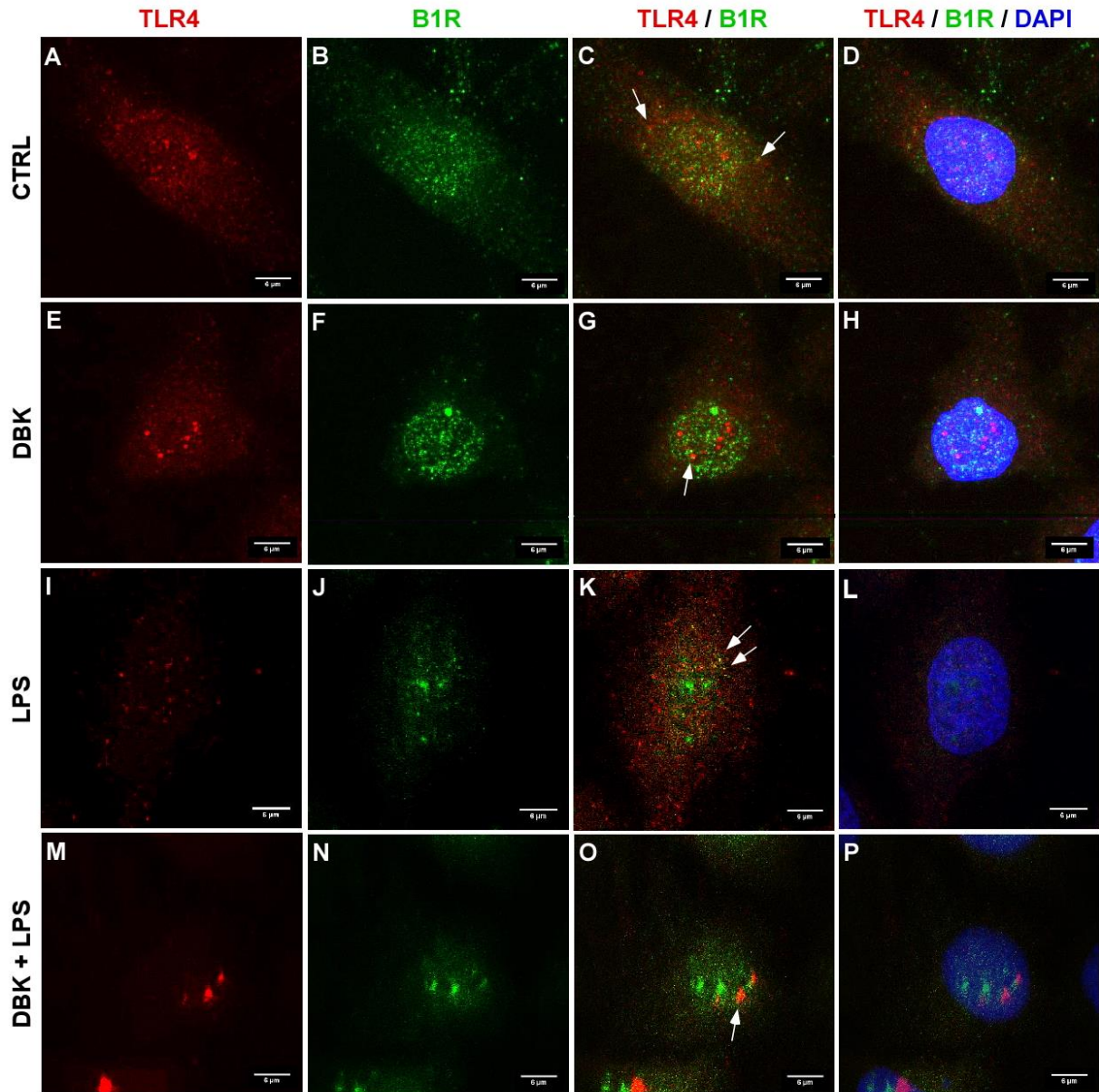
## 2.9 ALTERAÇÃO NO PADRÃO DE MARCAÇÃO DE B1R E TLR4 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS À DBK E AO LPS

Para padronização de marcação dos receptores B1R e TLR4 em células endoteliais, realizou-se a análise qualitativa de imagens células HBMEC, tratadas com DBK e/ou LPS, capturadas em microscopia confocal.

As análises indicaram que a marcação de TLR4 é difusa ao longo de toda a célula **(Figuras 30A, E, I e M)**, condizendo com o tipo de marcação encontrada na literatura em diversos tipos celulares (TANG et al., 2011; MORETTI et al., 2018; GENG et al., 2021).

Já a marcação para o receptor B<sub>1</sub> de cininas apresenta-se difusa nas condições controle, incubadas em meio DMEM/F-12 com soro, e na tratada com LPS **(Figuras 30B e J)** e concentrada na região perinuclear quando as células são incubadas com DBK **(Figura 30F e N)**. Encontramos uma marcação para B1R condizente com dados presentes na literatura (KAWAGUCHI et al., 2015; SRIRAMULA et al., 2023).

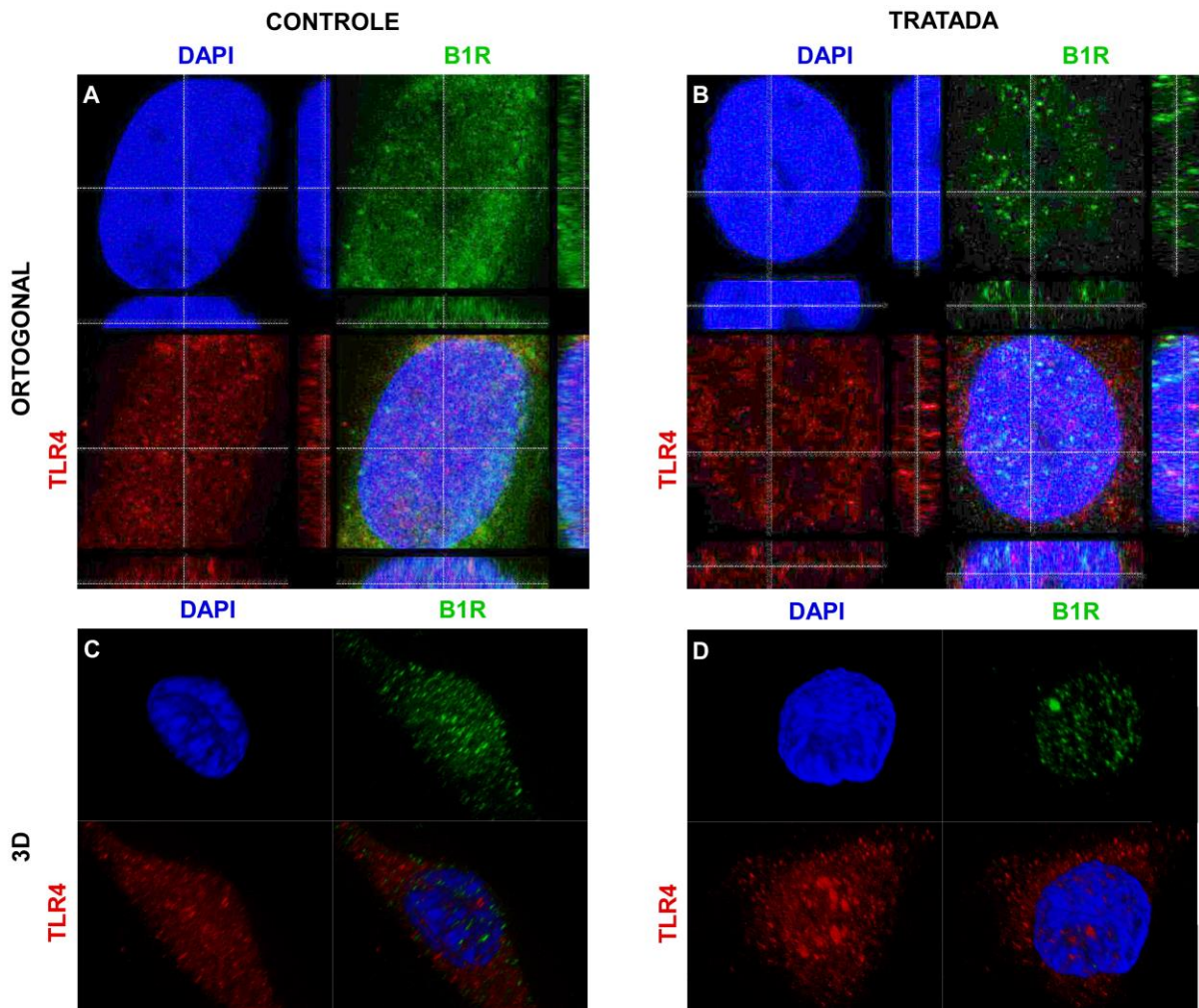
As imagens apontam alguns poucos pontos de dupla marcação **(setas brancas nas Figuras 30C, G, K e O)**, ficando mais claro que há uma proximidade espacial entre B1R e TLR4.



**Figura 30: Padrão de marcação de B1R e TLR4 em HBMEC.** Análise qualitativa das culturas indica que a marcação de TLR4 é difusa ao longo de toda a célula na situação controle e quando tratadas com LPS (**A e I**) e concentrada na região perinuclear quando expostas ao DBK (**E e M**). A marcação para B1R apresenta-se difusa na situação controle e quando tratadas com LPS (**B, J e N**) e concentrada na região perinuclear quando incubada com DBK (**F**). As imagens apontam alguns pontos de dupla marcação (**setas brancas em C, G, K e O**), ficando mais claro que há uma proximidade espacial entre B1R e TLR4. (**D, H, L e P**) Fusão das imagens de B1R, TLR4 e DAPI. Microscopia confocal, barra de escala de 6 µm Número de experimentos = 6 para cada situação.

Visto que as imagens indicam uma presença maior de marcação próxima à região nuclear, imagens de corte ortogonais foram feitas objetivando confirmar a posição da marcação (**Figuras 31A e B**). Tanto em situação controle, quando após tratamento das células, por 24h, seja com DBK 1 µM, com LPS 10 µg/ml, foi

encontrada marcação na região nuclear, o que ficará mais claro na reconstrução 3D das imagens (**Figuras 31C e D**).

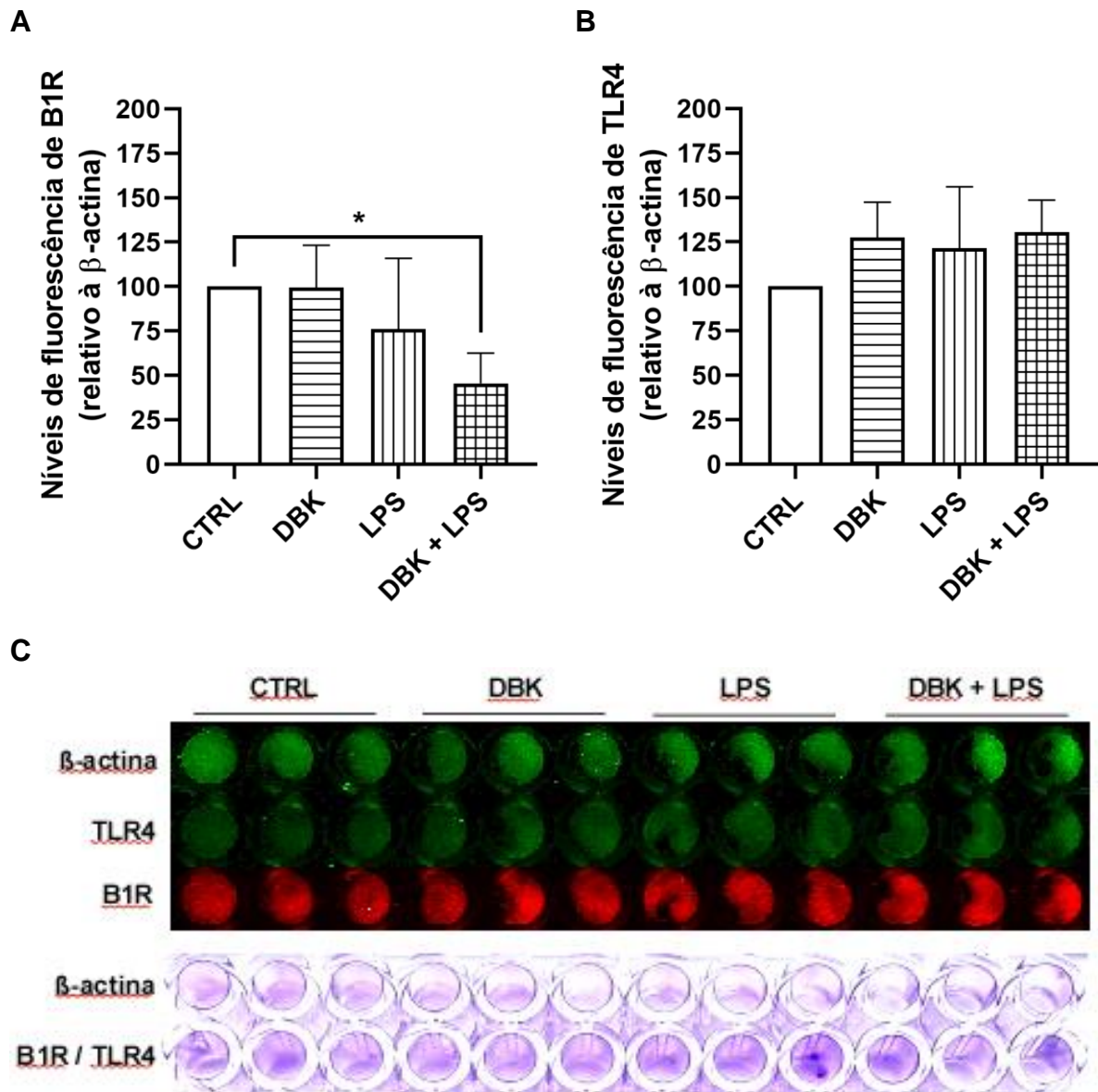


**Figura 31: Corte ortogonal e reconstrução 3D de HBMEC marcada para B1R e TLR4.** Análises qualitativas de cortes ortogonais e reconstrução 3D de células HBMEC controle ou incubadas com DBK e/ou LPS, por 24h, indicam que a marcação de TLR4 e B1R em região perinuclear não está somente na membrana, mas também pode ser encontrada dentro do núcleo. Microscopia confocal. Número de experimentos = 6.

A análise semi-quantitativa das marcações de B1R e TLR4 em células HBMEC foi feita por *In-Cell Western* (**Figura 32**). A marcação para B1R diminuiu expressivamente quando há a exposição das células HBMEC à DBK e LPS simultaneamente (**Figura 32A**). Não houve variação dos níveis de proteína TLR4 nas condições de tratamento em relação ao controle (DEMEM/F-12) (**Figura 32B**).

Após o *In-Cell Western*, as placas foram expostas à coloração por cristal violeta para observarmos a densidade de célula em cada poço (**Figura 32C**).

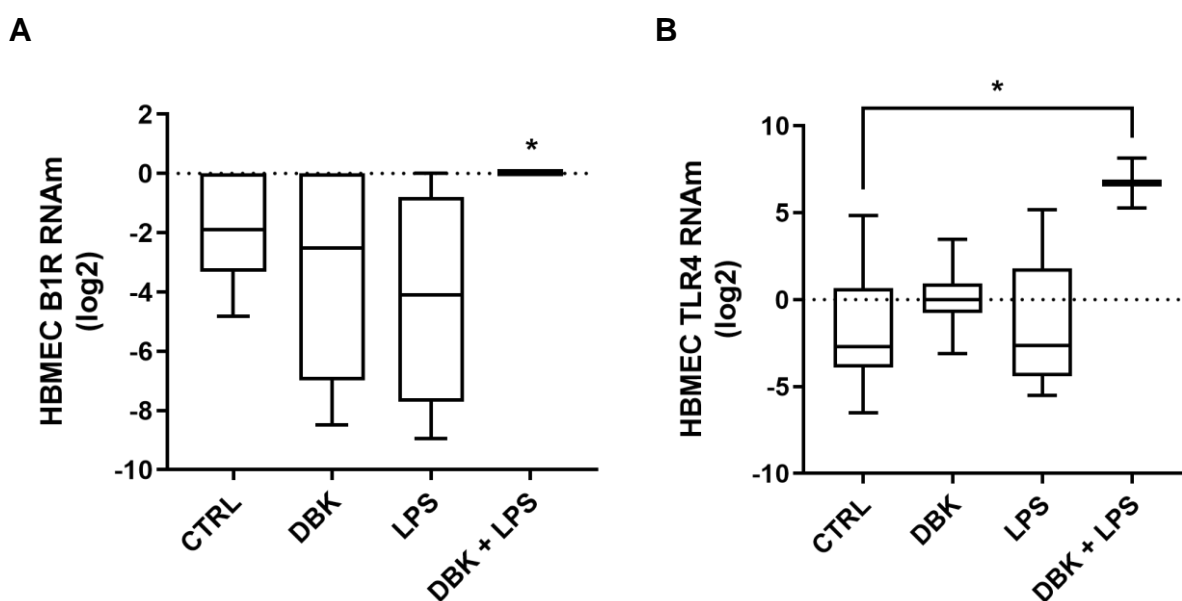
Importante destacar que a marcação para a  $\beta$ -actina, controle da reação foi feita em poços de todas as condições experimentais, sozinho ou na presença de B1R ou TLR4, para um melhor controle da técnica.



**Figura 32: Quantificação relativa da marcação de B1R e TLR4 em HBMEC. (A)** A presença de B1R diminui expressivamente quando há a exposição das células HBMEC à DBK e LPS simultaneamente. **(B)** As análises indicam que não houve variação na presença de proteína TLR4 nas condições de tratamento em relação ao controle. **(C)** Imagem representativa de imagem de *In-Cell Western* para marcação de B1R, TLR4 e  $\beta$ -actina; a densidade celular de cada poço foi indicada com a marcação dessas com cristal violeta. **(A)** \* $p < 0.05$  CTRL versus + DBK + LPS. Teste de Kruskal-Wallis. Número de experimentos = 7.

## 2.10 NÃO HÁ AUMENTO NA EXPRESSÃO DO RNAm DE B1R, B2R E TLR4 EM CÉLULAS HBMEC APÓS EXPOSIÇÃO À DBK E AO LPS

Assim como observado nas aortas torácicas de camundongos C57BL/6 WT, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO, a exposição das células HBMEC à DBK a 1  $\mu$ M, pelo período de 24h, não estimula a expressão gênica tanto de B1R quanto de TLR4, ocorrendo o mesmo quando incubadas com LPS a 10  $\mu$ g/ml (**Figura 33**). Quando as células HBMEC foram tratadas simultaneamente com DBK e LPS, houve a diminuição significativa da expressão do RNAm de B1R (**Figura 33A**) e aumento dos níveis de RNAm de TLR4, em relação à condição controle, incubadas em meio DMEM/F-12 com soro (**Figura 33B**).

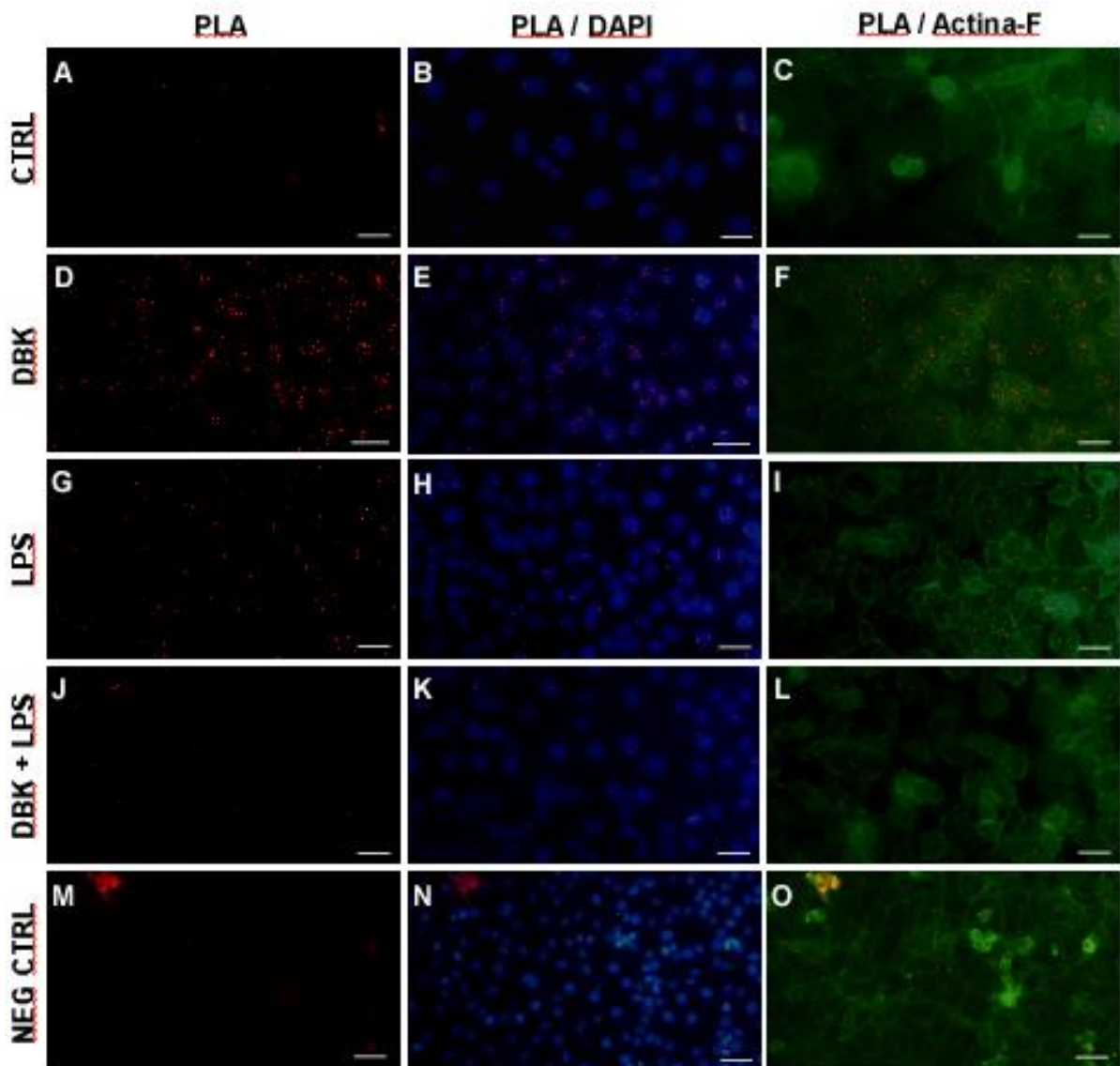


**Figura 33: Análise da expressão gênica de B1R e TLR4 em células endoteliais, na presença e ausência de DBK e LPS.** O tratamento das células HBMEC tratadas com DBK 1  $\mu$ M, pelo período de 24h, não estimula a expressão gênica tanto de B1R (**A**) quanto de TLR4 (**B**), ocorrendo o mesmo nas células incubadas com LPS. Quando as células HBMEC foram tratadas por 24h com DBK + LPS, houve a diminuição significativa da expressão do RNAm de B1R (**A**) e aumento dos níveis de RNAm de TLR4, em relação à condição controle (**B**). (**A**) \* $p < 0.05$  CTRL + DBK + LPS versus CTRL + DBK e CTRL + LPS. (**B**) \* $p < 0.05$  CTRL versus CTRL + DBK + LPS. Teste de Kruskal-Wallis. Número de experimentos = 7 (CTRL + DBK + LPS n = 3).

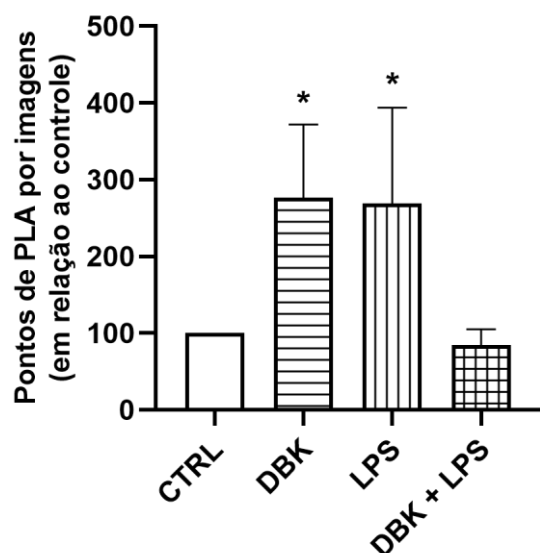
## 2.11 DBK AUMENTA A PROXIMIDADE DE LIGAÇÃO ENTRE B1R E TLR4

O ensaio de ligação por proximidade (PLA) em células endoteliais, da linhagem HBMEC, mostra a presença dos pontos de proximidade entre os receptores, ou seja, estão a uma distância menor que 40 nm (400 Å) (**Figura 34**).

Quando as células foram expostas à DBK houve o aumento desses pontos (Figuras 34D-F). Células incubadas com LPS 10 µg/ml, por 24h, indicaram mais pontos que a situação controle (somente DMEM/F-12) (Figuras 34G-I), mas este não foi significativo. Quando administramos simultaneamente DBK e LPS esses pontos diminuem, retornando aos níveis da situação controle, e até mesmo abaixo desse (Figuras 34J-L). A imagem desses pontos com colocalização da marcação de núcleos deixa clara a intensa presença desses pontos região marcada com DAPI nas células tratadas com DBK (Figura 34E). A quantificação dos pontos de ligação PLA mostra um aumento desses em HBMECs incubadas com DBK, em relação às outras situações experimentais (Figura 34M).



M



**Figura 34: B1R e TLR4 apresentam-se com mais pontos de proximidade quando células endoteliais foram incubadas com DBK.** No ensaio de para observar a proximidade (PLA) entre os receptores B1R e TLR4 em culturas de células HBMEC, observamos os pontos de ligação na situação controle, quando as células foram cultivadas em meio de DMEM/F-12 (A-C), e quando expostas por 24h aos agonistas DBK a 1 $\mu$ M (D-F), LPS 10  $\mu$ g/ml (G-I) e simultaneamente DBK e LPS (J-K). A imagem desses pontos com colocação da marcação de núcleos deixa clara a intensa presença desses pontos região marcada com DAPI nas células incubadas com DBK (E). (M) Na quantificação dos pontos de ligação, observamos um aumento dos pontos de ligação nas culturas expostas à DBK em relação às outras condições experimentais. \* $p < 0.05$  versus CTRL e DBK+LPS. ANOVA (Teste de Tukey). Microscopia óptica de fluorescência, barra de escala de 250  $\mu$ m. Número de experimentos = 5.

Juntos, os resultados apresentados até aqui reforçam a relação entre o receptor B<sub>1</sub> de cininas e o receptor TLR4. Até aqui observamos que a relação entre LPS e B1R é pela via de sinalização e não por ligação do lipopolissacarídeo; observamos que TLR4 e B1R se encontram em proximidade na membrana celular de células endoteliais, concentrando essas na região perinuclear quando as células são incubadas com DBK, situações em que há aumento na ligação por proximidades dessas, o que indica uma possível interação física desses receptores. Também observamos alguns sinais de dupla marcação. Observamos que quando as células são incubadas com DBK e LPS ao mesmo tempo há uma diminuição na expressão de RNAm de B1R e de marcação por imunohistoquímica deste, além do aumento de RNAm de TLR4.

Com isso vamos, na segunda parte deste trabalho, onde observamos se a administração de DBK a 1  $\mu$ M estimula a ativação de B1R e TLR4, desencadeando

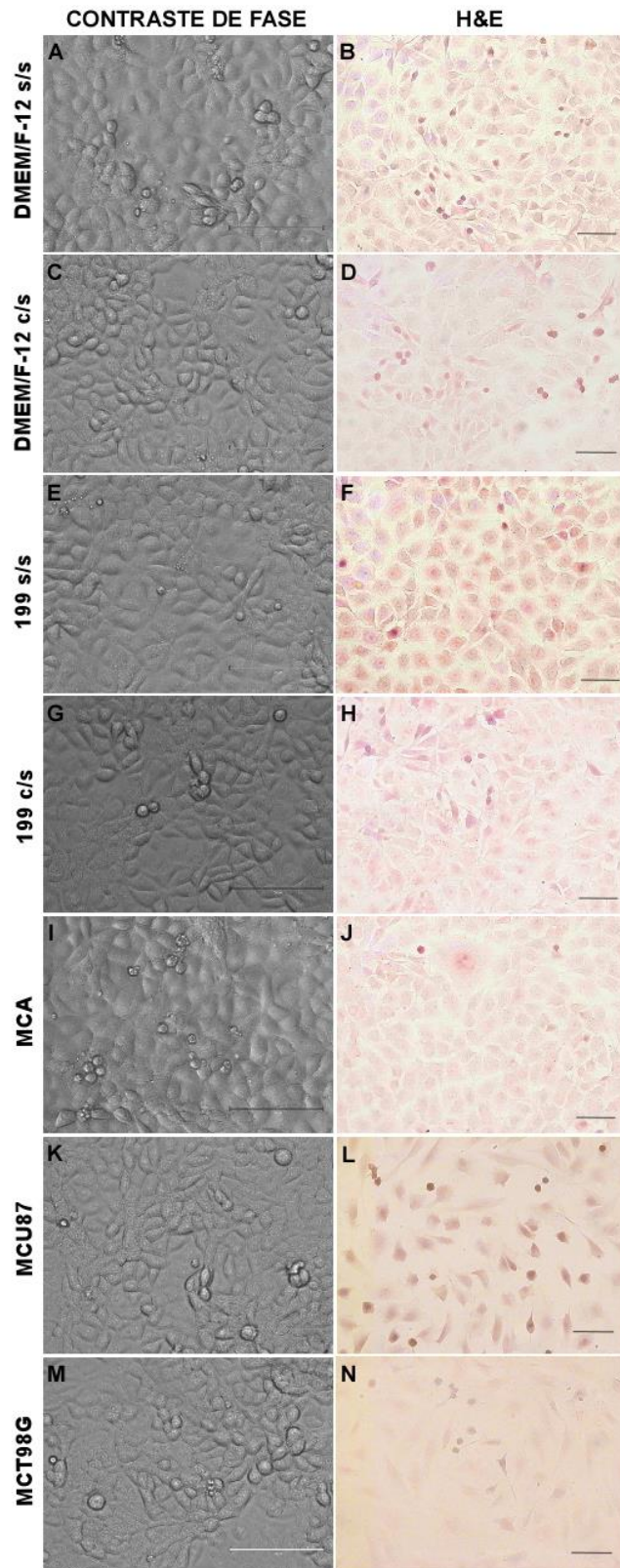
na abertura transitória da barreira com riscos menores do que os causados pela administração de LPS (CHAO et al., 2017).

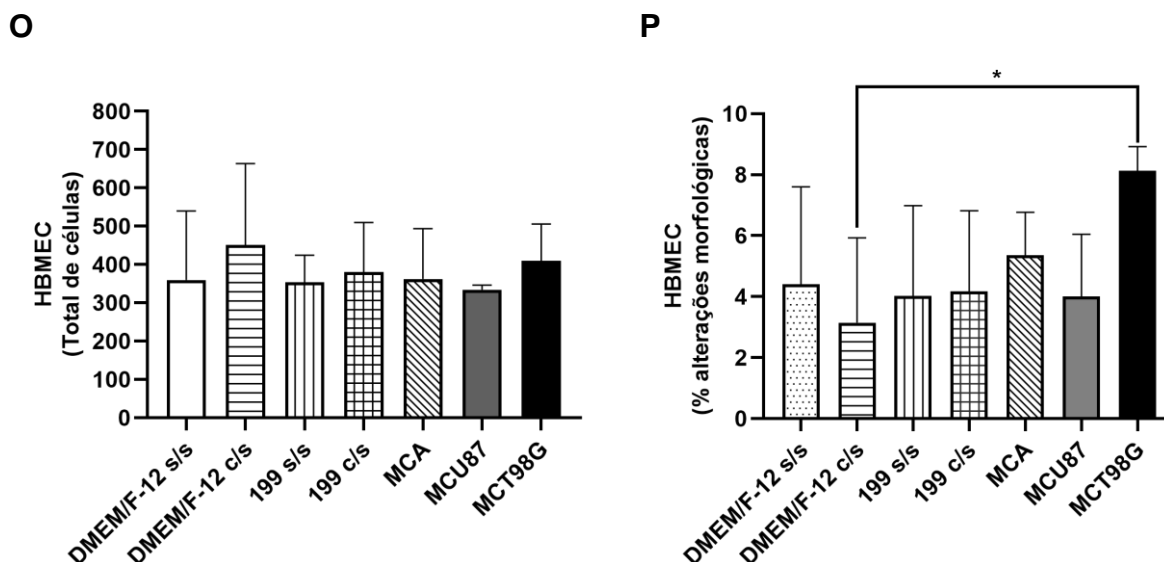
### **3 PARTE 2: MODULAÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA PELA DBK**

#### **3.1 EFEITO DOS MEIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**

A primeira análise foi observar como as células endoteliais se comportam em ambiente tumoral de glioblastoma. As análises das imagens em contraste de fase e de coloração H&E (**Figura 35A-N**) indicam que não houve diminuição no número de células totais de HBMEC (**Figura 35O**). Porém, as culturas tratadas por 24h, com MCT98G apresentaram um aumento de células com diferença na morfologia espalhada, quando em monocamada (**Figura 35P**), sendo essas significativamente diferentes quando comparadas às células expostas ao meio DMEM/F-12 c/s.





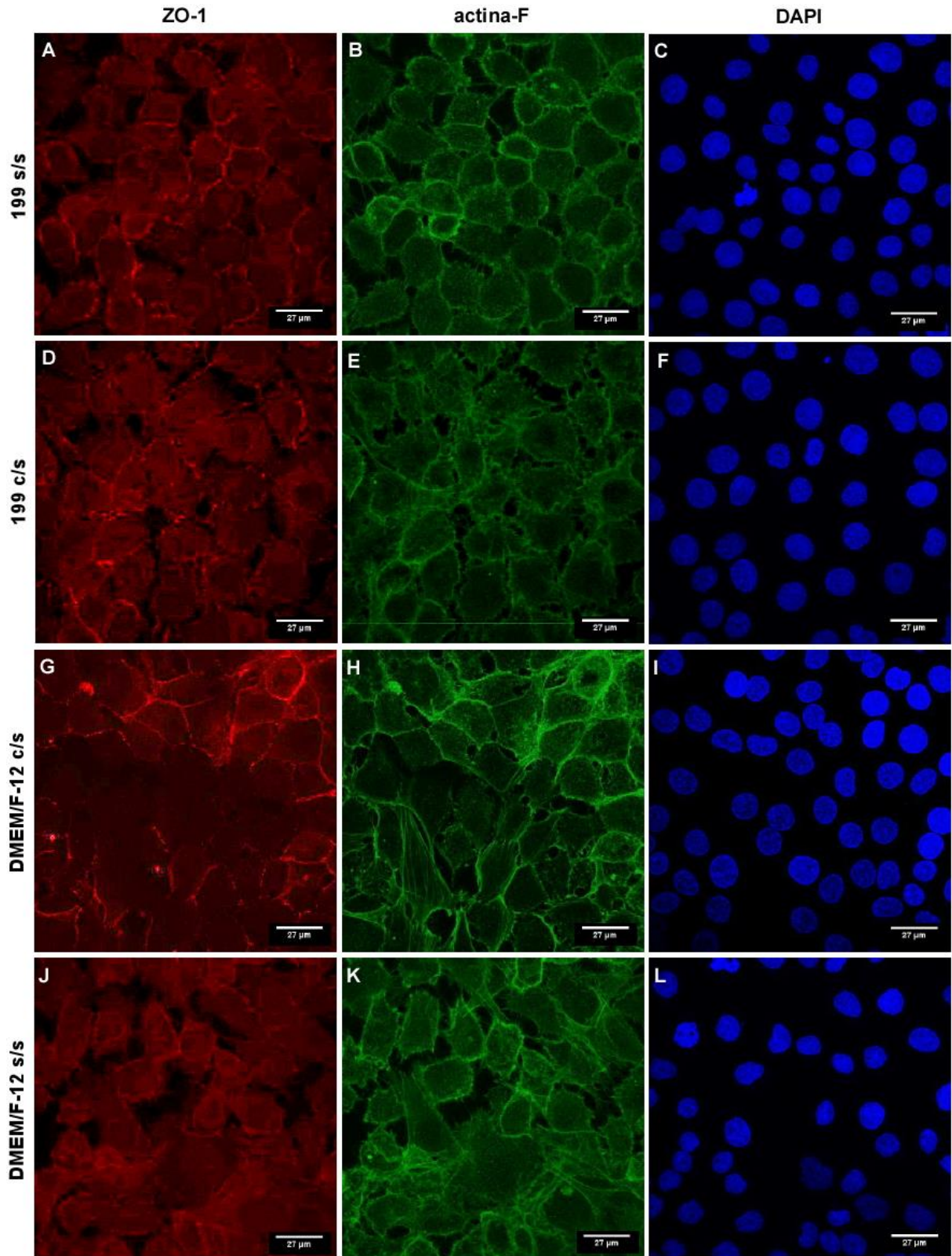


**Figura 35: Efeito dos meios condicionados de U87MG e T98G em células endoteliais. (A-N)** Imagens de campo claro e coloração H&E das células HBMEC incubadas, por 24h, com meios condicionados de linhagens de glioblastoma (MCU87 e MCT98G) e ambientes controle. As imagens foram utilizadas para contagem total das células e para observar aquelas que não apresentavam morfologia espreada. **(O)** Nenhuma condição testada promoveu alteração no número total de células. **(P)** Após 24h de exposição, as culturas expostas ao MCT98G apresentaram um aumento da alteração morfológica das células HBMEC, com variação significativamente estatística em relação às células expostas ao meio DMEM/F-12 com soro (DMEM/F-12 c/s) e ao meio condicionado de U87. MCU87 DMEM/F-12 s/s – meio DMEM/F-12 sem soro; 199 s/s – meio 199 sem soro; 199 c/s – meio 199 com soro; MCA – meio condicionado de astrócitos. Barra de escala das imagens de contraste de fase: 100  $\mu$ m. Barra de escala das imagens de H&E: 50  $\mu$ m. **(P)** \* $p < 0.05$  versus DMEM/F-12 c/s. ANOVA (Teste de Holm-Sidak). Microscopia óptica de luz. Número de experimentos = 5.

Em seguida, as culturas de HBMEC expostas aos diferentes meios foram fixadas e marcadas para ZO-1 (**Figura 36A, D, G, J, M, P, S**) e actina-F (**Figura 36B, E, H, K, N, Q, T**).

Considerando o meio 199 com soro o controle experimental, a análise da intensidade de marcação para ZO-1 (**Figura 36B e V**) indica que só houve variação de intensidade de fluorescência entre as células mantidas por 24h em meio DMEM/F12 sem soro (F12 s/s) (**Figura 36A e V**). Quando comparamos a intensidade de marcação de MCT98G e MCU87 com DMEM/F-12 c/s, meio em que as células de glioblastoma são mantidas para obtenção dos meios condicionados, observamos um aumento de marcação nas células HBMEC tratadas com MCT98G (**Figura 36G e W**), o que pode indicar um aumento de ZO-1 na estrutura de barreira ou que houve aumento da proteína para tentar reestabelecer uma barreira desorganizada.

A marcação nuclear com DAPI reforça o dado de que não houve variação nos números de células entre os diferentes meios (**Figura 36C, F, I, L, O, R e U**).



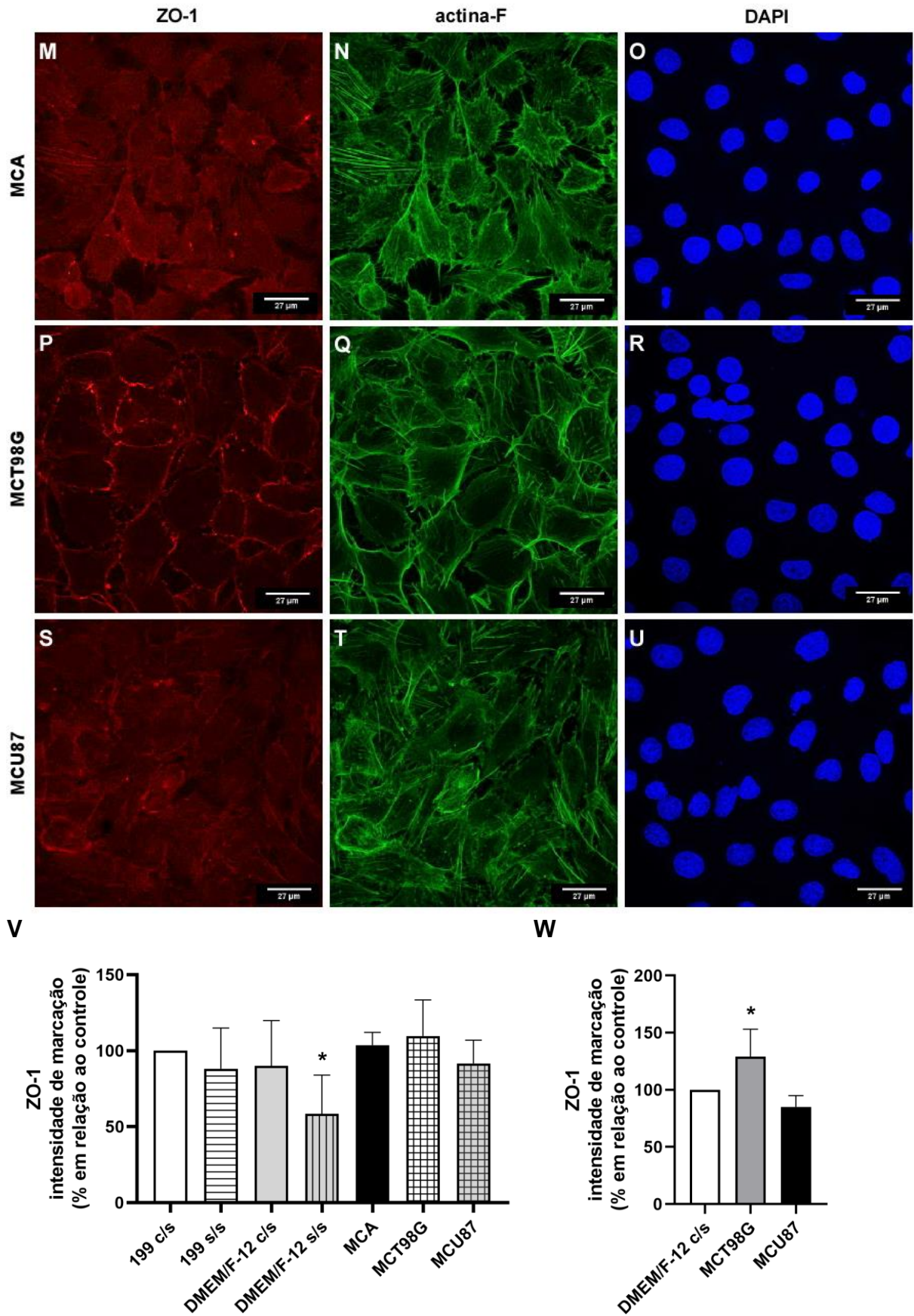


Figura 36: Marcação para proteína ZO-1 em HBMEC expostas aos meios condicionados de linhagens de glioblastoma. (A, D, G, J, M, P, S) Marcação para ZO-1,

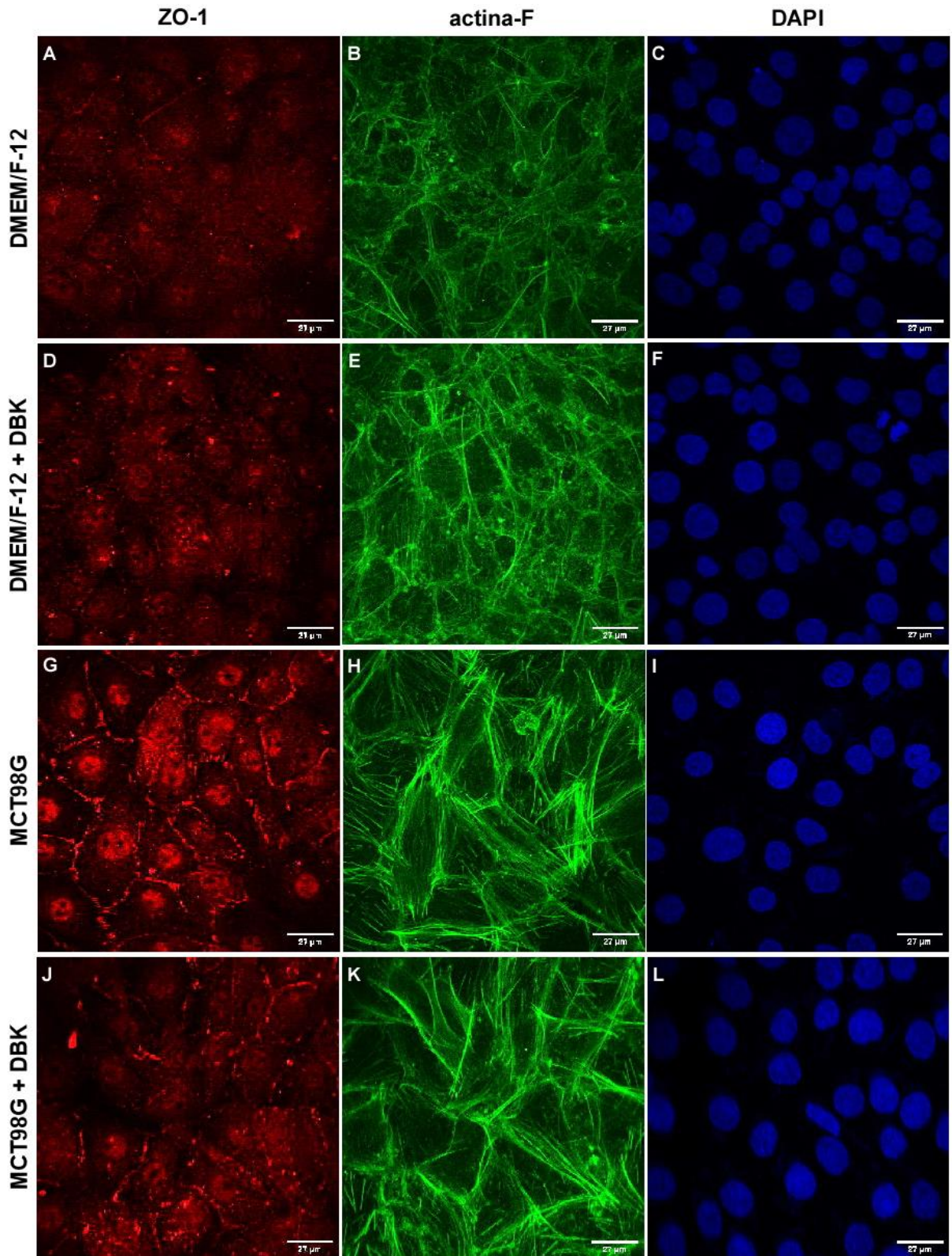
proteína que compõe da BHE. **(B, E, H, K, N, Q, T)** Marcação de actina F, para observar a morfologia das HBMECs após exposição às diferentes condições. **(C, F, I, L, O, R, U)** A marcação nuclear com DAPI indica que não houve diferença no número de células após os tratamentos. **(V)** Considerando o meio 199 com soro o controle (199 c/s) como a referência de intensidade de marcação para ZO-1, foi observado que somente as células cultivadas em DMEM/F-12 s/s apresentaram diminuição na intensidade de marcação para a referida proteína. **(W)** Quando é considerado o meio DMEM/F-12 com soro (DMEM/F-12 c/s) como referência de intensidade, tem-se que as células tratadas com MCT98G apresentaram aumento na intensidade de marcação de ZO-1. **(W)** \* $p < 0.05$  DMEM/F-12 c/s versus MT98G. Análise Teste de Kruskal-Wallis. Microscopia confocal, barra de escala de 27  $\mu\text{m}$ . Número de experimentos = 7.

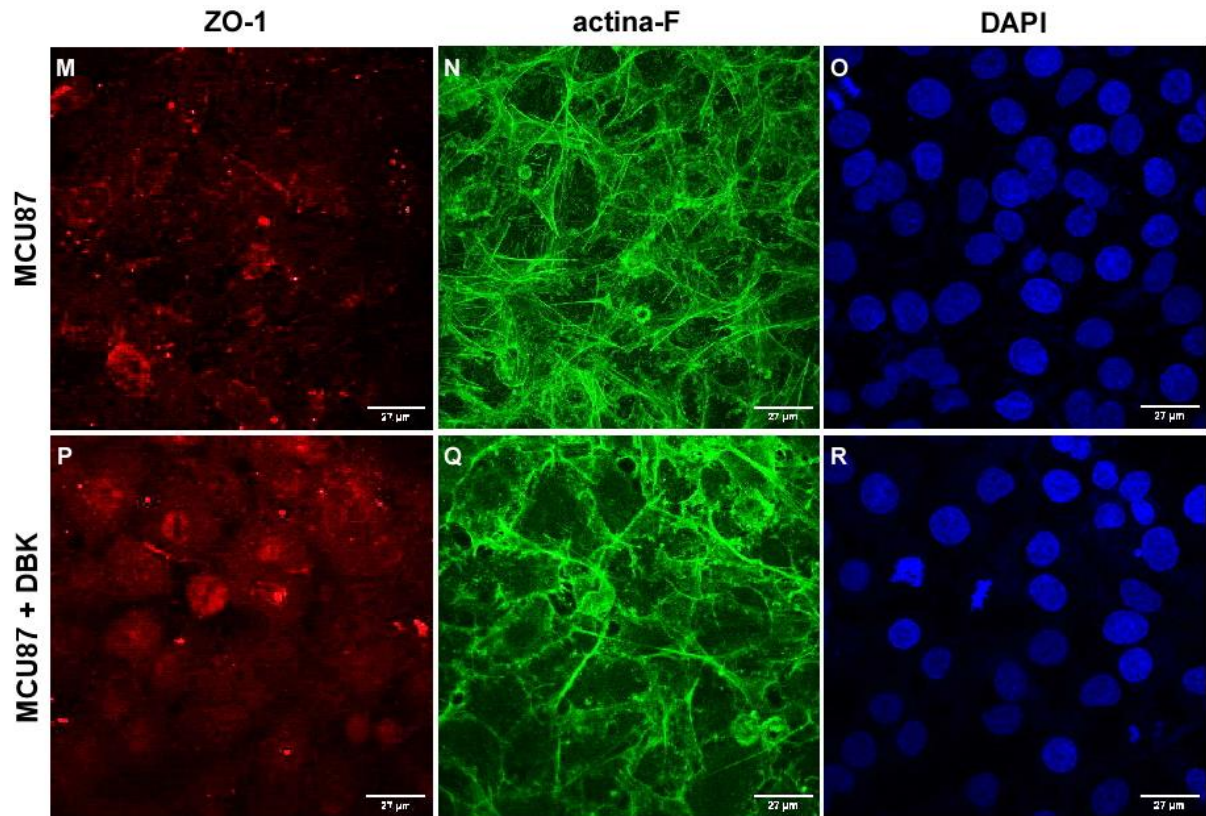
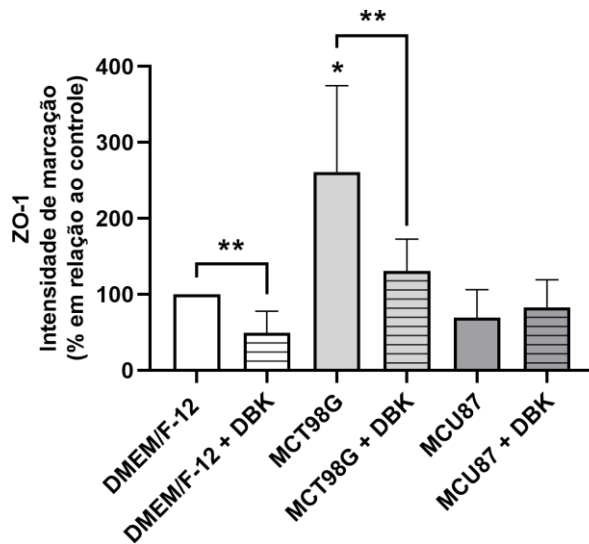
Temos, portanto, que o meio condicionado de T98G possui fatores que alteram a morfologia de células endoteliais e a presença de ZO-1, importante proteína que compõe a BHE.

### 3.2 ANÁLISE DE PROTEÍNAS QUE COMPÕEM A BHE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AO MCU87 E MCT98G NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DBK

Após a observação de que o MCT98G pode causar alterações morfológicas **(Figura 35P)** e alterar os níveis de ZO-1 **(Figura 36W)** nas células HBMEC, essas foram incubadas com DBK 1  $\mu\text{M}$  para análise da modulação do receptor  $B_1$  de cininas pode afetar as células endoteliais e de proteínas que compõe a barreira hematoencefálica.

A análise de intensidade de marcação por imunofluorescência para a proteína ZO-1 **(Figura 37A, D, G, J, M, P)** indica diminuição da intensidade de marcação quando administrado DBK 1  $\mu\text{M}$  junto ao MCT98G **(Figura 37S)**, que sem o fármaco eleva a intensidade de marcação para ZO-1 **(Figura 37S)**. As células incubadas com DBK em meio DMEM/F12 também apresentaram menor intensidade de marcação quando comparada com o controle DMEM/F-12 com soro **(Figura 37S)**. Não houve variação na intensidade de marcação a ZO-1 quando a DBK foi adicionada ao meio condicionado de células U87 **(Figura 37S)**.



**S**

**Figura 37: Marcação para ZO-1 em HBMEC tratadas com MCT98G e MCU87 na ausência e presença de DBK. (A-R)** Imunocitoquímica para ZO-1 e marcação de actina-F e núcleo (DAPI) na condição controle (DMEM/F-12 com soro) e em meios condicionados de glioblastoma (MCT98G e MCU87) na ausência ou presença de DBK 1  $\mu$ M. **(S)** A análise de intensidade de marcação da imunofluorescência para a proteína ZO-1 indica um aumento expressivo da intensidade de marcação nas células HBMEC expostas ao MCT98G. Quando adicionado DBK na condição controle e no MCT98G houve diminuição da intensidade de marcação para ZO-1, e sem alteração quando a DBK foi adicionada ao MCU87. **(S)** \* $p < 0.05$  MCT98G versus DMEM/F-12, DMEM/F-12 + DBK, MCU87 e MCU87 + DBK (Teste de Kruskal-Wallis); \*\* $p < 0.05$  DMEM/F-12 versus DMEM/F-12 + DBK, MCT98G versus MCT98G + DBK, teste t não pareado. Microscopia confocal, barra de escala de 27  $\mu$ m. Número de experimentos = 7.

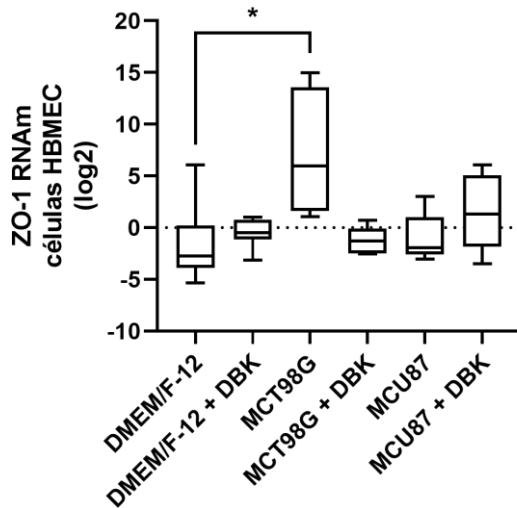
Como a BHE requer uma co-dependência entre as células para manutenção de sua função (ARVANITIS et al., 2020), analisamos a expressão de RNAm de ZO-1, claudina-5 e GLUT-1, proteínas que compõe a BHE.

Os dados de RT-qPCR indicam que as células HBMEC incubadas, por 24h, com MCT98G tem seus níveis de RNAm de ZO-1 aumentado (**Figura 38A**), em relação a todas as outras condições estudadas, voltando aos níveis do controle com a adição da DBK ao meio condicionado (**Figura 38A**). Esse dado corrobora com o resultado da intensidade de marcação, visto que em MCT98G houve um aumento de ZO-1 e em MCU87 não houve variação em relação à condição controle (**Figura 38S**). Este resultado indica que a atividade de B1R parece modular ZO-1 a depender do tipo de glioblastoma.

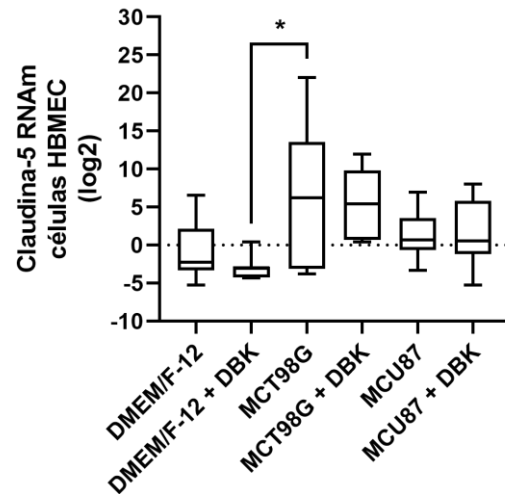
Assim como ZO-1, o RNAm de claudina-5 aumenta em HBMEC tratada por 24h com MCT98G, parecendo diminuir quando a DBK é incorporada ao meio condicionado (**Figura 38B**). Não há alteração nos níveis de RNAm dessa proteína que compõe a BHE em HBMEC expostas ao MCU87 na ausência ou presença de DBK 1  $\mu$ M.

Já a expressão de RNAm de GLUT-1 em HBMEC não variou nas condições de cultivo estudadas (**Figura 38C**).

**A**

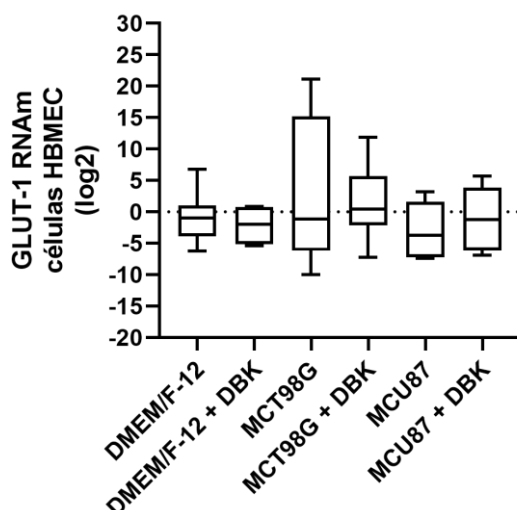


**B**





C



**Figura 38: O MCT98G altera a expressão de RNAm de ZO-1 e claudina-5 em células endoteliais, o que não ocorre quando adicionado DBK no meio. (A)** As células HBMEC exposta ao MCT98G tem os níveis de RNAm de ZO-1 aumentado, voltando ao níveis do controle quando adicionado DBK 1  $\mu$ M no meio. **(B)** A expressão de RNAm claudina-5 está aumentada em células HBMEC incubadas com MCT98G, diminuindo quando há DBK no meio. **(C)** A expressão RNAm de GLUT-1 não variou nas condições de cultivo de HBMEC estudadas. **(A)** \* $p < 0.05$  MCT98G versus DMEM/F-12. **(B)** \* $p < 0.05$  MCT98G versus DMEM/F-12 + DBK. Teste de Kruskal-Wallis. Número de experimentos = 10.

### 3.3 ANÁLISE DE B1R E TLR4 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EXPOSTAS AO MCU87 E MCT98G NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DBK

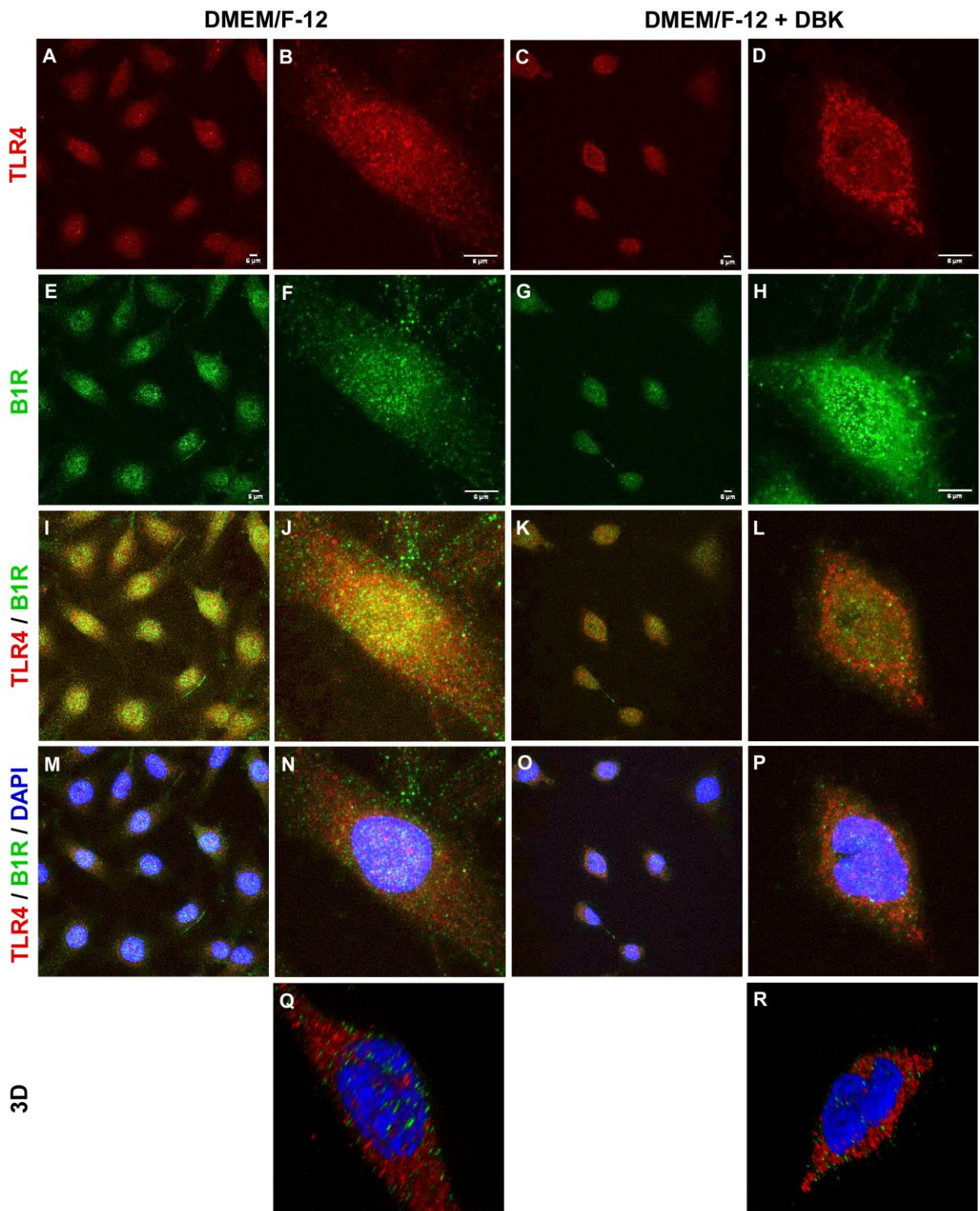
Células HBMEC em cultura foram expostas aos meios condicionados de T98G e de U87 (MCT98G e MCU87) para observarmos a expressão de B1R e de TLR4 nesses microambientes tumorais e se há alguma alteração quando adicionamos DBK 1  $\mu$ M.

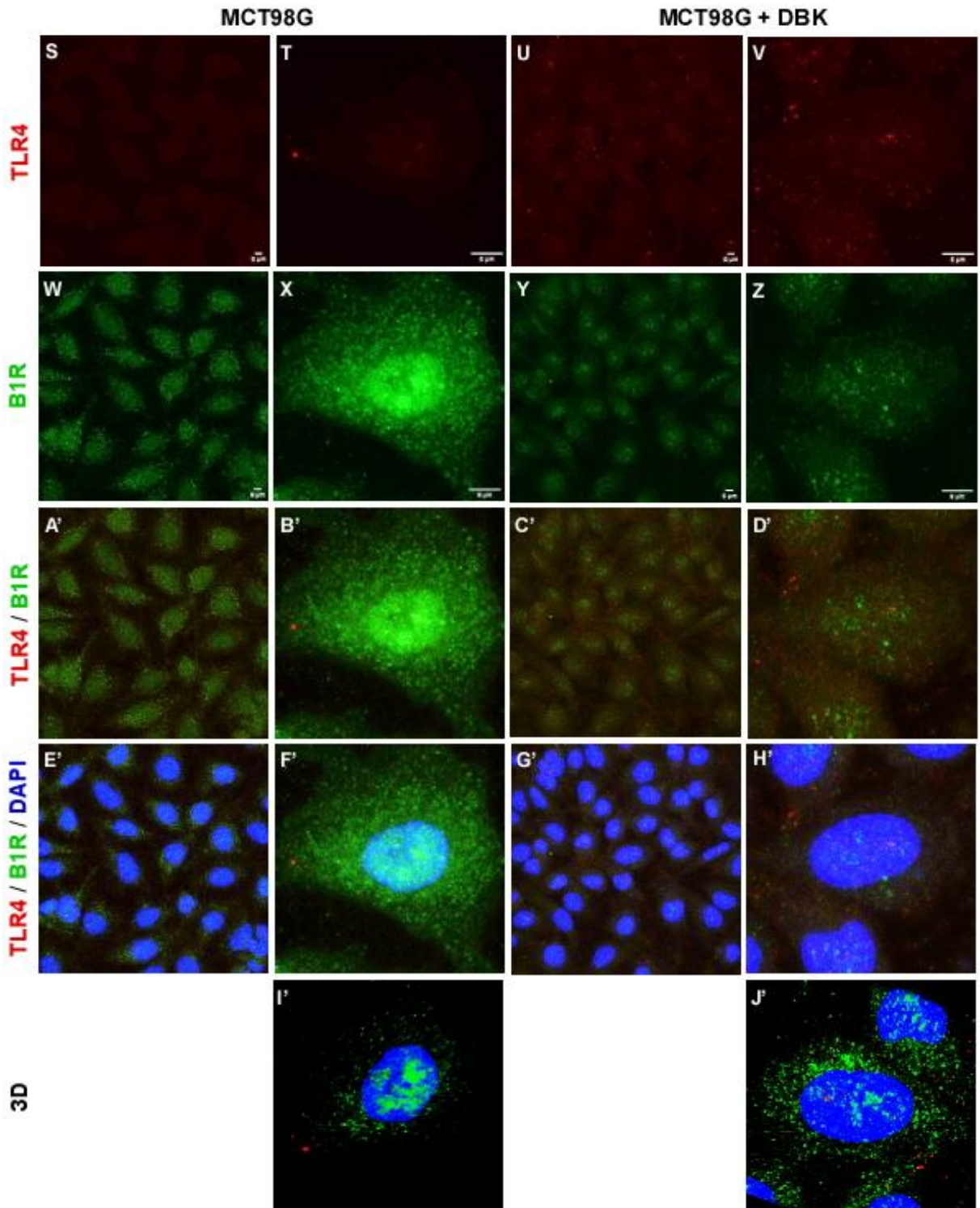
Como observado anteriormente nas **Figuras 30 e 31**, em células HBMEC expostas ao meio DMEM/F-12, condição controle, a marcação de B1R e TLR4 é difusa (**Figuras 39A, B, E, F, I, J, M, N, Q**), presente ao longo de toda a célula, tendendo a se concentrar na região perinuclear quando tratadas com DBK, pelo período de 24h (**Figuras 39C, D, G, H, K, L, O, P, R**).

Quando expomos as células HBMEC aos meios condicionados de linhagens de glioblastoma, MCT98G (**Figuras 39S-J'**) ou MCU87 (**Figuras 39K'-B''**), notamos uma diminuição na marcação de TLR4, em meio sem (**Figuras 37S, T, A', B', E', F'**,

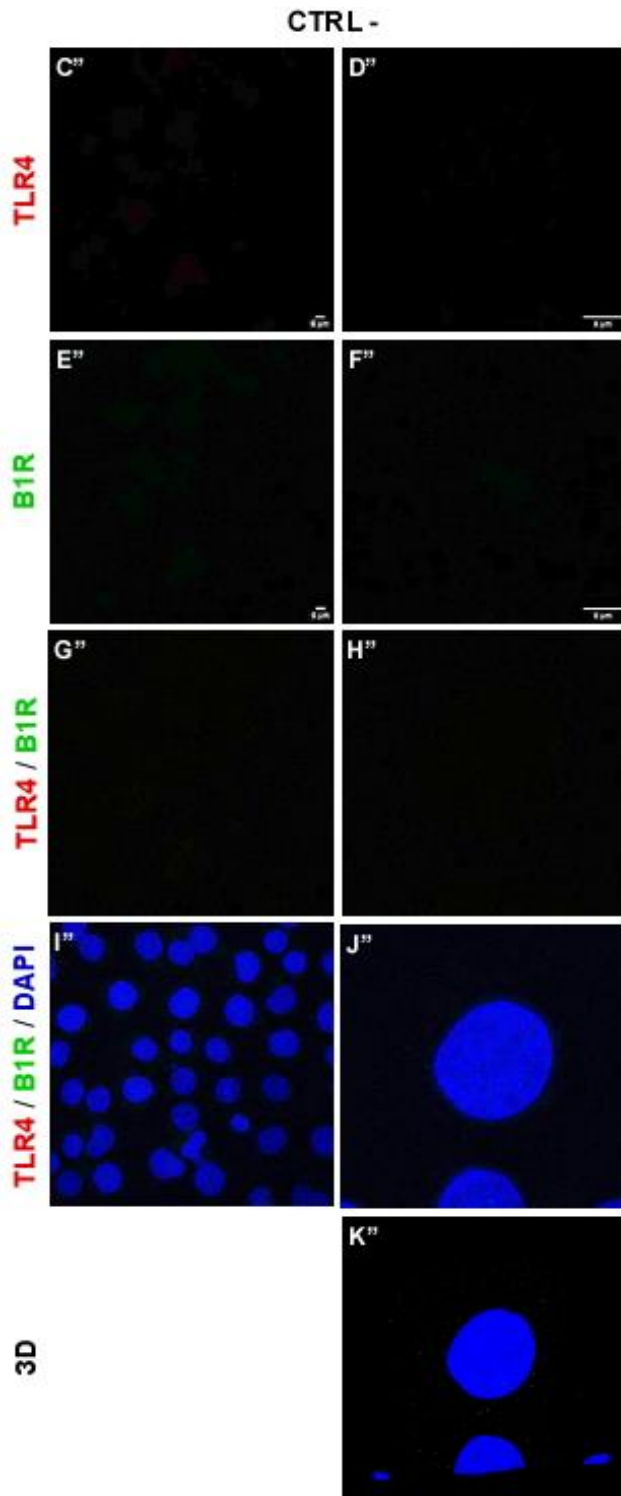
**I', G', H', I', K', L', S', T', W', X', A'')** ou com DBK (**Figuras 39U, V, C', D', G', H', J', M', N', U', V', Y', Z', B''**).

O receptor B1R parece estar presente e concentrado em região perinuclear em células HBMEC expostas ao MCT98G (**Figuras 39W, X, A', B', E', F', I'**), mas esta diminui quando DBK está presente (**Figuras 39Y, Z, C', D', G', H', J'**). Em meio MCU87 a marcação encontra-se mais intensa em região perinuclear tanto na ausência de DBK 1  $\mu$ M no meio (**Figuras 39O', P', S', T', W', X', A''**) quanto na presença (**Figuras 39Q', R', U', V', Y', Z', B''**). Para comparação, as imagens do controle negativo (**Figuras 39C''-K''**).









**Figura 39: Padrão de marcação de B1R e TLR4 em células endoteliais tratadas com MCT98G e MCU87 na ausência ou presença de DBK. (A-R)** Células HBMEC cultivadas em meio DMEM/F-12 (controle) (A, B, E, F, I, J, M, N, Q) e tratadas com DBK (C, D, G, H, K, L, O, P, R); marcação de TLR4 (A, B) e B1R (E, F) difusa ao longo da célula e concentrada em região perinuclear quando tratada com DBK (C, D, G, H). (S-J') Células HBMEC expostas ao meio condicionado de células T98G (MCT98G) e tratadas com DBK; diminuição da marcação para TLR4 sem (S, T, A', B', E', F', I') ou com DBK (U, V, C', D', G', H', J'); presença de intensa marcação de B1R em região perinuclear em células expostas ao MCT98G (W, X, A', B', E', F', I'), mas esta diminui quando adicionados DBK ao meio (Y, Z, C', D', G', H', J'). (K'-B''). Células HBMEC expostas ao meio condicionado de

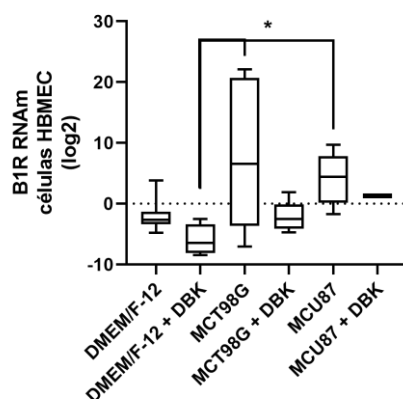
células U87 (MCU87) e tratadas com DBK; diminuição da marcação para TLR4 sem (**K', L', S', T', W', X', A''**) ou com DBK (**M', N', U', V', Y', Z', B''**); marcação de B1R mais intensa em região perinuclear sem (**O', P', S', T', W', X', A''**) ou com DBK no meio (**Q', R', U', V', Y', Z', B''**). (**C''-K''**) Controle negativo da imuno. (**A, C, E, G, I, K, M, O, S, U, W, Y, A', C', E', G'K', M', O', Q', S', U', W', Y', C'', E'', G'', I''**) Barra de escala: 6  $\mu$ m. (**B, D, F, H, J, L, N, P, T, V, X, Z, B', D', F', H', L', N', P', R', T', V', X', Z', D'', F'', H'', J'', K''**) Barra de escala: 6  $\mu$ m. (**Q, R, I', J', A'', B'', K''**) Reconstrução 3D das imagens de tripla marcação em aumento 63x em zoom de 4x. (**I-L, A'-D', S'-V', G'' e H''**) Combinação das imagens de TLR4 e B1R. (**M-P, E'-H', W'-Z', I'' e J''**) Combinação das imagens de TLR4, B1R e DAPI. Microscopia confocal, barra de escala de 6  $\mu$ m. Número de experimentos = 10.

Ao olharmos a expressão de RNAm de B1R e TLR4 nas células HBMEC expostas aos meios condicionados de T98G e de U87MG, com adição ou não de DBK, observamos que o RNAm de B1R aumenta nas células tratadas com MCU87, em relação a DMEM/F-12 + DBK (**Figura 40A**). Já em células tratadas com MCT98 e MCT98 + DBK foi o RNAm de TLR4 que teve aumento de expressão (**Figura 40B**).

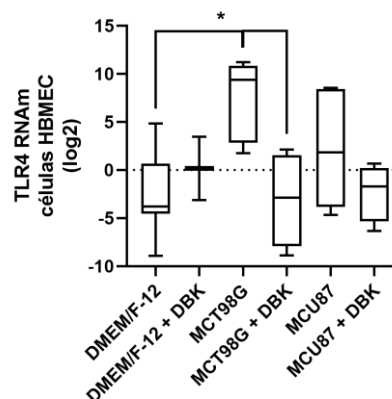
Como os resultados de eletrofisiologia apresentados neste trabalho indicam a relação, também já apontada na literatura, entre B1R e B2R, fizemos a análise da expressão de B2R, a qual indicou o aumento de expressão deste RNAm em células HBMEC expostas aos meios condicionados e ao MCT98G + DBK em relação à condição controle (**Figura 40C**).

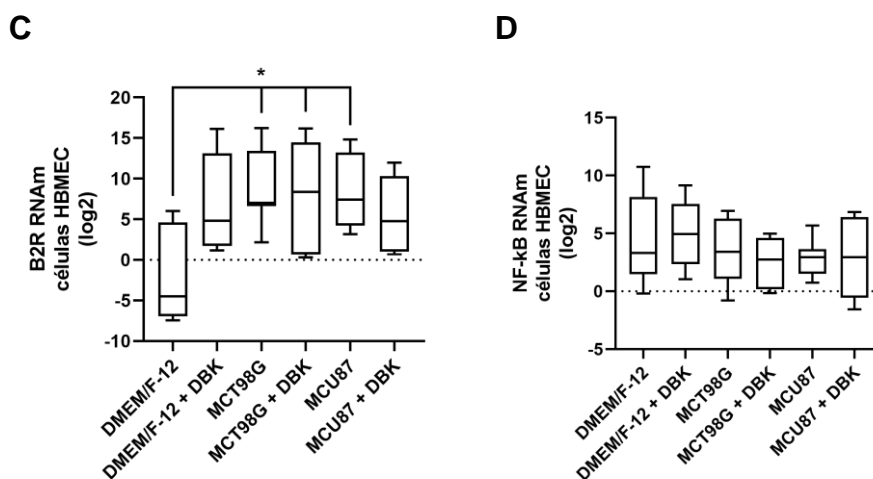
O fator de transcrição que relaciona aos receptores TLR4 e B1R seria o NF- $\kappa$ B, e este não apresentou alteração significativa no seu padrão de expressão de RNAm do meio controle em relação a 24h das células endoteliais expostas aos microambientes tumorais na ausência ou presença de DBK (**Figura 40D**). Em ensaio *in vitro* com veia porta, a incubação contínua de inibidores de NF- $\kappa$ B promoveu a inibição significativa da expressão do mRNA de B1R (Medeiros et al., 2004).

**A**



**B**



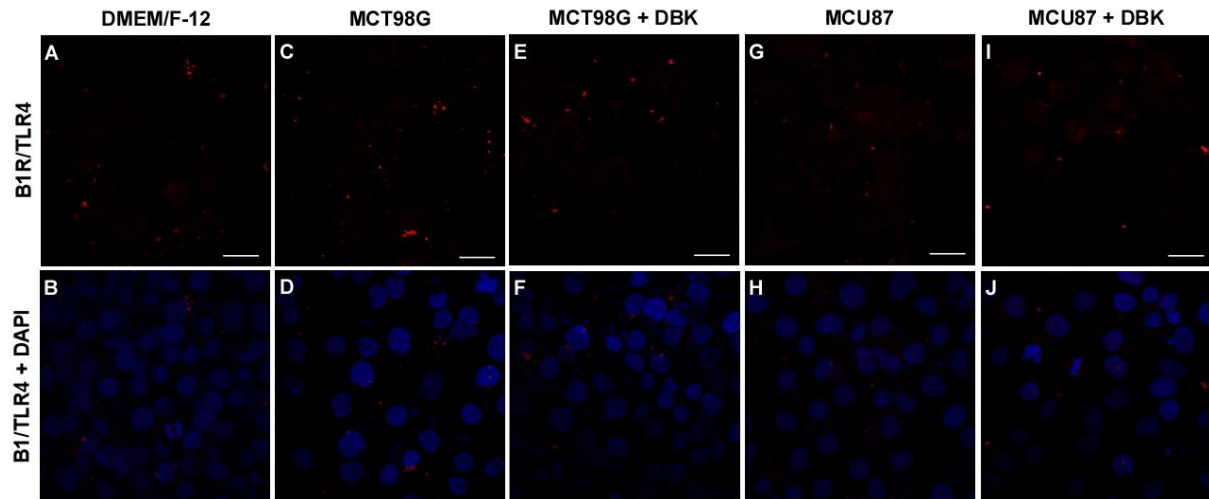


**Figura 40: Níveis relativos da expressão de RNAm dos receptores de B1R, B2R, TLR4 e NF-kB em células endoteliais incubadas, por 24h, com MCT98G ou MCU87 com ou sem DBK. (A)** O RNAm de B1R aumenta nas células que entraram em contato com MCT98G e MCU87, em relação à condição DMEM/F-12 + DBK. Em células tratadas com MCT98 e MCT98 + DBK foi o RNAm de TLR4 que teve aumento de expressão em relação ao controle DMEM/F-12 **(B)**. **(C)** A análise da expressão de B2R, a qual indicou o aumento de expressão deste RNAm em células HBMEC expostas aos meios condicionados e ao MCT98G + DBK em relação à condição controle. **(D)** Não há variação significativa da expressão de RNAm de NF-kB em nenhuma condição estudada. **(A)** \* $p < 0.05$  DMEM/F-12 + DBK versus MCT98G e MCU87. **(B)** \* $p < 0.05$  DMEM/F-12 versus MCT98G e MCT98G + DBK. **(C)** \* $p < 0.05$  DMEM/F-12 versus MCT98G, MCT98G + DBK e MCU87. Teste Kruskal-Wallis. Número de experimentos:  $n = 9$ .

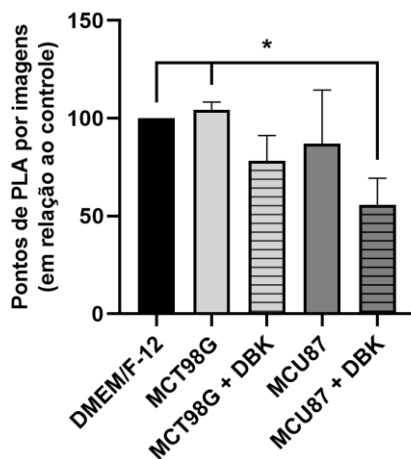
### 3.4 DBK DIMINUI A PROXIMIDADE DE LIGAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES B1R E TLR4 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS TRATADAS COM MEIO CONDICIONADO DE GLIOBLASTOMA

O ensaio de ligação por proximidade (PLA) em células HBMEC incubadas, por 24h, com meios MCT98G e MCU87 indica que, em relação à condição controle (DMEM/F-12), os meios condicionados não alteram por si os pontos de proximidade (distância menor que 40 nm (400 Å)) entre os receptores B1R e TLR4 **(Figura 41)**. Porém, quando há adição de DBK 1  $\mu$ M nos meios condicionados de T98G e U87MG, há uma diminuição desses pontos de proximidade, sendo significativo na condição MCU87 + DBK em relação ao controle e MCT98G **(Figura 41K)**.





K



**Figura 41: Diminuição dos pontos de proximidade entre B1R e TLR4 em células HBMEC incubadas em MCT98G e MCU87 com DBK.** No ensaio de para observar a proximidade (PLA) entre os receptores B1R e TLR4 em culturas de células HBMEC observamos os pontos de ligação na situação controle, quando as células foram cultivadas em meio de DMEM/F-12 (**A e B**), e quando tratadas por 24h em MCT98G(**C e D**) e MCU87 (**G e H**), com ou sem adição de DBK 1  $\mu$ M (**E e F**; **I e J**). A imagem desses pontos com colocalização da marcação de núcleos indica presença desses na região marcada com DAPI (**B, D, F, H e J**). (**K**) Na quantificação dos pontos de ligação, observamos a diminuição significativa dos pontos de ligação nas culturas MCU87 + DBK em relação às DMEM/F-12 e MCT98G. (**K**) \* $P < 0.05$  MCU87 + DBK versus DMEM/F-12 e MCT98G. ANOVA (Teste de Tukey). Microscopia óptica de fluorescência; barra de escala de 27  $\mu$ m. Número de experimentos = 3.

### 3.5 A ATIVAÇÃO DE B1R POR DBK GERA UMA RESPOSTA DE NO EM HBMEC CULTIVADA EM DMEM/F-12, MAS NÃO EM MEIOS CONDICIONADOS DE GLIOBLASTOMA

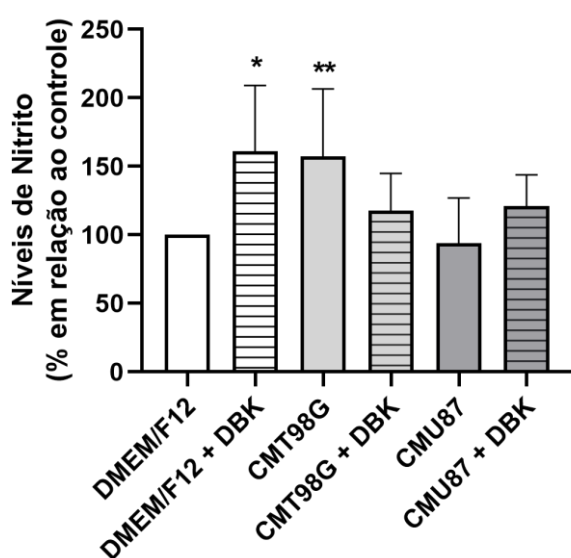
Considerando que a redução dos níveis de concentração dos produtos do NO são associados à ausência de atividade de B1R e B2R, fomos analisar os níveis de nitrito extracelular ( $\text{NO}_2^-$ ) nas culturas de HBMEC tratadas, por 24h, com meios

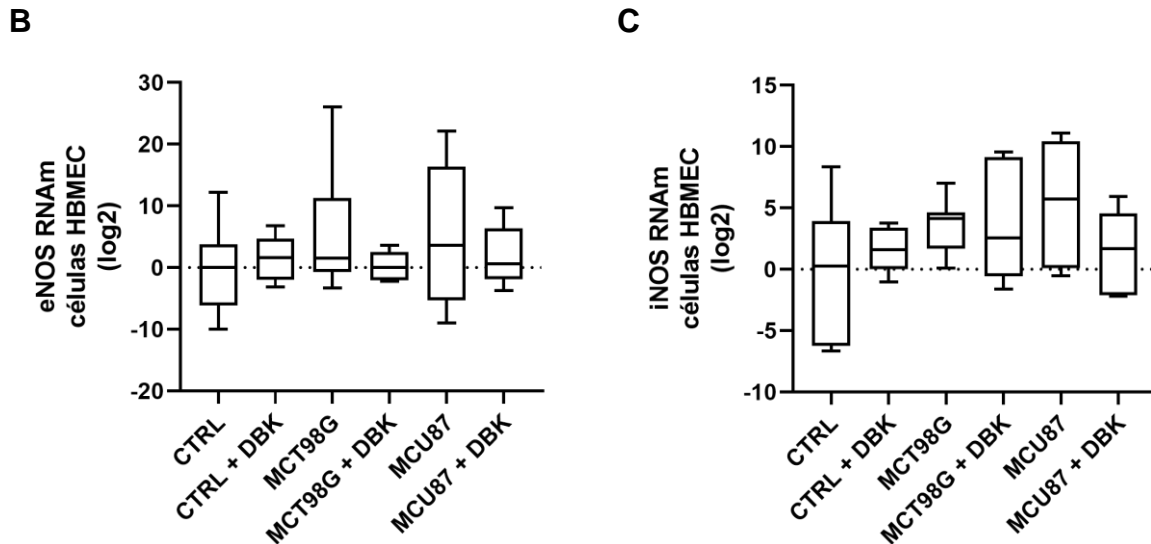
condicionados de T98G e de U87MG, na presença ou não de DBK 1  $\mu$ M, através da reação de Griess.

Os resultados obtidos apontam que, na situação controle de cultivo celular (DMEM/F12 com soro) com adição de DBK 1  $\mu$ M, por 24h, houve um aumento nos níveis de nitrito em relação ao controle (**Figura 42A**). O mesmo foi observado no meio MCT98G que incubou as células HBMEC por 24h (**Figura 42A**), retornando ao padrão controle quando adicionado DBK ao meio. Assim como ocorreu nos modelos de aorta deste estudo (**Figura 23**), observamos que a exposição das células HBMEC ao meio condicionado de U87MG não altera os níveis de nitrito presentes no meio, mesmo na presença de DBK (**Figura 42A**), indicando que as células de HBMEC respondem aos diferentes meios condicionados tumorais com ou sem adição de DBK de maneira distinta, assim como ocorre com as linhagens animais, com uma resposta inflamatória que pode ou não envolver NOS.

Quando analisamos as expressões gênicas de eNOS e iNOS, observamos que não há variação na quantidade relativa de RNAm tanto eNOS (**Figura 42B**) quanto de iNOS (**Figura 42C**) nas condições estudadas. A adição de DBK 1  $\mu$ M não altera essas expressões (**Figura 42B e C**) em comparação àquelas encontradas nas condições sem o peptídeo.

A





**Figura 42: Atividade de NO em células HBMEC tratadas com meios condicionados de glioblastoma com e sem adição de DBK. (A)** A análise do meio de cultivo celular de células HBMEC expostas, por 24h, a microambientes tumorais de U87 e de T98G na presença ou ausência de DBK 1  $\mu$ M aponta que há variação nos níveis de nitrito liberados no meio extracelular nos meios de células cultivadas em DMEM/F-12 com DBK; em MCT98G que ficou em contato com as HBMECs há maior presença significativa de nitrito, mas que volta aos níveis do controle quando adicionado DBK ao meio. **(B)** Expressão do RNAm de eNOS não varia nas várias condições em que as células HBMEC foram tratadas. **(C)** Não há alteração no padrão de expressão do RNAm de iNOS nas condições de tratamento das células HBMEC. **(B e C)** 10  $\mu$ M de DBK não altera a expressão de RNAm de eNOS e iNOS encontradas na ausência do peptídeo. **(A)** \* $p < 0.05$  DMEM/F-12 + DBK versus DMEM/F-12; \*\* $P < 0.05$  MCT98G versus DMEM/F-12. ANOVA (Teste de Tukey); número de experimentos = 12; **(B e C)** Teste de Kruskal-Wallis; número de experimentos = 10.

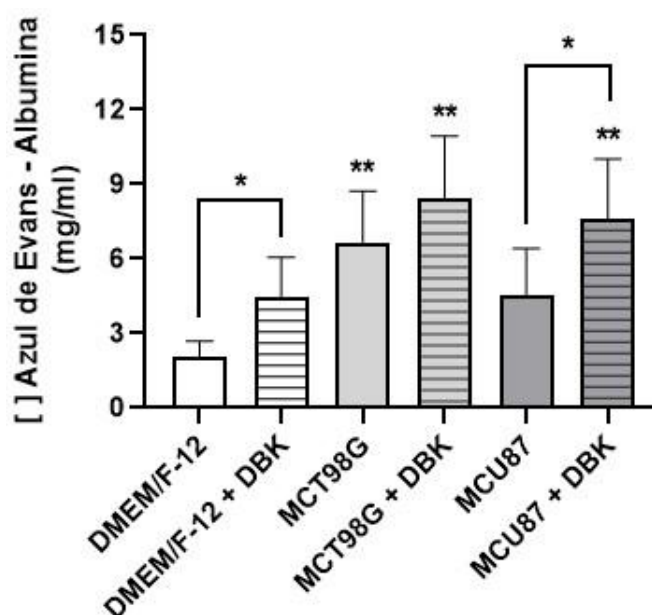
### 3.6 DBK PROMOVE A ABERTURA TRANSITÓRIA DA BHE

Após observarmos que há resposta das células endoteliais à DBK 1  $\mu$ M, e que esta é diferente em meios condicionados de diferentes linhagens de glioblastoma, fomos investigar se essas mudanças podem estimular a abertura transitória da barreira hematoencefálica.

Para analisar se a DBK permite a passagem paracelular de substâncias, realizamos um ensaio de permeabilidade transitória, para observar a passagem do corante azul de Evans entre as células HBMEC. Em ensaio de transwell com células endoteliais cultivadas no inserto com 100% de confluência, células HBMEC foram expostas à DBK 1  $\mu$ M do lado apical e aos meios DMEM/F-12 com soro (controle), MCT98G e MCU87 na face basal, pelo período de 24h (**Figura 14**). Com 23h de tratamento foi adicionado 200  $\mu$ l do corante azul de Evans 1% (diluído em meio

DMEM/F-12 com albumina), e, com 24h de tratamento, o meio da porção basal foi coletado, pipetado em placa de 96 poços para leitura na absorbância de 620 nm.

Observamos que a adição de DBK 1  $\mu$ M em meio DMEM/F-12 permite a passagem do corante do inserto para o poço da placa de 24 poços, da região apical para a basal (**Figura 43**). A presença de MCT98G na porção basal, mesmo sem DBK, induziu a passagem do complexo azul de Evans – BSA em concentração significativamente maior do que a condição controle (**Figura 43**). O mesmo não foi observado quando o tratamento foi com MCU87, onde foi necessária a presença de DBK no meio apical para uma expressiva passagem de corante, comparado à condição controle (**Figura 43**).



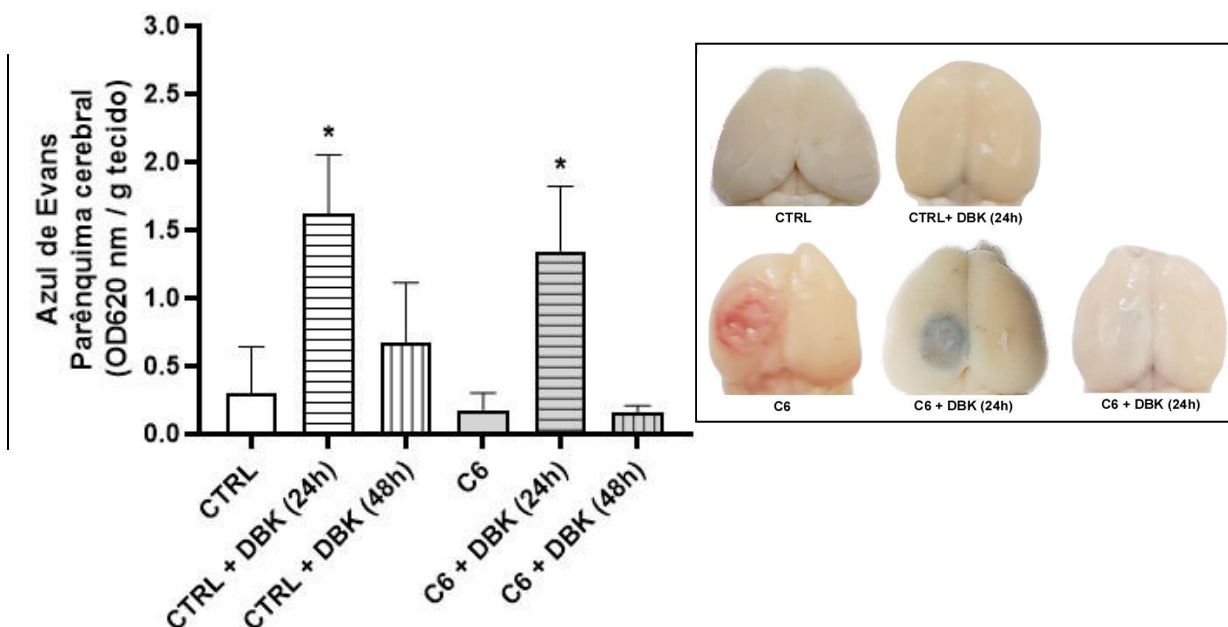
**Figura 43: Passagem paracelular do complexo azul de Evans-BSA em ensaio de transwell com HBMEC.** A adição de DBK 1  $\mu$ M em meio DMEM/F12 do inserto (lado apical) permite a passagem no corante da câmara para o poço, da região apical para a basal, na condição controle (DMEM/F-12 do lado basal). Na exposição ao MCT98G houve um aumento da permeabilidade mesmo sem a DBK. Já no tratamento com MCU87 só houve passagem significativa do complexo corante - BSA na presença do peptídeo. \*P<0.05 DMEM/F-12 versus DMEM/F-12 + DBK e MCU87 versus MCU87 + DBK; \*\*P<0.05 DMEM/F-12 versus MCT98G, MCT98G + DBK e MCU87 + DBK. Teste não paramétrico (Teste de Kruskal-Wallis). Número de experimentos = 6.

Considerando que houve aumento da marcação para ZO-1 em células endoteliais expostas ao MCT98G (**Figura 36W**) e diminuição quando DBK foi adicionado a este (**Figura 37S**), podemos concluir que a ZO-1 presente está

desorganizada, visto o resultado do ensaio de permeabilidade transitória (**Figura 43**).

Com o ensaio de transwell indicando a passagem do corante com 24h de tratamento das células HBMEC com DBK 1  $\mu\text{M}$ , buscamos saber se o mesmo estaria acontecendo no modelo *in vivo*. Como indicado na seção “Materiais e Métodos” deste trabalho, camundongos foram inoculados com tumor de glioblastoma de linhagem C6 de rato e, no 19º dia após a cirurgia, receberam uma única injeção sistêmica de 100  $\mu\text{l}$  de DBK 1  $\mu\text{M}$ , sendo divididos entre o grupo sacrificado após 24h e o após 48h. Uma hora antes do sacrifício, os animais receberam injeção de azul de Evans 2% pela veia da cauda. Para o procedimento de perfusão com tampão PBS, os camundongos receberam dose letal de anestésico; os cérebros foram pesados e imersos em 500  $\mu\text{l}$  de formamida para que o AE, presente no parênquima cerebral, saísse do tecido para o solvente. Após 48h, o tecido foi retirado da formamida e volume foi pipetado em placa de 96 poços (50  $\mu\text{l}$ /poço) para leitura a 620 nm.

A análise da quantidade de corante azul de Evans que estava presente no parênquima cerebral de animais inoculados ou não com células C6 e que receberam e ou não o peptídeo, indicam que no tempo 24h após a injeção de DBK 1  $\mu\text{M}$  a BHE estava aberta, tanto nos animais controle quanto naqueles inoculados com linhagem C6 de glioblastoma (**Figura 44**). No tempo de 48h após a injeção da DBK, a quantidade de corante no parênquima volta a níveis basais, indicando que a barreira a barreira fechada e a eficácia da abertura transitória (**Figura 44**). A grande variação estatística provavelmente deve-se à perda de corante durante a injeção na veia da cauda e ao tamanho do tumor, que pode variar entre os animais, como exemplificado nas imagens da **Figura 44**.

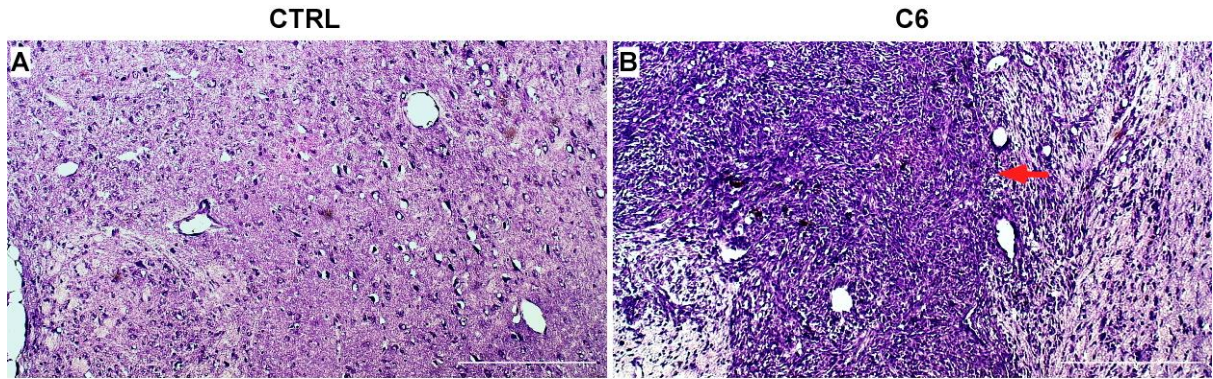


**Figura 44: A DBK promove a abertura transitória da BHE por intervalo menor que 48h.** A análise da quantidade de corante azul de Evans presente no parênquima cerebral de animais inoculados ou não com células C6, e que receberam e ou não DBK 1  $\mu$ M, indica que a barreira está aberta com 24h da injeção do peptídeo, e já está fechada 48h após a injeção deste. \* $p < 0.05$  CTRL + DBK (24h) e C6 + DBK (24h) versus CTRL, CTRL + DBK (48h), C6, C6 + DBK (48h). ANOVA (Teste de Holm-Sidak). Número de experimentos = 5.

### 3.7 EFEITO DE DBK NA ENTREGA DE DOX AO PARÊNQUIMA CEREBRAL DE CAMUNDONGOS

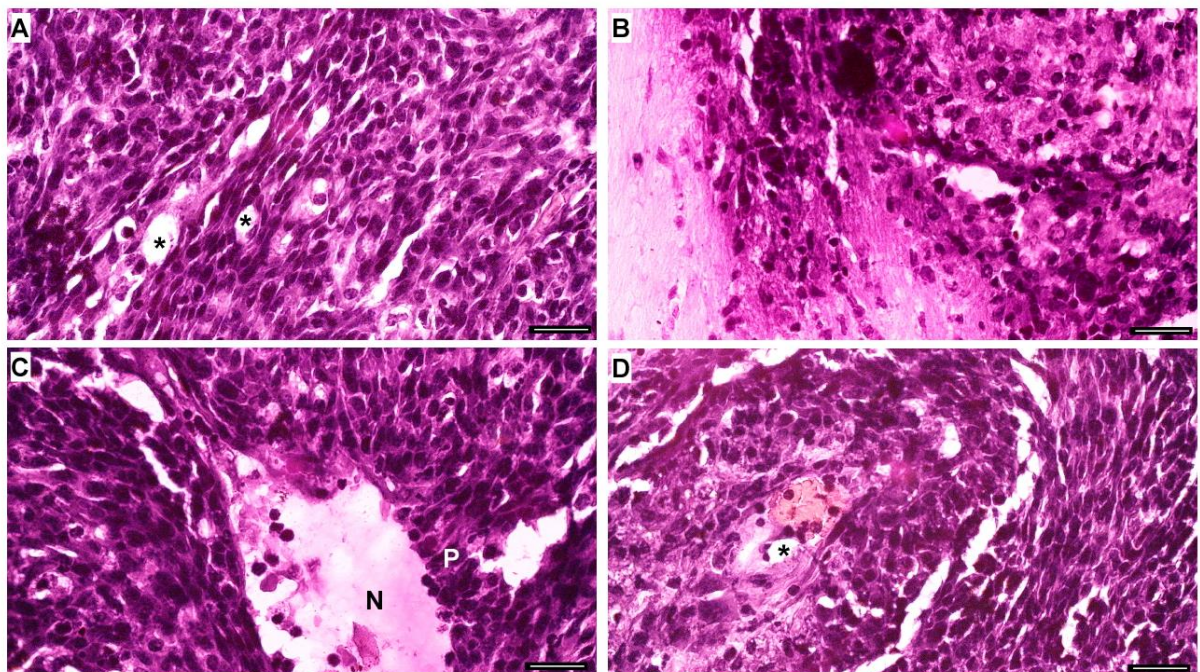
Para testarmos se a abertura transitória da BHE pela DBK 1  $\mu$ M permite a passagem de fármaco para o parênquima cerebral de molécula que não ultrapassa a barreira, foi feito ensaio *in vivo* com administração do quimioterápico DOX em combinação com o peptídeo.

Lâminas com cortes histológicos de tecido cerebral, na espessura de 6 a 10  $\mu$ m, de camundongos controles e inoculados com células C6, com os diferentes tratamentos, foram destinadas à coloração histológica com cristal violeta, para observar a presença ou não da massa tumoral, pois há uma grande variação no tamanho do tumor de animal para animal, pois C6 é uma célula de rato. Na **Figura 45** apresentamos imagem de um parênquima controle (**Figura 45A**) e com o parênquima com tumor C6 (**Figura 45B**). A seta vermelha em (**Figura 45B**) indica a região peritumoral, com uma coloração mais escura, indicando a grande densidade celular na região.



**Figura 45: Coloração histológica com cristal violeta.** Cortes histológicos de tecido cerebral de camundongos controle **(A)** e 20 dias após serem inoculados com células C6 **(B)**. A seta vermelha em **(B)** indica a região peritumoral, com uma coloração mais escura, indicando a grande densidade celular na região. Microscopia de luz, barra de escala de 250  $\mu\text{m}$ .

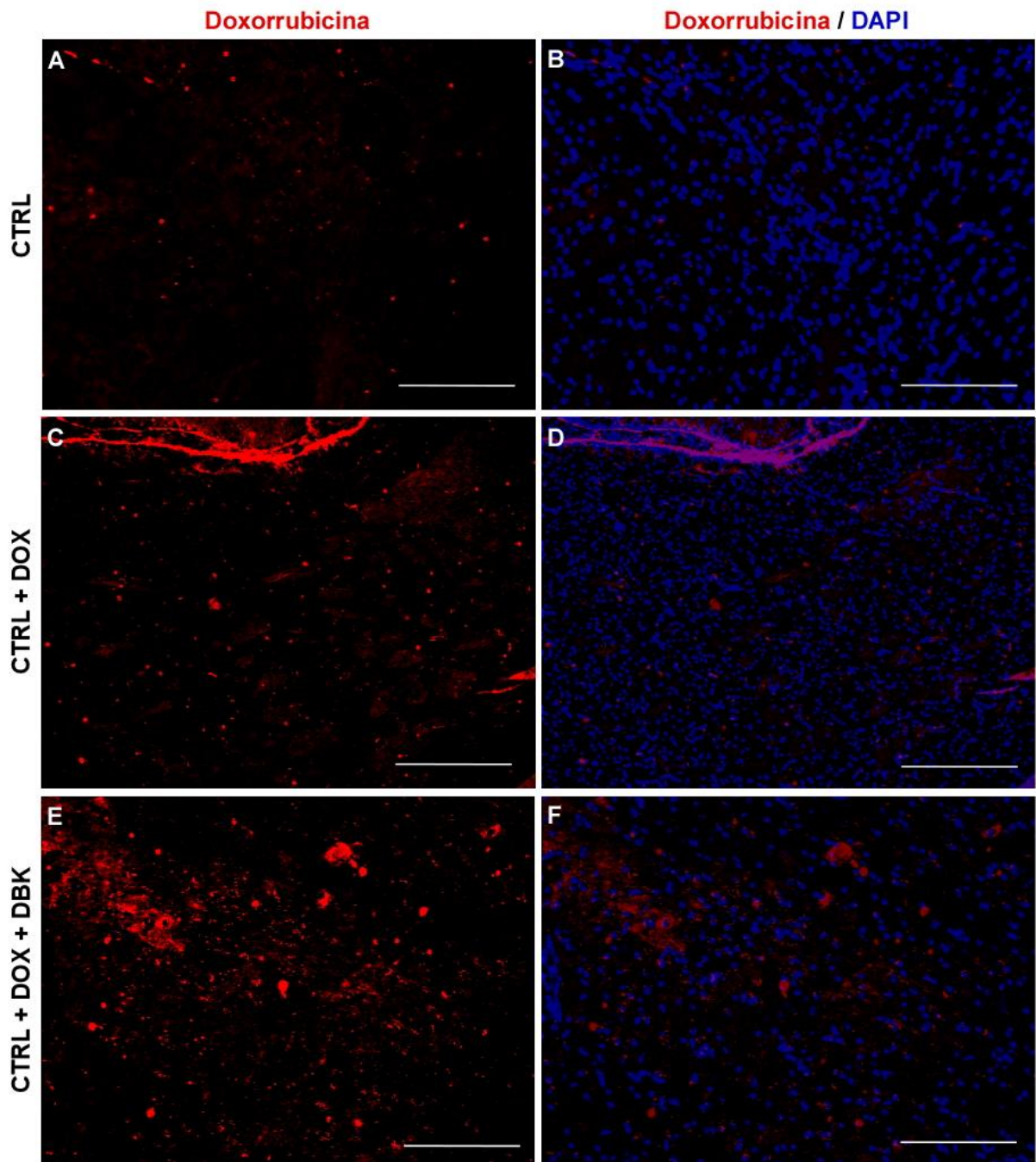
As análises histopatológicas, em nível celular, dos tumores de C6, realizadas em cortes de 6-10  $\mu\text{m}$  corados com H&E, indicam enorme acúmulo de massa de células C6 com características típicas do glioblastoma multiforme, com alta celularidade **(Figura 46A)**, regiões de invasão do parênquima cerebral **(Figura 46B)** e presença de focos necróticos em pseudopaliçada **(N e P na Figura 46C)**. Além disso, o glioma C6 apresenta células com núcleos variando de redondo a oblongo, com padrão de crescimento em espinha de peixe **(Figura 46A e D)** e células em mitose e microvasos **(asteriscos Figura 46)** (KARMAKAR et al., 2007; BARTH & KAUR, 2009; SILVA et al., 2012; LUKINA et al., 2021; BONA et al., 2024).



**Figura 46: Características histopatológicas do tumor de células C6.** O glioma C6 é composto por enorme acúmulo de massa de células C6 com características típicas do glioblastoma multiforme, com alta celularidade **(A)**, regiões de invasão do parênquima cerebral **(B)**, presença de focos necróticos em pseudopaliçada **(N e P em C)**, células com núcleos variando de redondo a oblongo, com padrão de crescimento em espinha de peixe **(A e D)**, células em mitose e microvasos **(asteriscos em A e D)**. Microscopia de luz, coloração H&E, barra de escala de 25  $\mu\text{m}$ .

As análises dos cortes histológicos de camundongos que receberam DOX ou DBK + DOX indicam a presença de DOX no tecido cerebral dos animais controle, sem tumor de células C6, sacrificados 24h após injeção de DBK 1  $\mu\text{M}$  (23h da injeção de DOX) **(Figura 47A-L)**, semelhante ao observado por Sikpa e colaboradores (2020), que usaram outra abordagem para manipulação da ativação dos receptores de cininas. No tecido de animal controle, sem tumor, sem DBK e sem DOX, não observamos sinal de fluorescência na emissão da molécula de DOX (546 nm) **(Figura 47A e B)**. No tecido cerebral de camundongos controle, sem tumor C6 e sem injeção DBK, mas com administração de DOX, observamos marcação no parênquima **(Figura 47C e D)**, a qual se torna mais intensa quando houve a administração de DBK 1  $\mu\text{M}$  antes da DOX **(Figura 47E e F)**.



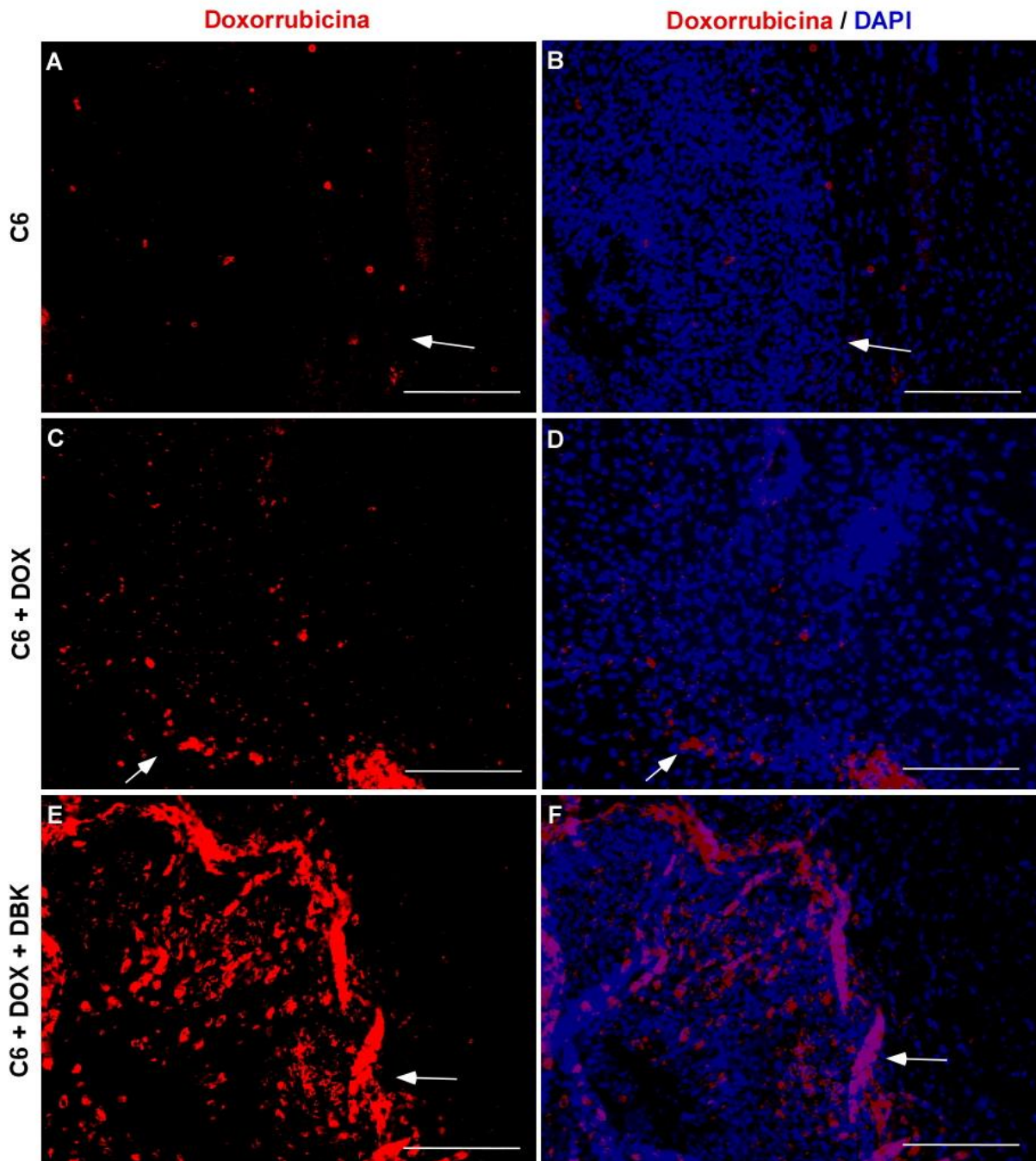


**Figura 47: A administração de DBK aumenta a biodisponibilidade de quimioterápico DOX no parênquima cerebral.** No tecido cerebral de camundongos controle não foi detectada fluorescência na emissão 546 nm (**A e B**). Em cérebro de camundongos que receberam somente DOX há pouca presença de fluorescência (**C e D**). Já em tecido de animais que receberam DBK 1  $\mu$ M 1h antes da administração de DOX e 24h antes do sacrifício, é clara a presença da fluorescência de moléculas do quimioterápico DOX (**E e F**). Microscopia óptica de fluorescência, barra de escala de 150  $\mu$ m. Número de animais em cada condição = 5.

As análises qualitativas dos cortes histológicos do tecido cerebral dos animais que foram inoculados com células C6 indicam presença de DOX na região do tumor e na área peritumoral (**seta Figuras 48C-E**).

No tecido cerebral dos animais que receberam DBK  $\mu\text{M}$ , 1 h antes da injeção de DOX, a presença de DOX também está presente e, em todos os cortes analisados, em intensidade maior na área do tumor que aquela observada na condição DOX sem DBK (**Figura 48E e F**); neste caso também observamos uma forte marcação na região peritumoral, indicada pela seta nas imagens.

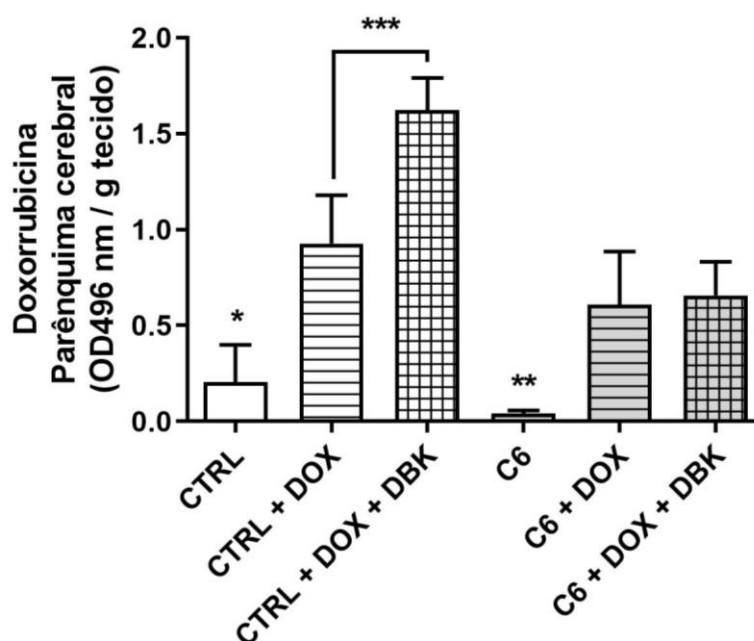
Na condição controle dos animais inoculados com célula C6 observamos a ausência de marcação em emissão 546 nm (**Figura 48A e B**), indicando a especificidade da marcação para a doxorubicina. A seta das figuras indica a região peritumoral. Note a região do tumor com maior densidade nuclear (marcação com DAPI), como observado nas colorações com cristal violeta (**Figura 45**) e H&E (**Figura 46**).



**Figura 48:** A administração de DBK aumenta a presença de quimioterápico DOX na massa tumoral de células C6. No tecido cerebral de camundongos com tumor C6 (seta branca nas imagens indica região peritumoral), sem injeção de DOX ou DBK, não foi detectada fluorescência na emissão 546 nm (A e B). Em cérebro de camundongos que receberam somente DOX há presença de fluorescência na área do tumor, principalmente na região peritumoral (C e D). Já em tecido de animais que receberam DBK 1  $\mu$ M 1h antes da administração de DOX e 24h antes do sacrifício, há um aumento na presença da fluorescência de moléculas do quimioterápico DOX (E e F). Microscopia óptica de fluorescência, barra de escala de 150  $\mu$ m. Número de animais em cada condição: n=3.

A dosagem de DOX no cérebro de animais controle, sem tumor de C6, indicam uma presença maior do quimioterápico DOX no tecido quando foi

administrado DBK 1  $\mu$ M (**Figura 49**). Em animais com tumor C6 não foi observada diferença significativa entre os animais que receberam DBK antes da DOX e os que não receberam (**Figura 49**). A presença de DBK não parece interferir na passagem de DOX pela barreira quando há a presença da massa tumoral, sugerindo que o tumor de C6 pode aumentar a presença de ZO-1, assim como presenciado em células endoteliais expostas ao MCT98G, mas de forma mais organizada e funcional.



**Figura 49: Análise quantitativa de DOX no parênquima cerebral.** Após 24h de injeção da DBK e 23h da injeção de DOX há presença de quimioterápico no tecido tanto do animal controle, quanto do animal inoculado com células de linhagem C6, com presença maior quando é administrado DBK 1  $\mu$ M antes da injeção do quimioterápico nos animais controle, sem inoculação de células C6. Em animais com tumor C6 não foi observada diferença significativa entre os animais que receberam DBK antes da DOX e os que não receberam. \* $P < 0.05$  CTRL + DOX + DBK versus CTRL + DOX. ANOVA (Teste de Holm-Sidak). Número de experimentos:  $n=3$ .

### 3.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM DBK NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA T98G, U87MG E C6

Considerando os dados apresentados na introdução deste trabalho, que indicam os efeitos dos agonistas de cininas em células de glioblastoma, como em Nicoletti e colaboradores (2014) que observaram respostas das células de linhagens tumorais a 10 nM de DBK, e uma resposta ainda mais significativa a 100 nM de DBK, nos perguntamos se poderia haver algum efeito que não favoreça o combate

tumoral, caso parte da DBK 1  $\mu\text{M}$  administrada não seja totalmente consumida pelas células endoteliais e passe pela BBB durante sua abertura transitória. Para tal, fizemos ensaio de viabilidade celular nas linhagens de glioblastoma T98G, U87MG e C6.

Testamos três concentrações de concentração de TMZ: 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  (LEE et al., 2016; WANG et al., 2016; SONI et al., 2021). Já o quimioterápico DOX foi testado na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (DU et al., 2020).

O ensaio de viabilidade celular de células U87 MG indica tanto a DBK 1  $\mu\text{M}$  quanto a DOX 5  $\mu\text{M}$  não alteram o número de células viáveis, comparado à situação controle (**Figura 50A**). O mesmo é observado nas células C6 (**Figura 50C**). Já na linhagem celular T98G, a DBK não altera o número de células viáveis, mas a DOX sim (**Figura 50B**).

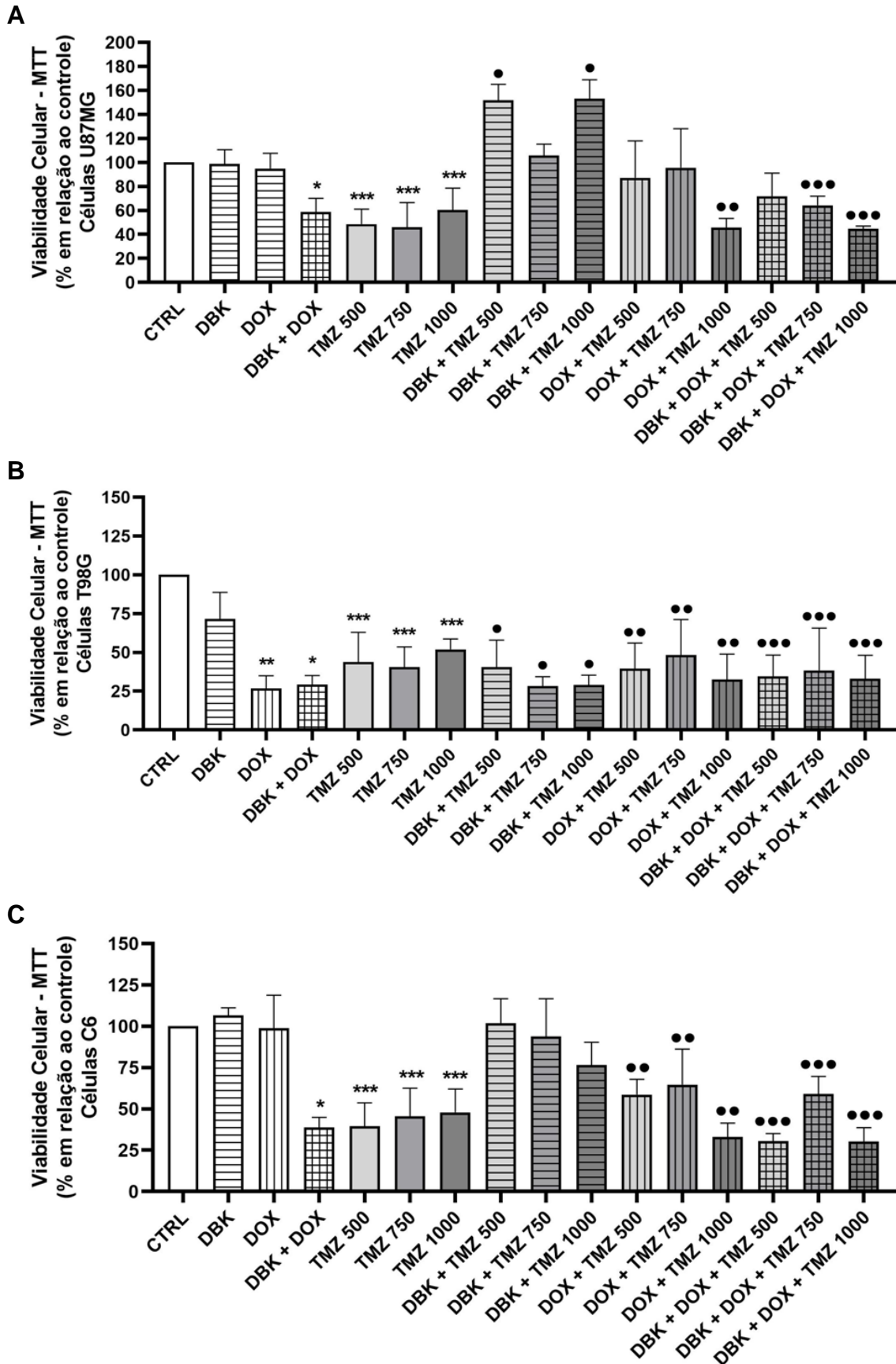
A combinação DBK com DOX diminui significativamente a viabilidade de todas as linhagens celulares estudadas (**Figura 50**).

Todas as doses de TMZ testadas (500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ ) diminuiram a viabilidade celular em relação à condição controle nas três linhagens de glioblastoma estudadas (**Figura 50**).

Na linhagem U87MG houve um aumento na viabilidade celular nas condições DBK + TMZ, nas concentrações 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  do quimioterápico (**Figura 50A**), sendo o oposto observado na linhagem T98G (**Figura 50B**). Já na linhagem C6, a administração simultânea de DBK e TMZ não alterou a viabilidade celular (**Figura 50C**).

Enquanto que nas células U87MG, a combinação DOX e TMZ só diminuiu a viabilidade celular na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  da temozolomida (**Figura 50A**), nas células T98G e C6 o efeito foi observado em todas as concentrações de TMZ testadas (**Figuras 50B e C**).

A combinação DBK + DOX + TMZ diminuiu a viabilidade celular de células da linhagem U87 nas concentrações 750  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  de TMZ (**Figura 50A**). Nas linhagens T98G e C6 o mesmo ocorreu já na concentração 500  $\mu\text{M}$  da TMZ (**Figuras 50B e C**).



**Figura 50: Ensaio de viabilidade celular MTT em linhagens de glioblastoma após exposição à DBK. (A)** DBK 1  $\mu$ M diminui a viabilidade celular em todas as combinações de tratamento a que foram submetidas as células T98G. **(B)** Em células de linhagem U87 a

DBK parece estimular a viabilidade das células quando combinado com temozolomida, podendo até mesmo prejudicar a eficiência deste. Nota-se que a TMZ combinada com DOX e com DOX + DBK não traz qualquer benefício em diminuir ainda mais a viabilidade das células. **(C)** Em nas células tumorais murina de linhagem C6, observamos a eficácia da TMZ em diminuir a viabilidade celular; o quimioterápico DOX parece não fazer efeito, mas sua combinação com DBK diminui a proliferação das células; assim como nas células U87, a combinação de DOX com TMZ e DOX + DBK + TMZ não diminui ainda mais a proliferação dessas **(A)** \*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX; \*\*\*P<0.05 CTRL versus TMZ 500 µM, TMZ 750 µM e TMZ 1000 µM; \*P<0.05 CTRL versus DBK + TMZ 500 µM e DBK + TMZ 1000 µM; \*\*P<0.05 CTRL versus DOX + TMZ 1000 µM; \*\*\*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX + TMZ 750 µM e DBK + DOX + TMZ 1000 µM. **(B)** \*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX; \*\*P<0.05 CTRL versus DOX; \*\*P<0.05 CTRL versus TMZ 500 µM, TMZ 750 µM e TMZ 1000 µM; \*P<0.05 CTRL versus DBK + TMZ 500 µM, DBK + TMZ 750 µM e DBK + TMZ 1000 µM; \*P<0.05 CTRL versus DOX + TMZ 500 µM, DOX + TMZ 750 µM e DOX + TMZ 1000 µM; \*\*\*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX + TMZ 500 µM, DBK + DOX + TMZ 750 µM e DBK + DOX + TMZ 1000 µM. **(C)** \*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX, \*\*P<0.05 CTRL versus TMZ 500 µM, TMZ 750 µM e TMZ 1000 µM; \*P<0.05 CTRL versus DOX + TMZ 500 µM, e DOX + TMZ 1000 µM; \*\*\*P<0.05 CTRL versus DBK + DOX + TMZ 500 µM, DBK + DOX + TMZ 750 µM e DBK + DOX + TMZ 1000 µM. ANOVA (Teste de Holm-Sidak). Número de experimentos: n=4.

#### 4 AUSÊNCIA DE EXPRESSÃO DE CYP2C8, CANDIDATO À EDHF, EM NOSSOS MODELOS EXPERIMENTAIS

Por conta da hiperpolarização independente de NO encontrada nos modelos de aorta (C57BL/6, B<sub>1</sub>KO e TLR4KO) e nos modelos *in vitro* de células endoteliais HBMEC cultivadas, por 24h, em meio condicionado de linhagens de glioblastoma, investigamos se o fator hiperpolarizante seria a citocromo P450 2C (CYP2C8), como descrito em alguns modelos na literatura (FISSLTHALER et al., 1999; FLEMING, 2000).

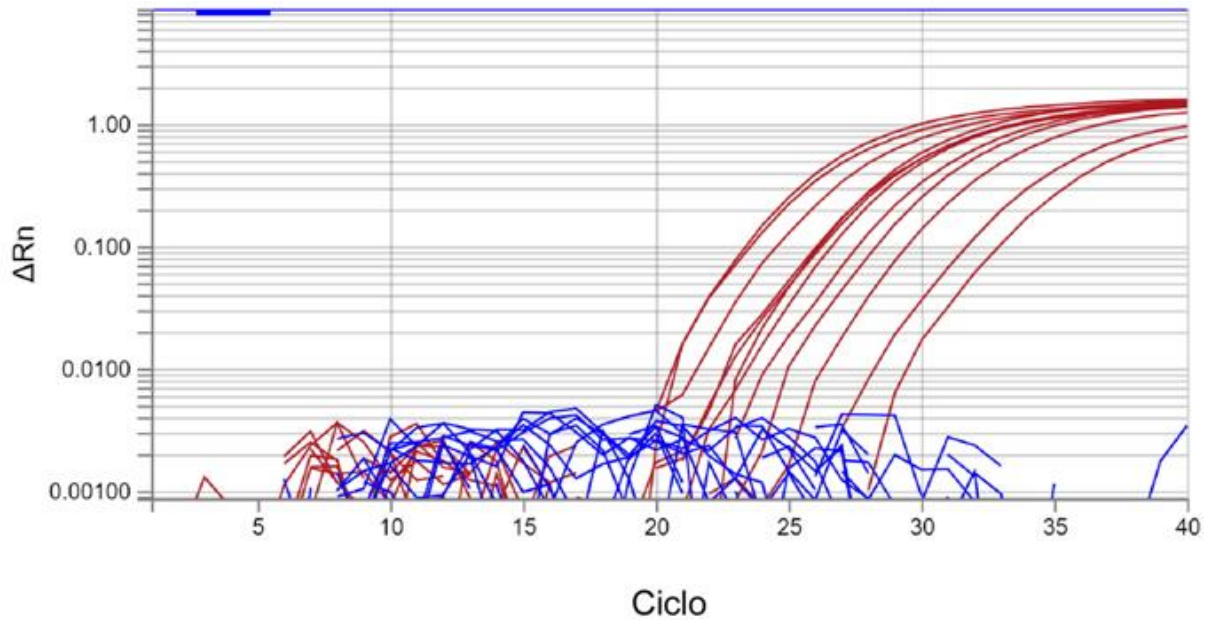
A atividade do NO difere do EDHF, pois enquanto a dilatação dependente do endotélio pelo NO é maior nas grandes artérias, o efeito do EDHF é maior nas pequenas artérias e arteríolas (CAMPBELL & GAUTHIER, 2013; MITSUMIZO et al., 2004). Embora a identificação química e funcional do EDHF varia dependendo do tamanho vascular, leito vascular e espécies, os candidatos incluem metabólitos do citocromo P450, íon potássio, peróxido de hidrogênio, dentre outros (MITSUMIZO et al., 2004).

Tanto em anéis de aorta torácica, controle e tratadas com DBK e LPS, **(Figura 51A)** quanto em células endoteliais HBMEC tratadas com DBK e/ou LPS **(Figura 51B)**, não se observou a expressão de citocromo P450 2C8 (MITSUMIZO et al., 2004; HAMID et al., 2020). Na **Figura 43A** há a indicação de que o tratamento

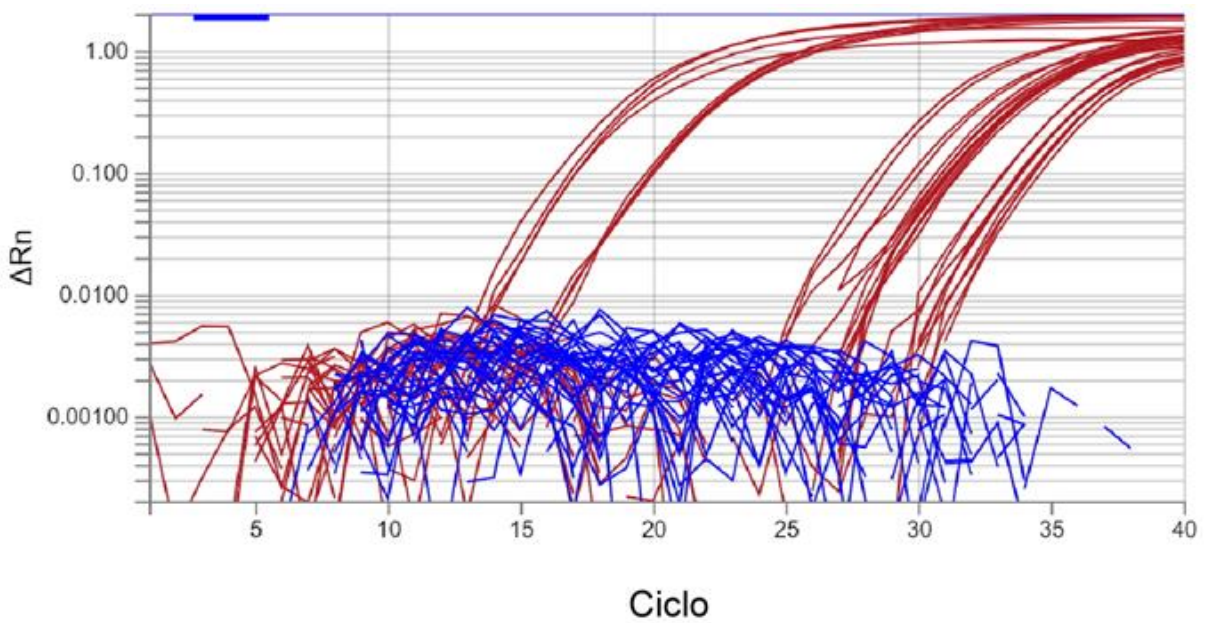
da HBMEC com DBK 1  $\mu\text{M}$  aumentou os níveis de nitrito no meio de cultura, mas sem alterar os níveis de RNAm de eNOS (**Figura 43B**) e iNOS (**Figura 43C**).

Também não foi detectada a presença de RNAm de CYP2C8 em HBMECs tratadas com MCT98 (**Figura 51C**) e MCU87 (**Figura 51D**) com ou sem DBK 1  $\mu\text{M}$ .

**A**



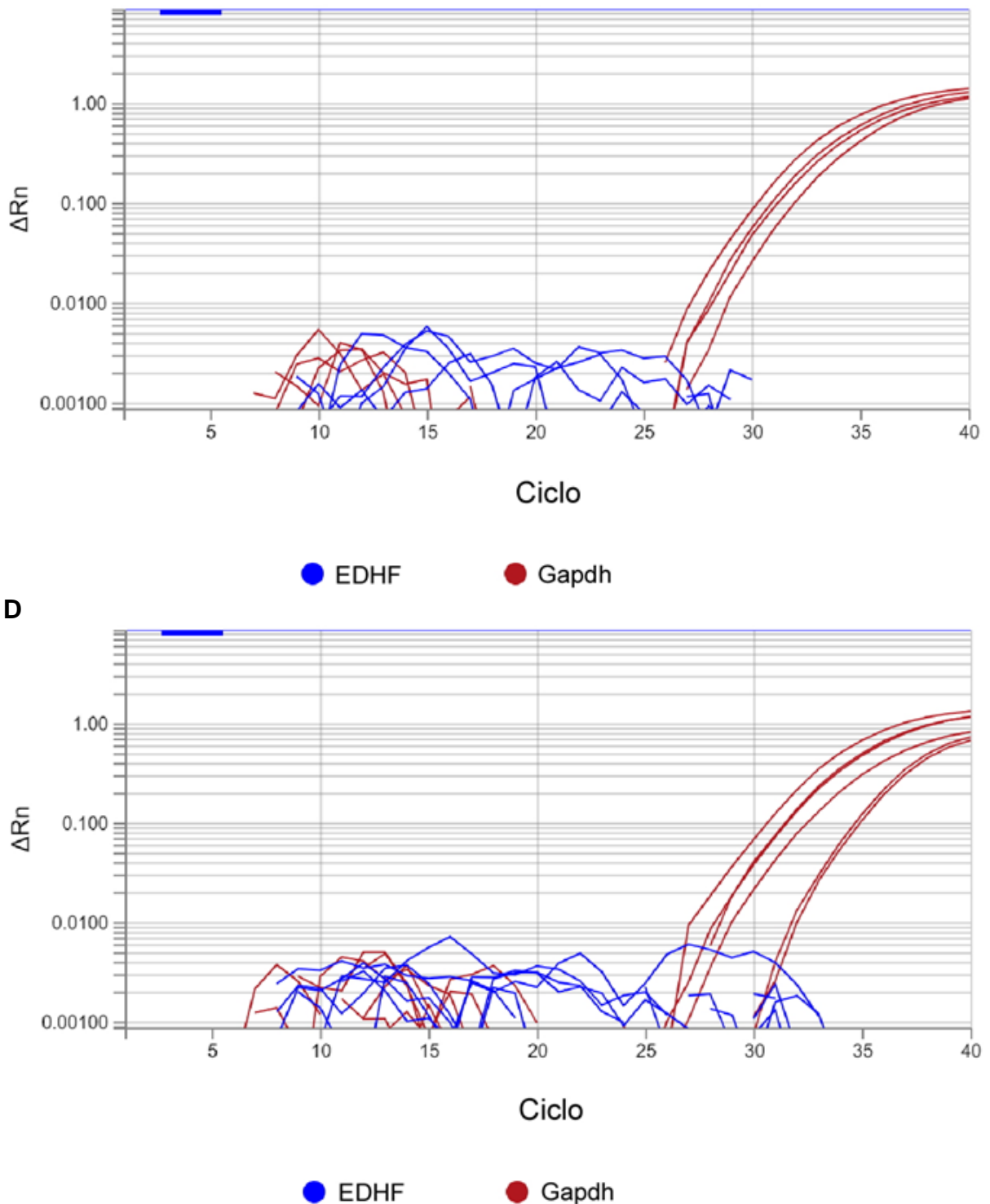
**B**



**C**

● EDHF ● Gapdh





**Figura 51: Gráfico de amplificação de RNAm de CYP2C8 em aorta torácica de camundongos C57BL/6 WT e em HBMEC.** Tanto em anéis de aorta torácica, controle e tratadas com DBK e LPS (A) quanto em células endoteliais HBMEC tratadas com DBK e/ou LPS (B), não se observou a expressão de citocromo P450 2C8. (B) RNAm de anéis de aorta torácica de camundongos C57BL/6 controle e tratadas com DBK e LPS, consecutivamente. Também não foi detectada a presença de RNAm de CYP2C8 em HBMECs tratadas com MCT98 (C) e MCU87 (D) com ou sem DBK 1  $\mu$ M.  $\Delta Rn$  (delta Rn) é a magnitude do sinal gerado por um determinado conjunto de condições da PCR. Número de experimentos: n = 3 (A e B) e n = 2 (C e D).

O motivo da ausência de sinal para CYP2C8 em nossas amostras pode ser porque a expressão dessas enzimas (RNAm e proteína) diminui rapidamente após o isolamento celular, o que significa que para avaliar as consequências do CYP2C é necessário a sua ativação farmacológica (MICHAELIS et al., 2005).

## DISCUSSÃO

### 1 INTERAÇÃO TLR4-B1R COMO MECANISMO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Até o presente momento não foram encontrados dados na literatura que indiquem a existência de uma interação física entre B1R e TLR4, mas tanto resultados encontrados na literatura quanto nossas análises no banco de dados STRING demonstraram uma relevante associação indireta entre funções biológicas das duas proteínas, B1R e TLR4, através do cininogênio 1, precursor da bracinina, que tem em sua quebra a origem do peptídeo ativo DBK (REGOLI & BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992; MARCEAU et al., 1998).

Essa associação indireta nos levou a um ensaio de ancoragem proteína-proteína utilizando o servidor ClusPro (KOZAKOV et al., 2017).

A triagem virtual por ancoragem é uma técnica computacional que permite identificar quais estruturas apresentam maior chance de se ligarem a um determinado alvo molecular. A ancoragem molecular, ou docking molecular, é uma ferramenta importante para predizer a melhor orientação de ajuste de um ligante a um receptor, para a formação de um complexo estável. Neste processo, os programas vão analisar a melhor posição, orientação do ligante dentro dos sítios de ligação e avaliar a afinidade dessa ligação (KOZAKOV et al., 2013; KOZAKOV et al., 2017). Como o objetivo não é analisar as particularidades da interação como, por exemplo, qual resíduo está interagindo e em qual posição, análises mais aprofundadas a serem feitas no programa PyMOL não foram realizadas (KOZAKOV et al., 2017).

Para aprofundar o conhecimento sobre a possível relação entre B1R e TLR4 optamos por estudar o efeito direto do peptídeo DBK e do LPS nas células endoteliais mediante o modelo de vasos de resistência. Nas décadas passadas, a dificuldade na obtenção de anticorpos eficientes para discriminar o C-terminal da estrutura das cininas limitou a capacidade analítica pelas técnicas de imunohistoquímicas, deixando as técnicas de eletrofisiologia como as mais indicadas para o estudo da via das cininas (MARCEAU et al., 1998; WHALLEY et al., 2012).

Estudos anteriores acerca dos mecanismos responsáveis pela hiperpolarização de membrana induzida por DBK e LPS presentes em células endoteliais foram realizados em artérias ou órgãos isolados de animais tratados ou nocautes, pelas análises intracelulares do potencial das células musculares lisas através do empalamento de microeletrodos do lado adventício dos anéis de artérias mesentéricas ou torácicas superiores.

A ativação de respostas a agonistas fisiológicos e a estímulos de estresse nas células endoteliais está intimamente relacionada com as vias de sinalização intracelular, incluindo a síntese e liberação de mediadores da inflamação, indução da molécula de adesão e o citoesqueleto de actina, que governa a motilidade e a permeabilidade (TANG et al., 2018). Essas disfunções endoteliais podem causar danos à integridade endotelial e patologias cardiovasculares, como arterosclerose, hipertensão dentre outros (TANG et al., 2018). Estudos na vasculatura de diversas espécies animais e diferentes linhagens de ratos e camundongos, incluindo animais geneticamente modificados, são de extrema importância para ajudar a compreender o papel desses estímulos nas células endoteliais.

Os estudos das vias das cininas indicam que, embora a presença constitutiva de B1R seja demonstrada no músculo liso da aorta de rato Wistar (SCHAEFFER et al., 2001), na qual o estímulo do referido receptor pelo seu agonista altera as respostas fisiológicas dos anéis de aorta, o mesmo não ocorre em ratos da linhagem Sprague Dawley (BATISTA et al., 2022) e em camundongos C57BL/6, como demonstrado neste estudo com foco no potencial de membrana. Assim como nos ratos SD (BATISTA et al., 2022), em aortas de camundongos C57BL/6 identificamos a presença de RNAm de B1R, mas este receptor mostra-se sem atividade, pois não há alteração do potencial de repouso após o estímulo do anel de aorta com o seu agonista DBK.

Apesar de normotensos, os anéis de aorta torácica de camundongos nocautes para o receptor TLR4 comportam-se como as de modelos animais hipertensos (PESQUERO et al., 1996; FARIAS et al., 2005), devido essa hiperpolarização imediata após incubação com DBK. Um modelo animal que se comporta de modo semelhante é o de Merino e colaboradores (2008), um rato normotenso que superexpressa B1R nos endotélios de vasos (TGR(Tie2B<sub>1</sub>))

(BATISTA et al., 2022). Quando voltamos nossas análises para o RNAm, observamos a presença de RNAm de B1R nas aortas de TLR4KO em mesmo nível de expressão do observado no modelo C57BL/6, mas com a diferença de que os receptores estão ativos na membrana das células endoteliais. Felipe e colaboradores (2007) apontam, em estudos de medida isométrica, que aortas torácicas isoladas de camundongos C57BL/6 revelaram uma baixa responsividade aos agonistas BK e DBK e o mesmo não foi observado em aorta abdominal. Os dados apresentados de eletrofisiologia convergem com esses dados de contração. Podemos sugerir que, na ausência de TLR4, as células endoteliais apresentam uma compensação na via inflamatória, induzindo a presença ativa dos receptores B<sub>1</sub> na condição de repouso.

Curiosamente, a retirada de B1R tornou a aorta responsiva à DBK via B2R. Pela análise de RNAm confirmamos a ausência de receptor B<sub>1</sub> de cininas, o que também foi confirmado por eletrofisiologia, quando incubamos os anéis com o agonista farmacológico de B1R, o R838. Essa atividade da DBK observada na ausência de B1R encontra argumentos em Leeb-Lundberg e colaboradores (2005) e Levy e colaboradores (2017), onde há indicação de que a des-Arg<sup>9</sup>-BK apresenta uma maior seletividade ao receptor B<sub>1</sub> sobre B2R, mas, na ausência de B1R, a DBK liga-se ao B2R para dar início ao processo de sinalização e hiperpolarização da membrana, provavelmente por conta da grande similaridade entre os sítios de ligação desses receptores (ZHANG et al., 2012). O mesmo comportamento não ocorre com a bradicinina, que não tem sua resposta mediada por B1R mesmo na ausência de B2R (JEAN et al., 2016). A literatura indica que há informação cruzada entre B1R e B2R, com evidências de que a estimulação persistente de B2R pode resultar na regulação positiva de B1R (DA COSTA et al., 2014). Estudo com o rato transgênico TGR(Tie2B<sub>1</sub>) mostra que a super expressão e atividade de B1R regula a expressão de B2R, a baixa expressão de um receptor deve ocorrer quando há a superexpressão do outro, mas a falta de um receptor de cinina é compensada pela regulação ascendente do outro subtipo (RODRIGUES et al., 2013). Nas linhagens escolhidas para este estudo não houve alteração na expressão de RNAm de B1R e de B2R quando comparamos anéis de aorta antes e após a eletrofisiologia, indicando que a resposta destes não interfere na transcrição gênica.

A relação entre as respostas LPS, agonista de TLR4, e a ativação das cininas é demonstrada em vários modelos (REGOLI et al., 1981; BOUTHILLIER et al., 1987; FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2005). Esses estudos demonstraram que tiras de grandes artérias e veias, obtidas de coelhos e ratos, tratadas com LPS, apresentaram respostas contráteis via agonistas seletivos do receptor B<sub>1</sub>, DBK e Lys-DBK. Estas evidências indicaram que estímulos infecciosos, além das respostas ao trauma, foram capazes de promover regulação positiva de B1R e uma resposta variável de B2R (DAGNINO et al., 2020). A indução vascular de B1R após o tratamento *in vivo* com LPS já foi mostrada em camundongos, ratos, coelhos, porcos e primatas não humanos (SABOURIN et al., 2001). Em nossos ensaios de eletrofisiologia vimos que o LPS estimula a hiperpolarização das aortas torácicas de C57BL/6 e de B<sub>1</sub>KO, assim como observado em modelos de ratos SHR (FARIAS et al., 2004), SD e TGR(Tie2B<sub>1</sub>) (BATISTA et al, 2022), além de corroborar com dados observados em outras linhas experimentais por Pesquero e colaboradores (2000).

Foi relatado que após o tratamento com LPS, B1R e B2R foram regulados positivamente e que o RNAm de B2R foi aumentado ainda mais em B<sub>1</sub>KO durante a fase aguda (RODRIGUES et al., 2013). Neste presente estudo, indicamos a importância da atividade do receptor TLR4 nessa triangulação para a resposta inflamatória, pois o LPS não atuaria diretamente na ativação e expressão dos receptores B1R, mas sim induzindo outros mediadores inflamatórios que modulam a expressão do receptor B<sub>1</sub> de cininas (SABOURIN et al., 2001).

A resposta de B1R é caracterizada pelo acentuado fluxo de Ca<sup>2+</sup> (LEVY et al., 2017), o que ocorre em aortas de C57BL/6 quando houve o tratamento do vaso com a thapsigargina antes da incubação dessas com a DBK. Inibir o fluxo de Ca<sup>2+</sup> inibe a resposta da DBK em aortas de C57BL/6 e de TLR4KO, mas não de B<sub>1</sub>KO, indicando que essa resposta, que vimos ser via B2R, não sofre interferência de cálcio. Já a hiperpolarização causada pelo LPS apresentou relação com a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular nas aortas de C57BL/6, mas não de B<sub>1</sub>KO. Podemos relacionar essa diferença em relação a não haver aumento de polarização ou diferentes respostas à IBTX (bloqueador de canais K<sub>Ca</sub>), entre C57BL/6, os transgênicos estudos e outros modelos da literatura à informação de que animais C57BL/6 apresentam alterações imunológicas e inflamatórias quando comparadas a outras linhagens de

camundongos e modelos animais de pesquisa (RUSSELL & WATTS, 2000; BRYANT, 2011; ULLAND et al., 2016; SONG & HWANG, 2017). Os camundongos C57BL/6 pertencem à linhagem cosanguínea mais utilizada em pesquisas, tendo sua origem os camundongos C57BL/6J, criados pelo Laboratório Jackson na década de 1920. Essas colônias de camundongos são geneticamente idênticas dentro de cada cepa, tornando-as livres de diferenças genéticas que podem afetar os resultados da pesquisa, visto que as linhagens de camundongos endogâmicos exibem um alto grau de uniformidade em suas características herdadas, ou fenótipos, que incluem aparência, comportamento e resposta a tratamentos experimentais (MEKADA et al., 2009; BRYANT, 2011).

Canais de  $K^+$  fazem parte da cascata de sinalização LPS/ TLR4, juntamente com o aumento do influxo de cálcio (SEYDEL et al., 2001; QU et al., 2017; SCHAPPE et al., 2018). O bloqueio de dois tipos de canais de  $K^+$  ( $K_{Ca}$  e  $K_{ATP}$ ) presentes nas células endoteliais de aortas torácicas de camundongos C57BL/6 apresentaram respostas que corroboram com dados da literatura, porém nos camundongos  $B_1KO$  o bloqueio desses não altera a resposta da membrana ao LPS. Podemos imaginar que a inibição da hiperpolarização causada pelo LPS não seja porque os canais de potássio foram bloqueados, mas sim porque a atividade desses interfere na atividade de  $B1R$ ; a inibição da resposta de  $B1R$  poderia estimular a inibição da hiperpolarização promovida pelo LPS, uma resposta  $K^+/B1R$  dependente (CHEN et al., 2000).

Nos experimentos com aortas submetidas à eletrofisiologia, a presença de NO e sua atividade foi observada pela substituição do substrato L-arginina por um análogo (no caso, L-NNA) sendo a ausência do efeito pesquisado imputado pela não formação de NO devido ao bloqueio da reação da L-arginina à L-citrulina (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Os dados de L-NNA no potencial de membrana em aorta torácica de camundongos C57BL/6,  $B_1KO$  e TLR4KO divergem dos dados da literatura em outros modelos animais tanto em relação à DBK quanto ao LPS (FARIAS et al., 2002; FARIAS et al., 2004; PANARO et al., 2010; STARK et al., 2018). A L-NNA não inibiu a hiperpolarização promovida pelo LPS e pela DBK, mesmo resultado obtido em aortas torácicas de ratos TGR(Tie2 $B_1$ ) (BATISTA et al., 2022), mostrando a independência de NO na hiperpolarização da membrana dessas linhagens de camundongos. Loiola e colaboradores (2011) observaram que a

deleção de B1R prejudica a vasodilatação mediada pelo endotélio, reduzindo a biodisponibilidade de NO; seus resultados em aorta mesentérica reforçam nossos resultados de ausência de envolvimento de NOS na hiperpolarização de aorta torácica no mesmo modelo animal.

Há indícios de que ambos os receptores de cininas podem influenciar diretamente a atividade enzimática das isoformas de NOS, regulando a produção endotelial de NO (MICHEL, 1999; LOIOLA et al., 2011), o que não se mostrou verdade nos modelos animais estudados e nem em dados já publicados (MCLEAN et al., 1999; BATISTA et al., 2022). Durante o processo inflamatório, a liberação de cininas resulta em vasodilatação impulsionada pela ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, hipotensão que parece ser induzida por NO e que foi ligada a mudanças tanto nas vias de NO induzível quanto na constitutiva (CAYLA et al., 2007).

Nesses casos, a literatura sugere a hiperpolarização através do o fator hiperpolarizante derivado do endotélio ou EDHF, um fator independente de NO que exerce hiperpolarização dependente de endotélio e das células do músculo liso vascular (OZKOR & QUYYUMI, 2011; VELAZQUEZ & WANG, 2014). Em artérias, o NO seria o vasodilatador predominante derivado do endotélio, mas teria contribuição relativamente menos proeminente nos vasos de menor calibre, onde o EDHF parece predominar (OZKOR & QUYYUMI, 2011).

Os dados de eletrofisiologia e de biologia molecular nos levou a questionar qual seria o padrão de marcação de B1R e TLR4 nas células endoteliais e se há proximidade entre eles na membrana celular. Com a indicação na literatura mais recente de artigos com dados de marcação de imunohistoquímica e citoquímica com anticorpos para receptores de cininas, buscamos fazer as análises desejadas. A marcação de TLR4 encontrada nesses anéis de artéria aorta torácica de C57BL/6 WT é compatível com a apresentada por Chiao e colaboradores (2013), em mesmo modelo animal, apresentando marcação na camada endotelial e da musculatura lisa. Essa marcação pode ser intensificada nas células endoteliais em região de inflamação local da vasculatura (QU et al., 2020). Já a marcação de B1R aparece na camada endotelial quando esta é exposta a DBK e LPS, o que é semelhante ao observado em modelo de ratos SD, onde a ausência de marcação é revertida após estímulo farmacológico para indução de inflamação (HADDAD & COUTURE, 2017).



Assim que o LPS reconhece TLR4 há o reconhecimento de dímeros de TLR4 na membrana da superfície celular ou na membrana de endossomos (KIM et al., 2007; FIRMAL et al., 2020; ZAMYATINA & HEINE, 2020; ABOUDOUNYA & HEADS, 2021; GENG et al., 2021; PAPADAKOS et al., 2023). O mesmo comportamento já foi descrito para os receptores B<sub>2</sub> de cininas, que é rapidamente desensibilizado/internalizado através de sua fosforilação após ligação do ligante (GUEVARA-LORA, 2012; SCHARFSTEIN et al., 2013); esta resposta é transitória com rápida reciclagem dos receptores (ENQUIST et al., 2014). Por outro lado, B1R tem a internalização espontânea e tem como alvo uma via de degradação; seu agonista impede, mas não inibe esse processo (ENQUIST et al., 2014).

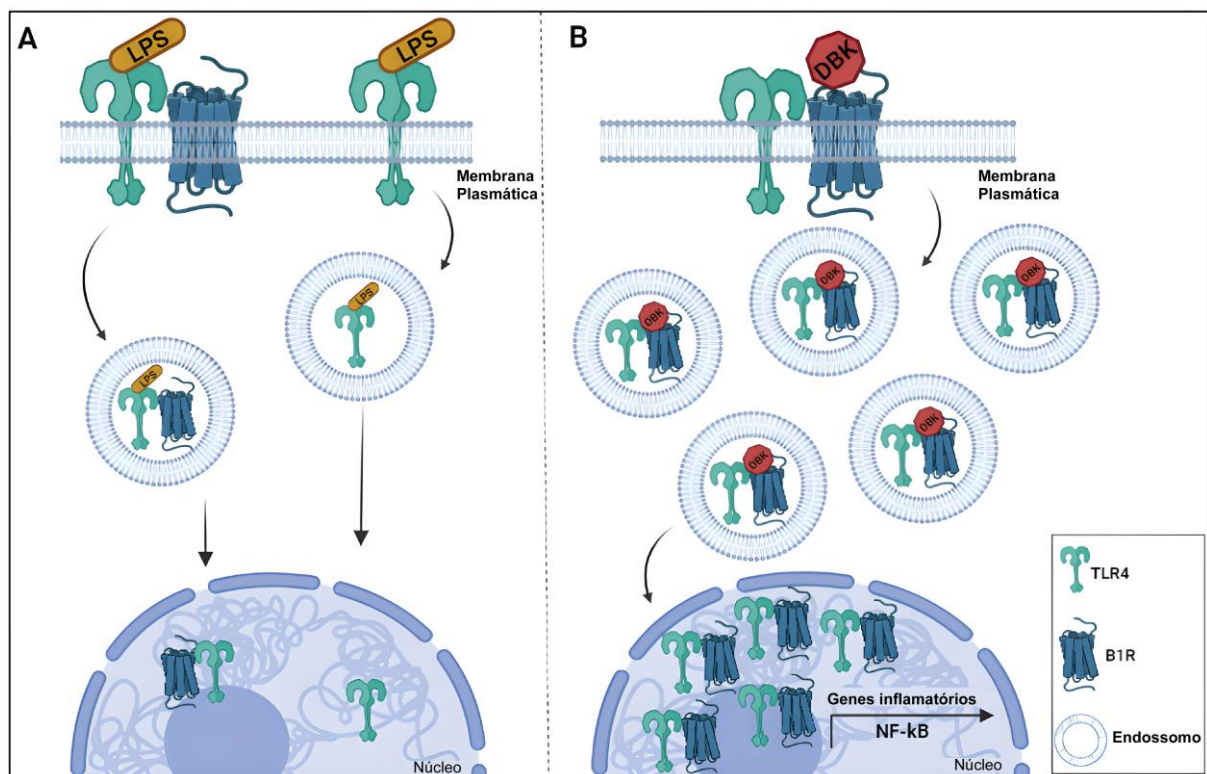
Nossos resultados do padrão de marcação de B1R e TLR4 observado indicam que essas estão na região perinuclear após tratamento das células com DBK e LPS. A análise com reconstrução 3D e cortes ortogonais de HBMEC indica a translocação desses receptores para o núcleo. Esse resultado é descrito como uma via não-canônica de TLR4 (DUZENDORFER et al., 2004; MORETTI et al., 2021). Receptores B<sub>2</sub> de cininas já foram encontrados em núcleos de alguns tipos celulares, como neurônios hipocâmpais, mas ainda sem descrição do mesmo comportamento de B1R (ARGAÑARAZ et al., 2004). Bawolak e colaboradores (2009), que utilizando sondas fluorescentes observou marcações pontilhadas que muitas vezes ficavam abaixo do plano da membrana plasmática e estaria possivelmente localizadas em cavéolas, que são invaginações na membrana plasmática, composta por lipídeos, ricas em colesterol e esfingolipídios, presentes em quase todos os tipos de células e em todos os mamíferos, as cavéolas são abundantes em adipócitos, células musculares e tecidos endoteliais, podendo ser induzidas a se destacar, servindo como vesículas de transporte endocítico para transportar carga até os endossomos primários.

A proximidade entre os receptores é intensificada quando há o tratamento das células HBMEC com DBK, o que foi observado pelo PLA, comportamento que diminui na presença de LPS. Esses padrões de proximidade se encontram em região nuclear, o que pode indicar que a translocação desses receptores pode estar relacionada, ocorrendo simultaneamente em via não-canônica desses. Camundongos com deleção do gene para receptor B<sub>1</sub> de cininas (B<sub>1</sub>KO) apresentam resposta atenuada à injeção de LPS (PESQUERO et al., 2000). Na camada

endotelial, de anéis de aorta torácica com inflamação local, há interação por proximidade de TLR4 com MyD88 (QU et al., 2020), o que nos leva a sugerir que B1R estaria envolvido nessa relação.

Passos e colaboradores (2004) sugerem que o LPS se ligaria a TLR4 e daí haveria a modulação para expressão de B1R e a resposta da DBK, mas nossos dados apontam para uma relação ainda mais expressiva entre os receptores quando há a interação da DBK ao B1R e que esta interação promove a o transporte desses para a região perinuclear e, até mesmo, translocação nuclear de ambos, ativando uma resposta via NF- $\kappa$ B (**Figura 52**). Ademais, em células HBMEC em cultura observamos marcação para B1R na situação controle, mas esses receptores podem estar inativados.

Os potenciais farmacológicos desses receptores individualmente já são alvo da literatura, como por exemplo, novos estudos que apontam relevância tanto de B1R quanto de TLR4 para as inflamações causadas por Sars-CoV-2 (FONTES-DANTAS et al., 2023; SRIRAMULA et al., 2023) e estudar o controle da ação da dupla pode ser um caminho de potencial terapêutico.



**Figura 52: Hipótese para resposta celular à interação entre B1R e TLR4.** A ativação de B1R pelo peptídeo DBK leva a uma interação com TLR4, resultando na internalização. A ativação de TLR4 pelo LPS (A) e a ativação de B1R pelo peptídeo DBK (B), não ocorrendo

simultaneamente, levaria a uma interação entre os receptores. Esta interação é mais pronunciada quando o B1R é ativado por DBK. A ativação desses receptores desencadeia a internalização do complexo receptor-receptor pelas cavéolas e endossomos. Essas estruturas desencadeiam uma cascata de sinalização que estimula a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, regulando a expressão de fatores inflamatórios, como as citocinas. Os receptores TLR4 e B1R internalizados devem ser expelidos no núcleo para degradação nos lisossomos.

## **2 MODULAÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA PELA DES-ARG<sup>9</sup>-BK EM CONDIÇÕES NORMAIS E EM AMBIENTE TUMORAL DE GLIOBLASTOMA**

Diversos estudos presentes na literatura destacam a necessidade de otimizar e definir alvos terapêuticos tumorais que rompam a BHE, para aumentar a eficácia das drogas no SNC, e que haja o mínimo de efeito colateral. Combinar estratégias para melhorar a penetração dos agentes antitumorais e agentes farmacológicos que alterem de modo transitório a BHE/BTB pode melhorar os resultados dos tratamentos.

A barreira hematoencefálica é uma barreira entre a circulação sanguínea e o parênquima cerebral, proporcionando proteção anatômica e fisiológica ao SNC, fornecendo nutrientes ao tecido cerebral, filtrando compostos nocivos do cérebro de volta à corrente sanguínea e protegendo o cérebro de substâncias tóxicas no sangue (JIA et al., 2014). A BBB consiste em quatro elementos celulares primários: células endoteliais cerebrais, pés terminais de astrócitos, microgliais e pericitos (JIA et al., 2014).

Mesmo com uma composição química que visa suprir as necessidades metabólicas de determinados tipos celulares, os meios de cultivo celular são comumente suplementados com soro, pois as células em cultura também necessitam de macromoléculas, proteínas, lipídeos e inibidores que podem ser supridos por esse fluido animal (ALVES et al., 2010). O soro fetal bovino (SFB) é comumente utilizado como um suplemento universal, que permite o crescimento de várias linhagens de células de mamíferos, proporcionando propriedades biológicas de adesão e proliferação celular, além de protegê-las do estresse causado por esse cisalhamento (TAPPARO, 2008). Em meio sem soro há diminuição da taxa de crescimento e produtividade (SINACORE et al., 2000). Avaliamos qual seria o

melhor controle experimental das células HBMEC sem que os resultados encontrados naquelas expostas aos meios condicionados de glioblastoma (MCT98G e MCU87). Foi determinado o meio de cultura DMEM/F-12 com soro como controle experimental, lembrando também que este é a base dos meios condicionados obtidos dos glioblastomas.

As células endoteliais que revestem os capilares cerebrais são células finas e planas interligadas por junções ocludentes (JIA et al., 2014). A maioria dos microvasos de glioblastoma apresenta alterações nas moléculas que compõem a BHE (LIEBNER et al., 2000). A ruptura das proteínas juncionais é dependente da atividade de cinases, que são implicadas na regulação negativa da função de barreira endotelial e que podem exercer seus efeitos por meio da fosforilação e da dissociação subsequente de caderinas e ZO-1 (GILLRIE et al., 2007). A análise de ZO-1, proteína que compõe a BHE indica que o MCT98G aumentou tanto a incidência de marcação quanto do RNAm, mas esta pode não ser funcional. Tanto células controle, cultivada em DMEM/F-12, quanto em MCT98G a adição de DBK 1  $\mu$ M nos meios reduziu a intensidade de marcação para ZO-1, indicando alteração na barreira hematoencefálica. A ativação de B1R pela DBK altera os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular, o que promove a reorganização da actina (PRASAIN & STEVENS, 2009) e assim, de proteína de junção endotelial, como ZO-1. Quando as junções ocludentes são interrompidas, podem aparecer lacunas no endotélio, resultando em aumento da permeabilidade vascular (GILLRIE et al., 2007). Essa aparente diminuição em ZO-1 pode resultar em desorganização das junções endoteliais e da BHE ou um rearranjo que pode proteger a BHE de passagens de substâncias nocivas ao parênquima cerebral ou mesmo de moléculas farmacológicas. Wang e colaboradores (2020) indicaram em modelo de isquemia que houve diminuição na expressão de claudina-5, mas que esta não aumentou a permeabilidade da BHE.

Em MCT998G houve também o aumento de RNAm de claudina-5, mas não de GLUT-1, outras proteínas componentes da BHE. Claudina-5 é uma proteína transmembrana que pode regular a permeabilidade paracelular de moléculas pequenas (JIA et al., 2014), que parece não ser regulada negativamente na maioria dos microvasos tumorais (LIEBNER et al., 2000). Em condições normais, o transportador GLUT-1 na membrana plasmática das células endoteliais está presente e pode estar presente em altas concentrações em células tumorais

(JENSEN & CHKHEIDZE, 2011), como tumores cerebrais, onde sua expressão é independente da permeabilidade vascular (JENSEN & CHKHEIDZE, 2011). A não variação na expressão de GLUT-1 pode ser um mecanismo de proteção das células endoteliais para que não ocorra um aumento de passagem de nas taxas de glicose para a massa tumoral (PATCHING et al., 2017).

Uma estratégia experimental não-invasiva testada na literatura para modular a abertura da BHE é a injeção sistêmica de agentes vasoativos, como as cininas (CÔTÉ et al., 2013). Já foi relatado que o B1R é superexpresso em linhagens murina e humana, incluindo células LN229, T98G, U118, U138 e U87MG, de forma similar aos níveis observados em todos os graus de pacientes com glioma, mas não no cérebro normal (CÔTÉ et al., 2012). A exposição de células endoteliais aos meios condicionados das linhagens T98G e U87MG de glioblastoma não causaram alteração no padrão de expressão de B1R, mesmo após adição de DBK 1  $\mu$ M a esses. Considerando os dados da primeira parte deste trabalho, onde apontamos a relação entre B1R e TLR4, também observamos o comportamento do receptor do tipo toll nas células endoteliais tratadas com os relatados meios condicionados. Aqui foi observado o aumento de TLR4 nas células expostas ao MCU87 com DBK e diminuição naquelas tratadas com MCT98 com adição de DBK. Curiosamente, ao contrário do aumento de pontos de proximidade entre B1R e TLR4 na presença de DBK  $\mu$ M em células HBMECs cultivadas em DMEM/F-12, há diminuição desses quando a DBK foi adicionada nos meios condicionados. Podemos constatar que a variação na presença de B1R ou TLR4, para mais ou para menos, diminui a quantidade de pontos de proximidade entre esses receptores, visto que em DMEM/F-12 + DBK + LPS houve diminuição de B1R, levando a diminuição de pontos de ligação por proximidade e em HBMECs tratadas com MCT98G + DBK houve diminuição de TLR4 e em MCU87 + DBK houve aumento de TLR4, ambas as situações com diminuição dos pontos de ligação.

As imagens de imunocitoquímica indicam a presença dos receptores em região perinuclear nas células expostas aos meios condicionados com e sem DBK, assim como nas situações controle. Em células da linhagem U87MG observou-se alta expressão de B1R, que pode aumentar quando há administração de DBK (OLIVEIRA et al., 2018). Fatores pró-inflamatórios liberados no microambiente tumoral desempenham papel crucial no mecanismo de regulação positiva de B1R,

induzindo a expressão de deste no processo de invasão tumoral, um processo caracterizado como crônico (SCHREMMER-DANNINGER et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2018). As linhagens de glioblastoma apresentam diferentes elementos moleculares em seus substratos, que estarão envolvidos na migração e crescimento do tumor (BELOT et al., 2001). A linhagem de células de glioblastoma U87, por exemplo, é sensível ao quimioterápico TMZ, enquanto que a T98G é resistente (LEE, 2016), o que pode causar diferença nos fatores liberados nos substratos e explicar o não comprometimento do crescimento e morfologia das células endoteliais quando expostas ao MCU87 e as alterações morfológicas quando as HBMECs foram expostas ao MCT98G.

A análise da expressão gênica indica aumento de RNAm de B1R em HBMECs tratadas em MCT98G e MCU87, níveis que voltam aos do controle quando há adição da DBK. Como nos resultados da 1ª parte deste trabalho, a ativação dos receptores já presentes na membrana celular já seriam o suficiente para desencadear a resposta inflamatória. Já a análise de RNAm de TLR4 aponta que nas condições de aumento da proteína (MCT98G + DBK e MCU87 + DBK) não houve variação da expressão gênica em relação ao controle. Nas HBMECs tratadas com MCT98 houve aumento de RNAm de TLR4, mas assim como B1R, o aumento de transcrição não refletiu em aumento da tradução.

Nossos dados adicionam informações acerca de TLR4 no contexto tumoral além do conhecido nas células imunes. A ativação de TLRs em células não tumorais é associada à inflamação e progressão do tumor (ALVARADO et al., 2017). TLR4 é antiproliferativo para células GSCs e fornecem um mecanismo ao qual elas persistem no microambiente hostil do glioblastoma (ALVARADO et al., 2017).

Liu e colaboradores (2019) apresentaram dados que suportam que em modelos de glioblastoma em cultura, a bradicinina se liga aos B1R, induzindo via de sinalização relacionada à proliferação e migração do glioblastoma, sendo este um ponto de atenção à administração de agonistas de B2R para modulação da BHE. Liu e colaboradores (2001) atentam que endotélios capilares tanto de cérebro normal quanto de tecido tumoral cerebral não expressam receptor B<sub>2</sub> de cininas, sendo sua presença nas células tumorais uma via de indução da permeabilidade da BHE. Acredita-se que o receptor B<sub>2</sub> seja o principal mediador dos efeitos biológicos das

cininas em condições fisiológicas e durante o estágio agudo do processo inflamatório, enquanto que o receptor B<sub>1</sub> estaria envolvido principalmente na regulação da resposta inflamatória crônica (CALIXTO et al., 2004; LOIOLA et al., 2011). Esta informação vai de encontro aos dados encontrados ao analisarmos os níveis de RNAm deste, onde há um aumento significativo nos meios condicionados de T98G e U87MG nas células HBMEC após 24h de tratamento, sendo que a adição de DBK ao MCT98G mantém os níveis elevados.

O fator de transcrição NF-κB, importante para a indução da expressão gênica durante a inflamação, é um dos mediadores da indução do receptor B<sub>1</sub> (CALIXTO et al., 2004; MERINO et al., 2005; LOIOLA et al., 2011). A estimulação por agentes como o LPS inicia uma cascata de sinalização que faz com que o NF-κB ativo seja translocado ao núcleo e module a transcrição por ligação ao promotor de mediadores pró-inflamatórios (XIAO & GHOSH, 2005; MERINO et al., 2005). Além disso, o NF-κB está associado à proliferação celular, transformação e desenvolvimento de tumor (KARIN et al., 2002), o que indica as cininas como personagens importante no desenvolvimento e progressão tumoral (CALIXTO et al., 2004). Em células 87MG, os níveis de NF-κB foram aumentados após exposição à bradicinina (SUN et al., 2020). Essas ações das citocinas, presentes no microambiente tumoral, não refletiram nas células endoteliais tratadas com os meios condicionados de T98G e U87MG. MCT98G e MCU87, com ou sem adição de DBK, não estimulam a expressão gênica de NF-κB, mas a proteína pode estar ativa, sendo translocada para o núcleo para transcrição gênica de agentes inflamatórios.

A bradicinina, além de atuar nos receptores de cininas aumentando as concentrações intracelulares de Ca<sup>2+</sup> para, assim, abrir junções ocludentes, também parece ativar o NF-κB dos astrócitos, levando à liberação de interleucina-6 (IL-6), que pode amplificar sua ação no endotélio (ABBOTT et al., 2006). A meia vida da BK no plasma é diferente em cada espécie, mas é comumente inferior a um minuto, sendo rapidamente inativada pelo cininases teciduais, como as encontradas no endotélio vascular (MORAIS et al., 1992). Já a meia vida da des-Arg<sup>9</sup>-BK é de 4 a 12 vezes maior do que a da BK sob as mesmas condições experimentais (DÉCARIE et al., 1996), o que nos traz a hipótese de que em condições tumorais a DBK também teria um importante papel na indução da perturbação da BHE e não somente a bradicinina liberada pelas células tumorais.

As junções ocludentes, adesões moleculares e canais iônicos facilitam o influxo e o efluxo de íons, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  (KANE, 2019). A modulação de  $\text{K}_{\text{Ca}}$  pela ativação ou não de B2R promove um aumento da permeabilidade para BHE e BTB (NINGARAJ et al., 2002). Vários dos receptores encontrados no endotélio cerebral e nos astrócitos causam um aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular quando ativados, e a sinalização mediada por este íon é um mecanismo pelo qual as células do SNC se comunicam e modulam a atividade de células adjacentes (ABBOTT et al., 2006). Resultados apresentados na 1ª parte deste trabalho mostra que canais de potássio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) influenciam na resposta das células endoteliais à DBK. Um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode causar alterações em diversas proteínas efetoras do endotélio cerebral através de diversas vias de transdução de sinal, incluindo fosforilação de proteínas do citoesqueleto e abertura de junções ocludentes (ABBOTT et al., 2006). Um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induz a resposta celular de B1R à DBK, estimulando as alterações conformacionais de proteínas que compõem a BHE, como ZO-1.

O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é a etapa inicial na ativação da síntese de óxido nítrico (NOS) (LOIOLA et al., 2011). A eNOS ou Isoforma III é expressa constitutivamente nas células endoteliais, em mecanismo de ação cálcio-dependente, estando envolvida em processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo, controle imediato da pressão arterial (MICHEL, 1999; FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Seu status funcional não está totalmente elucidado, visto que alguns estudos demonstraram uma diminuição na atividade de eNOS e outros um aumento (CAYLA et al., 2007).

A iNOS ou Isoforma II não é expressa constitutivamente, sendo induzida por LPS e citocinas em qualquer célula do organismo, principalmente nos macrófagos, em mecanismo de ação independente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; LOIOLA et al., 2011). Em processos inflamatórios, células endoteliais podem expressar a iNOS através da ação de mediadores inflamatórios, que são reconhecidos como mediadores da indução de B1R (CALIXTO et al., 2004). A atividade da iNOS no endotélio humano inflamado pode ser aumentada de 3 a 5 vezes além de seu nível basal pela sinalização do receptor acoplado à proteína, e evidências acumuladas indicam que a eNOS também pode desempenhar um papel tipo “iNOS” na inflamação, mas os mecanismos não foram



definidos (LOWRY et al., 2013). Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos, como contribuir para resposta à inflamação aguda (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; POBER & SESSA, 2007).

O NO age como molécula central nas vias de sinalização da célula endotelial e contribui para manutenção e homeostase vascular (MICHEL, 1999; LOIOLA et al., 2011). Após ser sintetizado pelas células endoteliais, o NO se difunde para o músculo liso vascular e induz a ativação de enzimas que irão atuar na vasodilatação e na permeabilidade da BHE (JANIGRO et al., 1994; LOIOLA et al., 2011).

O aumento de NO quando adicionado DBK está relacionado à atividade da via dos receptores de cininas (ZHANG et al., 2021). Quando há um aumento da permeabilidade, com redução de ZO-1, há aumento nos níveis de RNAm de cininas e aumento de NOS e NO. Temos, em parte, essa relação na condição controle em relação à adicionada DBK, visto que não observamos alteração nos níveis de RNAm, mas observamos aumento de nitrito, maneira indireta de dosar NO do meio de cultivo celular, e diminuição de ZO-1. A inibição de B1R aplaca a desestabilização das proteínas que compõe da BHE, reduzindo a permeabilidade e atenuando danos indesejados ao cérebro (ZHANG et al., 2021).

Apesar de não ter sido encontrado aumento de RNAm de eNOS e de iNOS em nenhuma situação estudada, houve aumento de nitrito no meio MCT98G após 24h de contato com células HBMEC e diminuição deste quando da adição do peptídeo. Em MCU87 com o sem DBK não foi observada diferença nos níveis de nitrito em relação à condição controle. Vale ressaltar que em GLIOBLASTOMA, o papel do NO ainda não está claro, com dados que indicam efeitos pró e antitumorais, o que pode ser explicado por diferenças nos parâmetros dos estudos analisados, como o estágio da tumorigênese e o nível basal de NO, além do estado de diferenciação das células tumorais (MAZUREK & ROLA, 2021; KRUGLYAKOV et al., 2023). O aumento de nitrito em meio MCT98G que tratou HBMECs por 24h pode indicar que tanto B1R quanto TLR4 estão ativos, estimulando até o aumento na transcrição gênica, mas a presença de DBK inibiu essa resposta via NO e a transcrição desses receptores. Podemos sugerir que a DBK pode estimular as células e a permeabilidade não somente via B1R, mas também via B2R, em

resposta independente de NO, visto que MCT98G e MCT98G + DBK mantiveram a expressão gênica de B2R em HBMEC acima da encontrada na condição controle DMEM/F-12. Níveis de NO estaria relacionado à gradação do tumor de glioblastoma e sua diminuição seria um potencial alvo terapêutico (KRUGLYAKOV et al., 2023).

É importante apontar que, por vezes, não há diminuição dos níveis de NO e sim aumento da biodegradação do NO, reduzindo sua biodisponibilidade (BAHIA et al., 2006). A presença de superóxido na vasculatura determina uma reação rápida com o NO, formando uma espécie reativa de nitrogênio denominada peroxinitrito, sendo essa molécula causadora de dano direto ao DNA celular, além de induzir o desacoplamento da eNOS, o que determina uma produção adicional de superóxido e perpetuação do dano endotelial (BAHIA et al., 2006).

A diminuição da intensidade de marcação de ZO-1 após a incubação das células HBMEC em meio enriquecido com DBK 1  $\mu$ M, mesmo após a alta intensidade encontrada nas células tratadas com MCT98G é um sinal positivo de abertura da BHE, mas é imperativo que a abertura seja reversível em curto período de tempo e que permita o aumento da biodisponibilidade de fármacos para o parênquima cerebral para que seja efetiva e um potencial tratamento adjuvante.

A natureza infiltrativa das células de glioma impossibilita da completa ressecção cirúrgica, enquanto a resistência aos tratamentos impede a erradicação (ZONG et al., 2015). Apesar de uma vasta gama de pesquisas, foram poucos os avanços significativos nos últimos 30 anos no combate ao glioblastoma, com destaque para a TMZ (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015; SMITH-COHN et al., 2021). Em todo o espectro dos cânceres cerebrais, o número de pacientes elegíveis para ensaios clínicos é relativamente baixo, com um número ainda menor de pacientes que se beneficiam dessa (SMITH-COHN et al., 2021).

O comprometimento da BHE foi encontrado em diversas doenças cerebrais, mas mesmo sendo caracterizado como um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças há restrição à entrada do fármaco no tumor (SMITH-COHN et al., 2021). As diversas abordagens para abertura transitória da BHE apresentam um desafio, na medida em que estudos pré-clínicos ainda apresentam

falhas em os fármacos atingirem o tecido cerebral em níveis terapêuticos (WEI et al., 2013; KANE, 2019; SIMON et al., 2020; LI et al., 2021; CRUZ et al., 2022).

Uma tentativa de abrir a BHE levou ao desenvolvimento clínico do RMP-7, um análogo da bradicinina, mas que falhou em estudos de fase II ao não demonstrar benefícios clínicos (VAN TELLINGEN et al., 2015). Uma das explicações para o desfecho negativo foi o tempo relativamente curto de abertura da barreira associado ao tratamento com o quimioterápico, não favorecendo a disponibilidade de quimioterápico no tumor (VAN TELLINGEN et al., 2015).

Além dos indicativos de influência de B2R na abertura da BHE, a resposta do organismo ao LPS indica não só a influência de TLR4, mas também de B1R. Porém, a quantidade de LPS administrada sistemicamente para proporcionar a abertura da BHE/BTB, por exemplo, precisa ser controlada para que ocorra a sinalização para liberação de mediadores pró-inflamatórios, sem que haja um choque séptico (CHAO et al., 2017; ANDO et al., 2018).

Como já citado anteriormente, a ligação do LPS ao TLR4 induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias e sensibilidade vascular ao DBK (BOUTHILLIER et al., 1987; TEWARI et al., 2012; ZEUNER et al., 2015), que pode ser uma via terapêutica importante, por exemplo, para a abertura da barreira entre as células endoteliais permitindo um aumento da demanda por quimioterapia, um grande problema enfrentado nas terapias de tumores cerebrais (LU et al., 2010; MONTANA & SONTHEIMER, 2011; SIKPA et al., 2020; SUN et al., 2020). A administração de LPS sistêmico não causa alteração ultraestrutural dos vasos cerebrais a ponto de alterar sua permeabilidade, mas não analisaram a integridade das junções oclusivas (ANDO et al., 2018). Essa abertura seletiva da barreira ainda tem um mecanismo desconhecido, mas pesquisas mostram que a manipulação dos receptores de cinina aumenta o influxo de  $Ca^{2+}$  para as células endoteliais, o que poderia ser responsável pela abertura transitória dessas junções entre as células endoteliais (LIU et al., 2008; SIKPA et al., 2020).

Ao investigarmos o efeito da DBK como molécula para promoção de abertura transitória da BHE, observamos em ensaio de transwell que há abertura da barreira após tratamento de 24h da HBMEC com 1  $\mu$ M do peptídeo tanto na situação

controle quanto em HBMEC que esteve em contato com MCU87. No tempo de 24h de contato da região basal das células HBMEC com o MCT98G há aumento da permeabilidade da HBMEC, mas essa aumenta ainda mais com a adição da DBK na região apical da célula, indicando que o aumento de intensidade de ZO-1 observado não seria de integridade da barreira, mas sim que há desorganização de ZO-1.

É claro que nenhum modelo de cultivo celular *in vitro*, seja monocamada ou esferas, irá refletir fielmente todas as interações complexas do microambiente tumoral, mas ajuda a compreender como as células tumorais afetam aquelas do entorno, como as endoteliais dos vasos que margeiam e nutrem a massa tumoral.

A abertura da BHE por 24h em experimento *in vitro* confirmou-se em ensaio *in vivo*. Em 24h da injeção de DBK observou-se presença significativa de azul de Evans (AE) no parênquima cerebral, tanto no cérebro de animais controle quanto de animais inoculados com células C6. Em 48h a quantidade de AE é semelhante à dos animais controle com ou sem inoculação de C6, que não receberam injeção de DBK. Em ensaios de extravasamento de AE, a BK e um análogo farmacológico aumentaram seletivamente a permeabilidade da BTB em ratos inoculados com glioma e essa permeabilidade atingiu um pico 15 min após infusão dos agonistas de B2R. (IFUKU et al., 2007; SU et al., 2018).

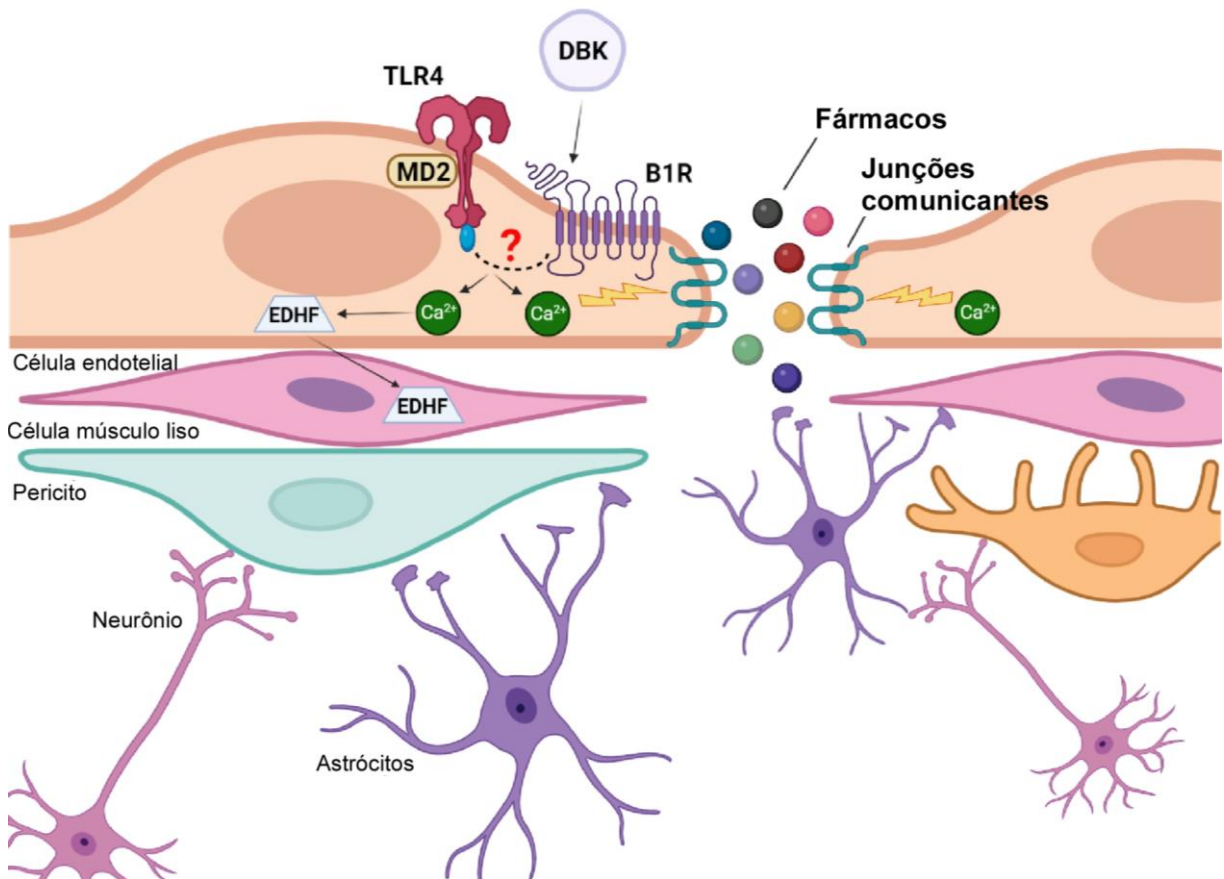
Em ensaio *in vitro*, Medeiros e colaboradores (2004) fizeram uma análise temporal da expressão do RNAm de B1R nas células endoteliais da veia porta, após incubação com DBK, observando que após 30 minutos de incubação com o agonista já há RNA de B1R, atingindo o pico de expressão em 6h e persistindo até, pelo menos, 12h depois. Interessante notar que o rompimento de barreira promovido naturalmente pelo tumor, a BTB, não permitiu a passagem de AE em quantidade maior do que a encontrada em controle sem tumor. A vasculatura anormal no glioblastoma é uma consequência de fatores angiogênicos regulados positivamente, especificamente o VEGF, fator que permite com que novos vasos sanguíneos se formem dentro do tumor e essa rede vascular exibe um aumento da permeabilidade, mas que não se reflete no aumento da biodisponibilidade de fármacos à massa tumoral (PERRIN et al., 2019).

Sikpa e colaboradores (2020) injetaram simultaneamente agonistas farmacológicos de B1R e B2R e o quimioterápico DOX e os dados indicam que a ativação dos receptores promoveu a abertura da barreira, favorecendo a biodisponibilidade de agentes quimioterápicos no tecido cerebral. Nossos dados convergem para a mesma resposta, mas utilizando a DBK, ativando principalmente B1R, visto que nossos dados apontam que a DBK só se ligaria em B2R na ausência total de B1R. Ademais, em análise qualitativa observou-se maior presença do quimioterápico DOX na região tumoral cerebral quando analisado cortes histológicos dos animais que receberam DBK em relação ao que só recebeu DOX, mas o mesmo não foi constatado quando o quimioterápico foi retirado do parênquima e dosado. Aqui podemos considerar o baixo número experimental para cada condição e o fato de haver uma variedade no tamanho do tumor de cada animal, visto que C6 é uma linhagem celular de rato sendo injetada em camundongo. Tanto nos experimentos de dosagem de AE quanto de DOX o tamanho do tumor influencia a quantidade do agente incorporado. É preciso ter a ressalva de que os tumores dos animais que só receberam DOX possam ser maiores do que aqueles dos animais que receberam a DBK antes da DOX.

A DBK é um peptídeo de vida curta *in vivo*, e a infusão de uma única dose não afetaria a proliferação das células de glioma (NICOLETTI et al., 2017), o que confirmamos em ensaio de proliferação celular com a DBK 1  $\mu$ M. A injeção venosa de DBK ou BK não modifica significativamente o tamanho de tumor de glioblastoma, sendo necessários três tratamentos agudos para afetar a proliferação do glioma (NICOLETTI et al., 2017). A análise de DBK 1  $\mu$ M em células de linhagens de glioblastoma (T98G, U87MG, C6) indica que a DBK não afeta a viabilidade das células. Um ponto de destaque é que a combinação DBK + DOX + TMZ diminuiu significativamente a viabilidade das células estudadas, mais do que cada um dos agentes farmacológicos individualmente. Foi relatado que a TMZ pode aumentar o acúmulo intracelular de DOX, revertendo a resistência das células de glioma (DU et al., 2020).

Coletivamente, os dados apresentados e os presentes na literatura sugerem a hipótese de que ativação do B1R pelo DBK promove a interação entre B1R e TLR4, o que aumenta a concentração intracelular de cálcio, desestabilizando as junções oclusivas que formam as barreiras entre as células endoteliais dos vasos (**Figura**

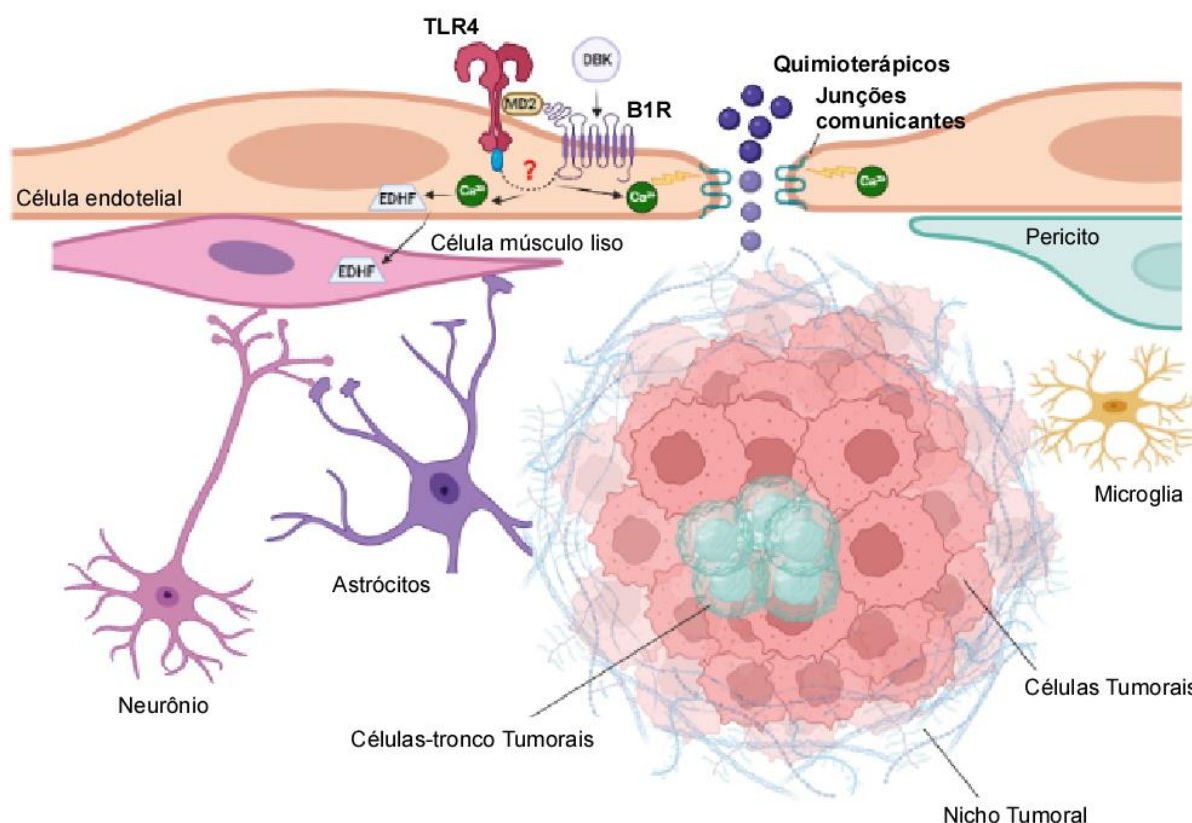
53). Assim, há um maior fluxo de medicamentos para o parênquima cerebral. Enquanto isso, o aumento da concentração de cálcio aumenta os níveis de EDHF, que será transportado para o músculo liso, onde promoverá a hiperpolarização.



**Figura 53: Hipótese da ação de DBK para abertura transitória da barreira hematoencefálica.** A ativação do B1R pelo DBK promove a interação entre B1R e TLR4, o que aumenta a concentração intracelular de cálcio, desestabilizando as junções oclusivas que formam as barreiras entre as células endoteliais dos vasos. Assim, há um maior fluxo de medicamentos para o parênquima cerebral. Enquanto isso, o aumento da concentração de cálcio aumenta os níveis de EDHF, que será transportado para o músculo liso, onde promoverá a hiperpolarização.

Em face de processo inflamatório, teríamos uma expressão local de B1R e TLR4 (QU et al., 2020), no conferindo a hipótese de que de ação da DBK para aumento da biodisponibilidade de fármacos para a massa tumoral, onde os estímulos à ativação dos receptores TLR4 e B1R aumenta o cálcio intracelular, perturbando as proteínas que compõe a BHE, como ZO-1 (**Figura 54**). Essa perturbação da barreira permite a passagem de uma concentração maior de quimioterápicos para a massa tumoral. Além da DBK, outro adjuvante que poderia ser administrado em baixíssimas doses é o LPS, que induziria a diferenciação das

células-tronco tumorais, permitindo a ação mais eficaz de quimioterápicos, como TMZ (JACKSON et al., 2015; ALVARADO et al., 2017).



**Figura 54: Hipótese da ação de DBK para abertura transitória da barreira hematoencefálica para aumento da biodisponibilidade de fármacos para a massa tumoral de glioblastoma.** A ativação da relação entre B1R e TLR4 pela DBK aumenta o cálcio intracelular, perturbando as proteínas que compõem a BHE, como ZO-1. Essa perturbação pode permitir a passagem de uma concentração maior de quimioterápicos para a massa tumoral. Além da DBK, outro adjuvante que poderia ser administrado em baixíssimas doses é o LPS, que induziria a diferenciação das células-tronco tumorais, permitindo a ação mais eficaz de quimioterápicos, como TMZ.

### 3 CYP2C8 NÃO É O EDHF DE CÉLULAS HBMEC EXPOSTAS A MEIOS CONDICIONADOS DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Diversos fatores circulantes são conhecidos por induzir a contração do músculo liso, enquanto outros atuam na inibição da resposta contrátil, atuando na diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$  das células musculares lisas vasculares (BURGOYNE & EATON, 2010). Dentre os fatores liberados pelas células endoteliais que regulam o tônus vascular está o NO, a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e o EDHF (FLEMING, 2001; FISSLTHALER et al., 2003; BURGOYNE & EATON, 2010; CAMPBELL & GAUTHIER, 2013).

Por definição, um EDHF é uma substância sintetizada e liberada do endotélio que hiperpolariza o tecido vascular, provocando o relaxamento das células musculares lisas (FLEMING, 2000). O EDHF pode ser liberado pelas células endoteliais sob a estimulação dos receptores de cininas, como apontado por Velásquez e Wang (2014). Em nossos modelos animais, o EDHF pode se difundir através das células endoteliais e se ligar a canais de potássio ativados por cálcio expressos em células musculares lisas vasculares, levando ao efluxo de potássio (BATISTA et al., 2022). Bertrand-Thiebault e colaboradores (2007) atentam que, em modelos animais, a diversidade genética pode ser a causa de diferentes respostas mediadas por EDHF, por isso pode não é possível extrapolar os dados para outros modelos animais, como apresentado em Batista e colaboradores (2022).

Existem diferentes EDHFs em cada espécie, mas muitos achados indicam que o EDHF seria um produto relacionado à citocromo P450 (CYP) (FLEMING, 2001; FISSALTHALER et al., 2003; OZKOR & QUYYUMI, 2011; CAMPBELL & GAUTHIER, 2013), visto que as citocromos contribuem para a regulação do tônus vascular e homeostase (FLEMING, 2001).

A citocromo P450 2C8 (CYP2C8) é a candidata a EDHF em células endoteliais e célula muscular (FLEMING, 2001; MICHAELIS et al., 2005; OZKOR & QUYYUMI, 2011; LIU et al., 2014). Ao checarmos sua expressão em aorta torácica de camundongos C57BL/6 e em células HBMEC não observamos sequer sua expressão na concentração de 10 ng de cDNA. Culturas de células HBMEC indicaram responsividade na via de NO, como observado em modelos da literatura (WONG et al., 2004), mas que não parece ser a via de resposta à DBK quando as células são cultivadas em meio condicionado de linhagens tumorais.

Liu e colaboradores (2014) demonstram que a atividade de CYP2C8 desencadeia na supressão da ativação de NF- $\kappa$ B em modelo de célula endotelial, o que concorda com nossos dados de ausência de aumento da expressão de NF- $\kappa$ B após tratamento das células. Ademais, Ozkor e Quyyumi (2011) pontuam que a iberiotoxina é um inibidor farmacológico de EDHF, através da inibição de canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância, sendo esses canais considerados os principais alvos celulares de EDHF (SUN et al., 2002; FISSALTHALER et al., 2003).



Em modelo de aortas coronárias suínas, Fisslthaler e colaboradores (2000 e 2003) demonstraram que a hiperpolarização induzida por bradicinina está relacionada com o aumento da expressão de CYP2C, mas sem apontamento de isoforma, enquanto dados de McLean e colaboradores (1999) indicam uma resposta de DBK dependente de  $PGI_2$  em modelo de artéria coronária de rato Wistar. O influxo de cálcio nas células endoteliais ativa canais de  $K_{Ca}$  e fazendo com que a membrana das células endoteliais se hiperpolarize; assim, as junções comunicantes mioendoteliais transferem a hiperpolarização endotelial para as células do músculo liso resultando em relaxamento (OZKOR & QUYYUMI, 2011; CAMPBELL & GAUTHIER, 2013).

A hipótese é a de que a resposta via EDHF em nossos modelos experimentais deve ser via outras citocromos, pois estas parecem ser distintas de acordo com o modelo e tratamento das células endoteliais e não somente uma respondendo igualmente a estímulos (FLEMING, 2001; POTENTE et al, 2002; LOPEZ et al., 2022).

## CONCLUSÃO

O conjunto dos dados de eletrofisiologia e imunofluorescência reforça as evidências de relação entre os receptores B1R e TLR4. Observamos que a presença de um receptor altera a resposta do outro, o que torna as cascatas de sinalizações mais complexas do que apontado até então. A ligação por proximidade entre os receptores B1R e TLR4, que aumenta na presença de DBK, é uma interação de via de sinalização inflamatória a ser explorada. Outra evidência de importante é a ausência de TLR4 induzir a presença de B1R ativo nas células endoteliais.

Essa interação entre B1R e TLR4 em células endoteliais apresenta-se como alvo a ser explorado para a abertura transitória da barreira hematoencefálica, o que pode favorecer a biodisponibilidade de fármacos ao parênquima cerebral. Encontrar mecanismos que melhorem sua entrega ao tecido cerebral e sua combinação com outros agentes são linhas de pesquisas em que diversos grupos de cientistas (JATYAN et al., 2023) e a administração de DBK induziu a abertura da BHE por um período menor que 48h em ambiente cerebral sem e com tumor de glioblastoma. Houve alteração no padrão de marcação e expressão de proteínas que compõe a BHE e no envolvimento de óxido nítrico. A ação do peptídeo permitiu a passagem do quimioterápico doxorrubicina e este, na presença do glioblastoma, parece concentrar-se na região da massa tumoral. Sugerimos aqui, a ação da DBK especialmente nos vasos de regiões que estão em processo inflamatório, onde haveria maior concentração do receptor B1R.

## REFERÊNCIAS

ABBASZADE, Z. et al. Molecular biological investigation of temozolomide and KC7F2 combination in U87MG glioma cell line. **Gene.**, v. 776, p. 145445, 2021. DOI: 10.1016/j.gene.2021.145445.

ABBOTT, N.J. et al. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, n. 1, p. 41-53, 2006. DOI: 10.1038/nrn1824.

ABOUDOUNYA, M.M.; HEADS, R. J. COVID-19 and toll-like receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 may bind and activate TLR4 to increase ACE2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. **Mediators. Inflamm.**, v. 2021, p. 8874339, 2021. DOI: 10.1155/2021/8874339.

ADHIKARLA, S.V. et al. TLR-mediated signal transduction and neurodegenerative disorders. **Brain. Sci.**, v. 11, n. 11, p. 1373, 2021. DOI: 10.3390/brainsci11111373.

ALAM, M.S. Proximity ligation assay (PLA). **Curr. Protoc. Immunol.**, v. 123, n. 1, p. e58, 2018. DOI: 10.1002/cpim.58.

ALLEN, B.D.; LIMOLI, C.L. Breaking barriers: neurodegenerative repercussions of radiotherapy induced damage on the blood-brain and blood-tumor barrier. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 178, p. 189-201, 2022. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.002.

ALVARADO, A.G. et al. Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression. **Cell. Stem. Cell.**, v. 20, n. 4, p. 450-461, 2017. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.001.

ALVES, A.L.V. et al. Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. **Stem. Cell. Res. Ther.**, v. 12, n. 1, p. 206, 2021. DOI: 10.1186/s13287-021-02231-x.

ALVES, E.A. et al. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, p. 215-253, 2010. <https://www.epsjv.fiocruz.br/publicacao/livro/conceitos-e-metodos-para-formacao-de-profissionais-em-laboratorios-de-saude-volum-2>.

ANDO, Y. et al. Brain-specific ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx and its possible contribution for blood brain barrier. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 17523, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-35976-2.

ARGAÑARAZ, G.A. et al. The synthesis and distribution of the kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. **Brain. Res.**, v. 1006, n. 1, p. 114-125, 2004. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.12.050.

ARVANITIS, C.D. et al. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 20, n. 1, p. 26-41, 2020. DOI: 10.1038/s41568-019-0205-x.

AUDET, R. et al. Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe8]des-Arg9-bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 280, n.1, p. 6-15, 1997. <https://jpet.aspetjournals.org/content/280/1/6.long>.

BACHAR, O. et al. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 4, p. 1196-1207, 2004. DOI: 10.1002/eji.200324569.

BAHIA, L. et al. O endotélio na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200015>.

BARTH, R.F; KAUR, B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. **J. Neurooncol.**, v. 94, n. 3, p. 299-312, 2009. DOI: 10.1007/s11060-009-9875-7.

BATISTA, C. et al. Role of endothelial kinin B<sub>1</sub> receptor on the membrane potential of transgenic rat aorta. **Physiol. Res.**, v. 71, n. 4, p. 477-487, 2022. DOI: 10.33549/physiolres.934904.

BAWOLAK, M-T. et al. Fluorescent ligands of the bradykinin B1 receptors: pharmacologic characterization and application to the study of agonist-induced receptor translocation and cell surface receptor expression. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 329, n. 1, p. 159-168, 2009. DOI: 10.1124/jpet.108.149724.

BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 3, p. 869-901, 2004. DOI: 10.1152/physrev.00035.2003.

BELOT, N. et al. Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. **Glia.**, v. 36, n. 3, p. 375-390, 2001. DOI: 10.1002/glia.1124.

BENJAMIN, L.E.; KESHET, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, n. 16, p. 8761-8766, 1997. DOI: 10.1073/pnas.94.16.8761.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2003. DOI: 10.1038/nrc1093.

BERTRAND-THIEBAULT, C. et al. Effect of HMGCoA reductase inhibitors on cytochrome P450 expression in endothelial cell line. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 49, n. 5, p. 306-315, 2007. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31803e8756.

BHOOLA, K.D. et al. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 1-80, 1992. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/44/1/1.long>.

BONA, N.P. et al. Antitumoral activity of *Cecropia pachystachya* leaves extract in vitro and in vivo model of rat glioma: brain and blood effects. **Mol. Neurobiol.**, 2024. DOI: 10.1007/s12035-024-04086-8.

BOSSI, F. et al. Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability. **Immunol. Lett.**, v. 140, n. 1-2, p. 7-13, 2011. DOI: 10.1016/j.imlet.2011.06.006.

BOUTHILLIER, J. et al. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 92, n. 2, p. 257-264, 1987. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1987.tb11319.x.

BRYANT, C.D. The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1245, p. 31-33, 2011. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06325.x.

BURGOYNE, J.R.; EATON, P. Oxidant sensing by protein kinases a and g enables integration of cell redox state with phosphoregulation. **Sensors. (Basel)**, v. 10, n. 4, p. 2731-2751, 2010. DOI: 10.3390/s100402731.

CALIXTO, J.B. et al. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br. J. Pharmacol.**, v. 143, n. 7, p. 803-818, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706012.

CAMPBELL, W.B.; GAUTHIER, K.M. Inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor: role of the 15-lipoxygenase-EDHF pathway. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 61, n.3, p. 176-187, 2013. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31828165db.

CAMPOS, M.M. et al. *In vivo* B<sub>1</sub> kinin receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κB pathways. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 8, p. 1851-1859, 1999. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702715.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat. Med.**, v. 6, n. 4, p. 389-395, 2000. DOI: 10.1038/74651.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003. DOI: 10.1038/nm0603-653.

CASILI, G. et al. TLR-4/Wnt modulation as new therapeutic strategy in the treatment of glioblastomas. **Oncotarget.**, v. 9, n. 101, p. 37564-37580, 2018. DOI: 10.18632/oncotarget.26500.

CAYLA, C. et al. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. **FASEB. J.**, v. 21, n. 8, p. 1689-1698, 2007. DOI: 10.1096/fj.06-7175com.

CHAI, R. et al. Predictive value of MGMT promoter methylation on the survival of TMZ treated *IDH*-mutant glioblastoma. **Cancer. Biol. Med.**, v. 18, n. 1, p. 272-282, 2021. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0179.

CHAN, M-H. et al. An advanced *in situ* magnetic resonance imaging and ultrasonic theranostics nanocomposite platform: crossing the blood-brain barrier and improving the suppression of glioblastoma using iron-platinum nanoparticles in nanobubbles. **ACS. Appl. Mater. Interfaces.**, v. 13, n. 23, p. 26759-26769, 2021. DOI: 10.1021/acsmi.1c04990.

CHAO, H-H. et al. Lipopolysaccharide pretreatment increases protease-activated receptor-2 expression and monocyte chemoattractant protein-1 secretion in vascular endothelial cells. **J. Biomed. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 85, 2017. DOI: 10.1186/s12929-017-0393-1.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget.**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.23208.

CHEN, S.J. et al. Abnormal activation of K(+) channels in aortic smooth muscle of rats with endotoxic shock: .electrophysiological and functional evidence. **Br. J. Pharmacol.**, v. 131, n. 2, p. 213-222, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703564.

CHIAO, C-W. et al. P2X7 receptor activation contributes to an initial upstream mechanism of lipopolysaccharide-induced vascular dysfunction. **Clin. Sci. (Lond).**, v. 125, n. 3, p. 131-141, 2013. DOI: 10.1042/CS20120479.

COSTA, T.E.M.M. et al. Natural heat shock protein 90 inhibitors in cancer and inflammation. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 189, p. 112063, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112063.

CÔTÉ, J. et al. Dual kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors. **Cancer. Biol. Ther.**, v. 14, n. 9, p. 806-811, 2013. DOI: 10.4161/cbt.25327.

CÔTÉ, J. et al. Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B<sub>1</sub> receptor agonist in a glioma rat model. **PLoS. One.**, v. 7, n. 5, p. e37485, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0037485.

CRUZ, J.V.R. et al. Obstacles to glioblastoma treatment two decades after temozolomide. **Cancers (Basel)**, v. 14, n. 13, p. 3203, 2022. DOI: 10.3390/cancers14133203.

DA COSTA, P.L.N. et al. The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. **Cancer. Lett.**, v. 345, n. 1, p. 27-38, 2014. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.12.009.

DAGNINO, A.P.A. et al. Kinins and their receptors in infectious diseases. **Pharmaceuticals (Basel).**, v. 13, n. 9, p. 215, 2020. DOI: 10.3390/ph13090215.

DÉCARIE, A. et al. Serum interspecies differences in metabolic pathway of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalapril. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 4 Pt 2, p.H1340-7, 2020. DOI: 10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1340.

DESTA, I.T. et al. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. **Structure.**, v. 28, n. 9, p. 1071-1081, 2020. DOI: 10.1016/j.str.2020.06.006.

DE VLEESCHOUWER, S.; BERGERS, G. Glioblastoma: to target the tumor cell or the microenvironment? *In*: DE VLEESCHOUWER, S. **Glioblastoma [Internet]**. Brisbane (AU): Codon Publications, 2017. capítulo 16. DOI: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch16.

DINIZ, L.P. et al., Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease model. **J. Neurosci.**, v. 37, n. 28, p. 6797-6809. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017.

DU, K. et al. Temozolomide-doxorubicin conjugate as a double intercalating agent and delivery by apoferritin for glioblastoma chemotherapy. **ACS. Appl. Mater. Interfaces.**, v. 12, n. 31, p. 34599-34609, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c08531.

DUNZENDORFER, S. et al. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. **FASEB. J.**, v. 18, n. 10, p. 1117-1119, 2004. DOI: 10.1096/fj.03-1263fje.

DUTRA, R.C. et al. The role of kinin receptors in preventing neuroinflammation and its clinical severity during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **PLoS. One.**, v. 6, n. 11, p. e27875, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027875.

DUTRA, R.C. Kinin receptors: key regulators of autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 192-207, 2017. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.12.011.

ENQUIST, J. et al. Kinin-stimulated B<sub>1</sub> receptor signaling depends on receptor endocytosis whereas B<sub>2</sub> receptor signaling does not. **Neurochem. Res.**, v. 39, n. 6, p. 1037-1047, 2014. DOI: 10.1007/s11064-013-1126-9.

ERICES, J.I. et al. Glioblastoma microenvironment and invasiveness: new insights and therapeutic targets. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 8, p. 7047, 2023. DOI: 10.3390/ijms24087047.

FAN, Y. et al. Burden and trends of brain and central nervous system cancer from 1990 to 2019 at the global, regional, and country levels. **Arch. Public. Health.**, v. 80, n. 1, p. 209, 2022. DOI: 10.1186/s13690-022-00965-5.

FARHY, R.D. *et al.* Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. **Circ. Res.**, v. 72, n. 6. P. 1202-1210, 1993. DOI: 10.1161/01.res.72.6.1202.

FARIAS, N.C. et al. Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels are targets for bradykinin B<sub>1</sub> receptor ligands and for lipopolysaccharide in the rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 525, n. 1-3, p. 123-127, 2005. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.09.047.

FARIAS, N.C. et al. Different mechanism of LPS-induced vasodilation in resistance and conductance arteries from SHR and normotensive rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, n. 2, p. 213-220, 2002. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704850.

FARIAS, N.C. et al. Lys-[Leu<sup>8</sup>,des-Arg<sup>9</sup>]-bradykinin blocks lipopolysaccharide-induced SHR aorta hyperpolarization by inhibition of Ca<sup>++</sup>-and ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 498, n. 1-3, p. 163-169, 2004. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.002.

FELIPE, S.A. et al. Functional expression of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in mouse abdominal aorta. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 5, p. 649-655, 2007. DOI: 10.1590/s0100-879x2007000500007.

FIRMAL, P. et al. Insight into TLR4-mediated immunomodulation in normal pregnancy and related disorders. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 807, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00807.

FISLTHALER, B. et al. Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone: novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1619, n. 3, p. 332-339, 2003. DOI: 10.1016/s0304-4165(02)00492-0.

FISLTHALER, B. et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Nature.**, 401(6752): 493-497, 1999. DOI: 10.1038/46816.

FISLTHALER, B. et al. Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. **Hypertension.**, v. 36, n. 2, p. 270-275, 2000. DOI: 10.1161/01.hyp.36.2.270.

FLEMING, I. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 10, n. 10, p. 166-170, 2000. DOI: 10.1016/s1050-1738(00)00065-7.

FLEMING, I. Cytochrome P450 and vascular homeostasis. **Circ. Res.**, v. 89, n. 9, p. 753-762, 2001. DOI: 10.1161/hh2101.099268.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000. DOI: 10.1590/S0104-42302000000300012.

FONTES-DANTAS, F.L. SARS-CoV-2 spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice. **Cell. Rep.**, v. 42, n. 3, p. 112189, 2023. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112189.



FURCHGOTT, R.F. The requirement for endothelial cells in relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 2, 173-176, 1981. DOI: 10.1016/0165-6147(81)90303-5.

GABAY, M. et al. Liposomal carrier conjugated to APP-derived peptide for brain cancer treatment. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 41, n. 5, p. 1019-1029, 2021. DOI: 10.1007/s10571-020-00969-1.

GENG, J. et al. TLR4 signalling via Piezo1 engages and enhances the macrophage mediated host response during bacterial infection. **Nat. Commun.**, v. 12, n. 1, p. 3519, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-23683-y.

GILLRIE, M.R. et al. Src-family kinase dependent disruption of endothelial barrier function by Plasmodium falciparum merozoite proteins. **Blood.**, v. 110, n. 9, p. 3426-3435, 2007. DOI: 10.1182/blood-2007-04-084582.

GOLDIM, M.P.S. et al. Using Evans blue dye to determine blood-brain barrier integrity in rodents. **Curr. Protoc. Immunol.**, v. 126, n. 1, p. e83, 2019. DOI: 10.1002/cpim.83.

GRUFFAZ, M. et al. TLR4-mediated inflammation promotes KSHV-induced cellular transformation and tumorigenesis by activating the STAT3 pathway. **Cancer. Res.**, v. 77, n. 24, p. 7094-7108, 2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2321.

GUEVARA-LORA, I. et al. Kinin-generating cellular model obtained from human glioblastoma cell line U-373. **Acta. Biochim. Pol.**, v. 60, n. 2, p. 299-305, 2013. [http://www.actabp.pl/pdf/3\\_2013/299.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/3_2013/299.pdf).

GUEVARA-LORA, I. Kinin-mediated inflammation in neurodegenerative disorders. **Neurochem. Int.**, v. 61, n. 1, p. 72-78, 2012. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.04.013.

GUIMARÃES, P.B. et al. Interactions between carboxypeptidase M and kinin B1 receptor in endothelial cells. **Inflamm. Res.**, v. 68, n. 10, p. 845-855, 2019. DOI: 10.1007/s00011-019-01264-6.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G. et al. Bradykinin promotes Toll like receptor-4 expression in human gingival fibroblasts. **Int. Immunopharmacol.**, v. 14, n. 4, p. 538-545, 2012. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.07.021.

GUZMÁN-DE-VILLORIA, J.A. Added value of advanced over conventional magnetic resonance imaging in grading gliomas and other primary brain tumors. **Cancer. Imaging.**, v. 14, n. 1, p. 35, 2014. DOI: 10.1186/s40644-014-0035-8.

HADDAD, Y.; COUTURE, R. Localization and interaction between kinin B1 receptor and NADPH Oxidase in the vascular system of diabetic rats. **Front. Physiol.**, v. 8, p. 861, 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00861.

HAMID, S. et al. Role of kinins in hypertension and heart failure. **Pharmaceuticals. (Basel)**, v. 13, n. 11, p. 347, 2020. DOI: 10.3390/ph13110347.

HAN, S. et al. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. **J. Exp. Clin. Cancer. Res.**, v. 36, n. 1, p. 83, 2017. DOI: 10.1186/s13046-017-0552-y.

IFUKU, M. et al. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B<sub>1</sub>-bradykinin receptors depends on Ca<sup>2+</sup> influx via reverse-mode activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 48, p. 13065-13073, 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3467-07.2007.

IMAMURA, T. et al. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. **Biol. Chem.**, v. 385, n. 11, p. 989-996, 2004. DOI: 10.1515/BC.2004.129.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: **INCA**, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>.

ISHIHARA, K. et al. Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, n. 4, p. 499-509, 2002. DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00193-x.

ITURRIOZ-RODRÍGUEZ, N. et al. Lipid-based nanocarriers for the treatment of glioblastoma. **Adv. Nanobiomed. Res.**, v. 1, n. 2, p. 2000054, 2020. DOI: 10.1002/anbr.202000054.

JACKSON, M. et al. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. **Carcinogenesis.**, v. 36, n. 2, p. 177-185, 2015. DOI: 10.1093/carcin/bgu243.

JANIGRO, D. et al. Regulation of blood-brain barrier endothelial cells by nitric oxide. **Circ. Res.**, v. 75, n. 3, p. 528-538, 1994. DOI: 10.1161/01.res.75.3.528.

JATYAN, R. et al. Temozolomide-fatty acid conjugates for glioblastoma multiforme: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **J. Control. Release.**, v. 359, p. 161-174, 2023. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.05.012.

JEAN, M. et al. In vivo effects of bradykinin B<sub>2</sub> receptor agonists with varying susceptibility to peptidases. **Front. Pharmacol.**, v. 6, p. 306, 2016. DOI: 10.3389/fphar.2015.00306.

JENSEN, R.L.; CHKHEIDZE, R. The role of glucose transporter-1 (GLUT-1) in malignant gliomas. In: Hayat, M. (eds) Tumors of the central nervous system, volume 1. Springer, Dordrecht. **Tumors of the Central Nervous System**, v. 1, 2011. DOI: 10.1007/978-0070344-5\_11.

JHANWAR-UNIYAL, M. et al. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. **Cancers. (Basel).**, v. 7, n. 2, p. 538-555, 2015. DOI: 10.3390/cancers7020538.

JIA, W. et al. The role of claudin-5 in blood-brain barrier (BBB) and brain metastases (review). **Mol. Med. Rep.**, v. 9, n.3, p. 779-785, 2014. DOI: 10.3892/mmr.2013.1875.

JIN, Y. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. **Signal. Transduct. Target. Ther.**, v. 5, n.1, p. 293, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00454-7.

JOHNSON, R.H. et al. The functional and inflammatory response of brain endothelial cells to Toll-Like Receptors agonists. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 10102, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-28518-3.

JUN-XIA, Y. et al. Measuring blood-brain-barrier permeability using Evans blue in mice. **Bio-protoc.**, v.5, n.15, p. e1548, 2015. DOI: 10.21769/BioProtoc.1548.

KADRY, H. et al. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. **Fluids. Barriers. CNS.**, v. 17, n. 1, p. 69, 2020. DOI: 10.1186/s12987-020-00230-3.

KAMATA, Y. et al. An ATP-sensitive potassium channel blocker suppresses sodium-induced hypertension through increased secretion of urinary kallikrein. **Hypertens. Res.**, v. 32, n. 3, p. 220-226, 2009. DOI: 10.1038/hr.2008.33.

KANE, J.R. The role of brain vasculature in glioblastoma. **Mol. Neurobiol.**, v. 56, n. 9, p. 6645-6653, 2019. DOI: 10.1007/s12035-019-1561-y.

KARIN, M. et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, n. 4, p. 301-310, 2002. DOI: 10.1038/nrc780.

KARMAKAR, S. et al. Intracranial stereotaxic cannulation for development of orthotopic glioblastoma allograft in Sprague-Dawley rats and histoimmunopathological characterization of the brain tumor. **Neurochem. Res.**, v. 32, n. 12, p. 2235-2242, 2007. DOI: 10.1007/s11064-007-9450-6.

KATORI, M. et al. Role of the renal kallikrein-kinin system in the development of salt-sensitive hypertension. **Biol. Chem.**, v. 382, n. 1, p. 61-64, 2001. DOI: 10.1515/BC.2001.010.

KAWAGUCHI, A. et al. Functional expression of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in neonatal rat trigeminal ganglion neurons. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 9, p. 229, 2015. DOI: 10.3389/fncel.2015.00229.

KIM, H.M. et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. **Cell.**, v. 130, n. 5, p. 906-917, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.002.

KINA, I. et al. Variations in Toll-like receptor and nuclear factor-kappa B genes and the risk of glioma. **Br. J. Neurosurg.**, v. 33, n. 2, p. 165-170, 2019. DOI: 10.1080/02688697.2018.1540764.

KLAESSON, A. et al. Improved efficiency of in situ protein analysis by proximity ligation using UnFold probes. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 5400, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-23582-1.

KOZAKOV, D. et al. How good is automated protein docking? **Proteins.**, v. 81, n. 12, p. 2159-2166, 2013. DOI: 10.1002/prot.24403.

KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. **Nat. Protoc.**, v. 12, n. 2, p. 255-278, 2017. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.

KRUGLYAKOV, D. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents cells proliferation in glioblastoma. **J. Mol. Neurosci.**, 2023. DOI: 10.1007/s12031-023-02166-3.

KUHR, F. et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. **Neuropeptides.**, v. 44, n. 2, p. 145-154, 2010. DOI: 10.1016/j.npep.2009.12.004.

KUNIGELIS, K.E.; VOGELBAUM, M.A. Therapeutic delivery to central nervous system. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 32, n. 2, p. 291-303, 2021. DOI: 10.1016/j.nec.2020.12.004.

LARJAVAARA, S. et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro. Oncol.**, v. 9, n. 3, p. 319-325, 2007. DOI: 10.1215/15228517-2007-016.

LEEB-LUNDBERG, L.M.F. et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, n. 1, p. 27-77, 2005. DOI: 10.1124/pr.57.1.2.

LEE, S.Y. et al. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes. Dis.**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.

LEVY, R.F. et al. Cardiac morphofunctional characteristics of transgenic rats with overexpression of the bradykinin B<sub>1</sub> receptor in the endothelium. **Physiol. Res.**, v. 66, n. 6, p. 925-932, 2017. DOI: 10.33549/physiolres.933596.

LIEBNER, S. et al. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. **Acta. Neuropathol.**, v. 100, n. 3, p. 323-331, 2000. DOI: 10.1007/s004010000180.

LI, J. et al. Development of novel therapeutics targeting the blood-brain barrier: from barrier to carrier. **Adv. Sci. (Weinh).**, v. 8, n. 16, p. e2101090, 2021. DOI: 10.1002/advs.202101090.

LINZ, W. et al. Interactions among ACE, kinins and NO. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 3, p. 549-561, 1999. DOI: 10.1016/s0008-6363(99)00091-7.

LITAK, J. et al. TLR-4 signaling vs. immune checkpoints, miRNAs molecules cancer stem cells, and wntless-signaling interplay in glioblastoma multiforme-future

perspectives. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 9, p. 3114, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093114.

LIU, L-B. et al. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. **J. Neurosci. Res.**, v. 86, n. 5, p. 1153-1168, 2008. DOI: 10.1002/jnr.21558.

LIU, Y. et al. Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B<sub>2</sub> receptor expression in experimental brain tumors. **Neurol. Res.**, v. 23, n. 4, p. 379-387, 2001. DOI: 10.1179/016164101101198596.

LIU, Y-S. et al. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor contributes to interleukin-8 production and glioblastoma migration through interaction of STAT3 and SP-1. **Neuropharmacology.**, v. 144, p. 143-154, 2019. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2018.10.033.

LIU, W. et al. A potential therapeutic effect of CYP2C8 overexpression on anti-TNF- $\alpha$  activity. **Int. J. Mol. Med.**, v. 34, n. 3, p. 725-732, 2014. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1844.

LOIOLA, R.A. et al. Role of vascular kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in endothelial nitric oxide metabolism. **Peptides.**, v. 32, n. 8, p. 1700-1705, 2011. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.06.010.

LOPEZ, M. et al. Endothelial deletion of the cytochrome P450 reductase leads to cardiac remodelling. **Front. Physiol.**, v. 13, p. 1056369, 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.1056369.

LOUIS, D.N. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Neuro. Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.

LOWRY, J.L. et al. Endothelial nitric-oxide synthase activation generates an inducible nitric-oxide synthase-like output of nitric oxide in inflamed endothelium. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 6, p. 4174-4193, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M112.436022.

LU, Y-C. et al. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine.**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.

LU, D-Y. et al. Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B<sub>1</sub> receptor in glioma cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 110, n. 1, p. 141-150, 2010. DOI: 10.1002/jcb.22520.

LUKINA, M. et al. Label-free macroscopic fluorescence lifetime imaging of brain tumors. **J. Cell. Biochem.**, v. 110, n. 1, p. 141-150, 2010. DOI: 10.1002/jcb.22520.

MARCEAU, F. et al. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. **Front. Oncol.**, v. 24, p. 666059, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.666059.

MARCEAU, F. et al. The B<sub>1</sub> receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 357-386, 1998. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/50/3/357.long>.

MAYER, M.G; FISCHER, T. Microglia at the blood brain barrier in health and disease. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 18, 2024. DOI: 10.3389/fncel.2024.1360195.

MAZUREK, M.; ROLA, The implications of nitric oxide metabolism in the treatment of glial tumors. **Neurochem. Int.**, v. 150, p. 105172, 2021. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105172.

MCLEAN, P.G. et al. Inducible expression of the Kinin B<sub>1</sub> receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg<sup>9</sup>-BK induced coronary vasodilation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, n. 2, p. 275-282, 1999. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702743.

MEDEIROS, R. et al. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. **Circ. Res.**, v. 94, n. 10, p. 1375-1382, 2004. DOI: 10.1161/01.RES.0000128404.65887.08.

MEGÍAS, J. et al. Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, a TLR2 ligand, induces differentiation of glioblastoma stem cells and confers susceptibility to temozolomide. **Invest. New. Drugs.**, v. 38, n. 2, p. 299-310, 2020. DOI: 10.1007/s10637-019-00788-2.

MEKADA, K. et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. **Exp. Anim.**, v. 58, n. 2, p. 141-149, 2009. DOI: 10.1538/expanim.58.141.

MERINO, V.F. et al. Increased susceptibility to endotoxic shock in transgenic rats with endothelial overexpression of kinin B<sub>1</sub> receptors. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 86, n. 7, p. 791-798, 2008. DOI: 10.1007/s00109-008-0345-z.

MERINO, V.F. et al. Molecular structure and transcriptional regulation by nuclear factor-kappaB of the mouse kinin B<sub>1</sub> receptor gene. **Biol. Chem.**, v. 386, n. 6, p. 515-522, 2005. DOI: 10.1515/BC.2005.061.

MESQUITA, T.R.R. et al. Vascular kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors determine endothelial dysfunction through neuronal nitric oxide synthase. **Front. Physiol.**, v. 8, n. 228, 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00228.

MICHAELIS, U.R. et al. Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 e 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis. **J. Cell. Sci.**, v. 118, n. Pt 23, p. 5489-5498, 2005. DOI: 10.1242/jcs.02674.

MICHEL, T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 11, p. 1361-1366, 2005. DOI: 10.1590/s0100-879x1999001100006.

MITSUMIZO, S. et al. NOS II inhibition restores attenuation of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery exposed to lipopolysaccharide.

**J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 43, n. 4, p. 589-594, 2004. DOI: 10.1097/00005344-200404000-00015.

MOLINARO, A.M. et al. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. **Nat. Rev. Neurol.**, v. 15, n. 7, p. 405-417, 2019. DOI: 10.1038/s41582-019-0220-2.

MONTANA, V.; SONTHEIMER, H. Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 13, p. 4858-4867, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3825-10.2011.

MONTEIRO, A.C. et al. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B<sub>2</sub> receptors is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 177, n. 9, p. 6325-6335, 2006. DOI: 10.4049/jimmunol.177.9.6325.

MORAIS, F.V. et al. Bradykinin-inactivating enzyme is released from the ex-vivo stored liver. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 45, n. 1, p. 19-23, 1992. DOI: 10.1590/s0104-42301999000100005.

MORETTI, I.F. et al. Late p65 nuclear translocation in glioblastoma cells indicates non-canonical TLR4 signaling and activation of DNA repair genes. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 1333, 2021. DOI: 10.1038/s41598-020-79356-1.

MORETTI, I.F. et al. Plasmatic membrane toll-like receptor expressions in human astrocytomas. **PLoS. One.**, v. 13, n. 6, p. e0199211, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0199211.

MUÑOZ-RODRÍGUEZ, C. et al. Expression and function of TLR4-induced B1R bradykinin receptor on cardiac fibroblasts. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 351, p. 46-56, 2018. DOI: 10.1016/j.taap.2018.05.011.

NAGYOSZI, P. et al. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. **Neurochem. Int.**, v. 57, n. 5, p. 556-564, 2010. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.07.002.

NELSON, M.T. et al. Calcium channels, potassium channels, and and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 1 Pt 1, p. C3-C18, 1990. DOI: 10.1152/ajpcell.1990.259.1.C3.

NICOLETTI, N.F. et al. Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. **J. Neurooncol.**, v. 120, n. 2, p. 235-244, 2014. DOI: 10.1007/s11060-014-1549-4.

NICOLETTI, N.F. et al. Primary role for kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in glioma proliferation. **Mol. Neurobiol.**, v. 54, n. 10, p. 7869-7882, 2017. DOI: 10.1007/s12035-016-0265-9.

NINGARAJ, N.S. et al. Regulation of blood-brain tumor barrier permeability by calcium-activated potassium channels. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 301, n. 3, p. 838-851, 2002. DOI: 10.1124/jpet.301.3.838.

NI, X-T. et al. The bradykinin system contributes to the regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in human amnion fibroblasts: implications for term and preterm birth. **Front. Endocrinol. (Lausanne)**, v. 13, p. 873727, 2022. DOI: 10.3389/fendo.2022.873727.

NUNNO, V.D. et al. Glioblastoma microenvironment: from an inviolable defense to a therapeutic chance. **Front. Oncol.**, v. 12, p. 852950, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.852950.

OLIVEIRA, L.B.O. et al. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Rev. Ciênc. Saúde**, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2013. <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/1026>.

OLIVEIRA, M.N. et al. Kinin-B<sub>1</sub> receptor stimulation promotes invasion and is involved in cell-cell interaction of co-cultured glioblastoma and mesenchymal stem cells. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 1299, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19359-1.

OZKOR, M.A.; QUYYUMI, A.A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. **Cardiol. Res. Pract.**, v. 2011, p. 156146, 2011. DOI: 10.4061/2011/156146.

PANARO, M.A. et al. Toll-like receptor 4 mediates LPS-induced release of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by embryonal cardiomyocytes: biological significance and clinical implications in human pathology. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, n. 7, p. 766-774, 2010. DOI: 10.2174/138161210790883624.

PAPADAKOS, S.P. et al. The role of TLR4 in the immunotherapy of hepatocellular carcinoma: can we teach an old dog new tricks? **Cancers. (Basel)**, v. 15, n. 10, p. 2795, 2023. DOI: 10.3390/cancers15102795.

PARK, B.S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, 2009. DOI: 10.1038/nature07830.

PASSOS, G.F. et al. Kinin B<sub>1</sub> receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **J. Immunol.**, v. 172, n. 3, p. 1839-1847, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.172.3.1839.

PATCHING, S.G. Glucose transporters at the blood-brain barrier: function, regulation and gateways for drug delivery. **Mol. Neurobiol.**, v. 54, n. 2, p. 1046-1077, 2017. DOI: 10.1007/s12035-015-9672-6.

PENG, X. et al. Blood-brain barrier disruption by lipopolysaccharide and sepsis-associated encephalopathy. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 11, p. 768108, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.768108.

PERRIN, S.L. et al. Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 47, n. 2, p. 625-638, 2019. DOI: 10.1042/BST20180444.



PESQUERO, J.B. et al. Molecular cloning and functional characterization of a mouse bradykinin B<sub>1</sub> receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 224, n. 1, p. 281, 1996. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1020.

PESQUERO, J.B. et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 14, p. 8140-8145, 2000. DOI: 10.1073/pnas.120035997.

PLENDL, J. et al. Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells. **Biol. Chem.**, v. 381, n. 11, p. 1103-1115, 2000. DOI: 10.1515/BC.2000.135.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007. DOI: 10.1038/nri2171.

POTENTE, M. et al. Cytochrome P450 2C9-induced endothelial cell proliferation involves induction of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 inhibition of the c-Jun N-terminal kinase, and up-regulation of cyclin D1. **J. Biol Chem.**, v. 277, n. 18, p. 15671-15676, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M110806200.

PRADOS, M.D. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. **Neuro-Oncol.**, v. 5, n. 2, p. 96-103, 2003. DOI: 10.1093/neuonc/5.2.96.

PRASAIN, N.; STEVENS, T.S. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. **Microvasc. Res.**, v. 77, n. 1, p. 53-63, 2009. DOI: 10.1016/j.mvr.2008.09.012.

PRAT, A. et al. Kinin B<sub>1</sub> receptor expression and functional on human brain endothelial cells. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 59, n. 10, p. 896-906, 2000. DOI: 10.1093/jnen/59.10.896.

QADRI, F.; BADER, M. Kinin B<sub>1</sub> receptors as a therapeutic target for inflammation. **Expert. Opin. Ther. Targets.**, v. 22, n. 1, p. 31-44, 2018. DOI: 10.1080/14728222.2018.1409724.

QADRI, F. et al. Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors. **Biol. Chem.**, v. 397, n. 2, p. 97-109, 2016. DOI: 10.1515/hsz-2015-0206.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. The microenvironmental landscape of brain tumors. **Cancer Cell.**, v. 31, n. 3, p. 326-341, 2017. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.02.009.

QU, D. et al. Focal TLR4 activation mediates disturbed flow-induced endothelial inflammation. **Cardiovasc. Res.**, v. 116, n. 1, p. 226-236, 2020. DOI: 10.1093/cvr/cvz046.

QU, J. et al. Blocking ATP-sensitive potassium channel alleviates morphine tolerance by inhibiting HSP70-TLR4-NLRP3-mediated neuroinflammation. **J. Neuroinflammation.**, v. 14, n. 1, p. 228, 2017. DOI: 10.1186/s12974-017-0997-0.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An *in vivo* assay to test blood vessel permeability. **J. Vis. Exp.**, v. 16, n. 73, p. e50062, 2013. DOI: 10.3791/50062.

RAIDOO, D.M. et al. Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. **Immunopharmacology.**, v. 43, n. 2-3, p. 255-263, 1999. DOI: 10.1016/s0162-3109(99)00097-1.

RAJPUT, S. et al. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. **Mol. Cancer. Ther.**, v. 12, n. 8, p. 1676-1687, 2013. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1019.

RAMOS, L.A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006. DOI: 10.1590/S0100-40422006000500037.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 1980. <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/32/1/1>.

REGOLI, D.C. et al. Induction of B<sub>1</sub> receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 105-115, 1981. DOI: 10.1016/0014-2999(81)90391-5.

RIBEIRO-SILVA, J.C. et al. Dynamic crosstalk between vascular smooth muscle cells and the aged extracellular matrix. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 18, p. 10175, 2021. DOI: 10.3390/ijms221810175.

ROCHA E SILVA, M. et al. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol.**, v. 156, n. 2, p. 261-273, 1949. DOI: 10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261.

RODRIGUEZ, A. et al. Neurosurgical techniques for disruption of the blood-brain barrier for glioblastoma treatment. **Pharmaceutics.**, v. 7, n. 3, p. 175-187, 2015. DOI: 10.3390/pharmaceutics7030175.

RODRIGUES, E.S. et al. Evidence that kinin B<sub>2</sub> receptor expression is upregulated by endothelial overexpression of B<sub>1</sub> receptors. **Peptides.**, v. 42, p. 1-7, 2013. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.01.002.

RUSSELL, A.; WATTS, S. Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, n. 2, p. 598-604, 2000. <https://jpet.aspetjournals.org/content/294/2/598.long>.

SABOURIN, T. et al. Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, n. 7, p. 1154-1162, 2001. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704158.

SAKAMOTO, N. et al. Pathological changes after autologous formalin-fixed tumor vaccine therapy combined with temozolomide for glioblastoma – three case reports. **Neurol. Med. Chir. (Tokyo)**, v. 51, n. 4, p. 319-325, 2011. DOI: 10.2176/nmc.51.319.

SANTOS, M. de O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 69, n.1, p. e-213700, 2023. DOI: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>.

SCHAEFFER, P. et al. Detection of bradykinin B<sub>1</sub> receptors in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 3, p. 291-298, 2001. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00554-2.

SCHAPPE, M.S. et al. Chanzyme TRPM7 mediates the Ca<sup>2+</sup> influx essential for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 endocytosis and macrophage activation. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 59-74.e5, 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.11.026.

SCHARFSTEIN, J. et al. The kallikrein-kinin system in experimental Chagas disease: a paradigm to investigate the impact of inflammatory edema on GPCR-mediated pathways of host cell invasion by *Trypanosona cruzi*. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 396, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00396.

SCHREMMER-DANNINGER, E. et al. B<sub>1</sub> bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 243, n. 1, p. 246-252, 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7999.

SEYDEL, U. et al. A K<sup>+</sup> channel is involved in LPS signaling. **J. Endotoxin. Res.**, v. 7, n. 3, p. 243-247, 2001. DOI: 10.1177/09680519010070030901.

SHARMA, H.S. et al. Pathophysiology of blood-brain barrier in brain tumor. Novel therapeutic advances using nanomedicine. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 151, p. 1-66, 2020. DOI: 10.1016/bs.irn.2020.03.001.

SHARMA, P. et al. Tumor microenvironment in glioblastoma: current and emerging concepts. **Neurooncol. Adv.**, v. 5, n. 1, p. vdad009, 2023. DOI: 10.1093/noajnl/vdad009.

SIKPA, D. et al. Pharmacological modulation of blood-brain barrier permeability by kinin analogs in normal and pathologic conditions. **Pharmaceuticals. (Basel)**, v. 13, n. 10, p. 279, 2020. DOI: 10.3390/ph13100279.

SILVA, A.C. et al. Tumor growth analysis by magnetic resonance imaging of the C6 glioblastoma model with prospects for the assessment of magnetohyperthermia therapy. **Einstein. (Sao Paulo)**, v. 10, n. 1, p. 11-15, 2012. DOI: 10.1590/s1679-45082012000100004.

SILVA, L.S. et al. Kinins released by erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* enhance adhesion of infected erythrocytes to endothelial cell and increase blood

brain barrier permeability via activation of bradykinin receptors. **Front. Med. (Lausanne)**, v. 6, p. 75, 2019. DOI: 10.3389/fmed.2019.00075.

SIMON, T. et al. Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. **Oncogene**, v. 39, n. 23, p. 4477-4490, 2020. DOI: 10.1038/s41388-020-1308-2.

SINACORE, M.S. et al. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. **Mol. Biotechnol.**, v. 15, n. 3, p. 249-257, 2000. DOI: 10.1385/MB:15:3:249.

SIQUEIRA, M. et al. Radial glia cells control angiogenesis in the developing cerebral cortex through TGF- $\beta$ 1 signaling. **Mol. Neurobiol.**, v. 55, n. 5, p. 3660-3675, 2018. DOI: 10.1007/s12035-017-0557-8.

SMITH-COHN, M.A. et al. Molecularly targeted clinical trials. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 32, n. 2, p. 191-210, 2021. DOI: 10.1016/j.nec.2020.12.002.

SONG, H.K.; HWANG, D.Y. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. **Lab. Anim. Res.**, v. 33, n. 2, p. 119-123, 2017. DOI: 10.5625/lar.2017.33.2.119.

SONG, J.H. et al. TLR4 activation induces inflammatory vascular permeability via Dock1 targeting and NOX4 upregulation. **Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.**, v. 1868, n.12, p. 166562, 2022. DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166562.

SONI, V. et al. In vitro and in vivo enhancement of temozolomide effect in human glioblastoma by non-invasive application of cold atmospheric plasma. **Cancers (Basel)**, v. 13, n. 17, n. 4485, 2021. DOI: 10.3390/cancers13174485.

SOUZA, P.P.C. et al. Activation of Toll-like receptor 2 induces B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in human gingival fibroblasts and in mouse gingiva. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 2973, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37777-z.

SRIRAMULA, S. et al., Emerging role of kinin B<sub>1</sub> receptor in persistent neuroinflammation and neuropsychiatric symptoms in mice following recovery from SARS-CoV-2 infection. **Cells**, v. 12, n. 16, p. 2107. DOI: 10.3390/cells12162107.

STARK, R.J. et al. Endothelial nitric oxide synthase modulates Toll-like receptor 4-mediated IL-6 production and permeability via nitric oxide-independent signaling. **FASEB. J.**, v. 32, n. 2, p. 945-956, 2018. DOI: 10.1096/fj.201700410R.

STEEG, P.S. The blood-tumor barrier in cancer biology and therapy. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 18, n. 11, p. 696-714, 2021. DOI: 10.1038/s41571-021-00529-6.

SU, B. et al. Effect of retro-inverso isomer of bradykinin on size-dependent penetration of blood-brain tumor barrier. **Small**, v. 14, n. 7, 2018. DOI: 10.1002/smll.201702331.

SUN, D-P. et al. The bradykinin-BDKRB1 axis regulates *aquaporin 4* gene expression and consequential migration and invasion of malignant glioblastoma cells

via a  $\text{Ca}^{2+}$ -MEK1-ERK1/2-NF- $\kappa$ B mechanism. **Cancers. (Basel)**., v. 12, n. 3, p. 667, 2020. DOI: 10.3390/cancers12030667.

SUN, J. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. **Circ. Res.**, v. 90, n. 9, p. 1020-1027, 2002. DOI: 10.1161/01.res.0000017727.35930.33.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 51, n. D1, p. D638-D646, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac1000.

TANG, L. et al. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. **Arch. Oral. Biol.**, v. 56, n. 10, p. 1064-1072, 2011. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.020.

TANG, Z. et al. TLR4/PKC $\alpha$ /occludin signaling pathway may be related to blood-brain barrier damage. **Mol. Med. Rep.**, v. 18, n. 1, p. 1051-1057, 2018. DOI: 10.3892/mmr.2018.9025.

TAPPARO, A.F. Substituição do uso de soro fetal bovino na manutenção do cultivo de monocamada de células CER infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bursa de Fabrícus. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2009. <https://acervodigital.unesp.br/handle/11449/94831>.

TERSTAPPEN, G.C. et al. Strategies for delivering therapeutics across the blood-brain barrier. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 20, n. 5, p. 362-383, 2021. DOI: doi: 10.1038/s41573-021-00139-y.

TEWARI, R. et al. Involvement of TNF- $\alpha$ -induced TLR4-NF- $\kappa$ B and TLR4-HIF-1 $\alpha$  feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. **J. Mol. Med. (Berl)**., v. 90, n. 1, p. 67-80, 2012. DOI: 10.1007/s00109-011-0807-6.

TOMAN, N.P. et al. Profiling selectivity of chagasin mutants towards cysteine proteases cruzain or cathepsin L through molecular dynamics simulations. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 39, n. 16, p. 5940-5952, 2021. DOI: 10.1080/07391102.2020.1796797.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.07.054.

ULLAND, T.K. et al. NLRP12 mutation causes C57BL/6J strain-specific defect in neutrophil recruitment. **Nat. Commun.**, v. 7, p. 13180, 2016. DOI: 10.1038/ncomms13180.

VAJDA, S. et al. New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. **Proteins.**, v. 85, n. 3, p. 435-444, 2017. DOI: 10.1002/prot.25219.

VAN TELLINGEN, O. et al. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. **Drug. Resist. Updat.**, v. 19, p. 1-12, 2015. DOI: 10.1016/j.drug.2015.02.002.

VELAZQUEZ, O; WANG, B. Chapter 4. Cells of the Vascular System. In: Cronenwett J.L., Johnston K.W. ed. Rutherford's Vascular Surgery. 8th edition. London: Elsevier, 2784, 2014. <https://clinicalgate.com/cells-of-the-vascular-system/>.

WANG, F. et al. HMGB1 promoted P-glycoprotein at the blood-brain barrier in MCAO rats via TLR4/NF-kB signaling pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 880, p. 173189, 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173189.

WANG, L. et al. Intranasal delivery of temozolomide-conjugated gold nanoparticles functionalized with anti-EphA3 for glioblastoma targeting. **Mol. Pharm.**, v. 18, n. 3, p. 915-927, 2021. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00911.

WANG, P. et al. Systemic injection of low-dose lipopolysaccharide fails to break down the blood-brain barrier or activate the TLR4-MyD88 pathway in neonatal rat brain. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 6, p. 10101-10115, 2014. DOI: 10.3390/ijms150610101.

WANG, Y. et al. Temozolomide inhibits cellular growth and motility via targeting ERK signaling in glioma C6 cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 14, n. 6, p. 5732-5738, 2016. DOI: 10.3892/mmr.2016.5964.

WANG, Z. et al. Paeoniflorin inhibits glioblastoma growth in vivo and in vitro: a role for the Triad3A-dependent ubiquitin proteasome pathway in TLR4 degradation. **Cancer. Manag. Res.**, v. 10, p. 887-897, 2018. DOI: 10.2147/CMAR.S160292.

WEI, K-C. et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study. **PLoS. One.**, v. 8, n. 3, p. e58995, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0058995.

WEISS, N. et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1788, n. 4, p. 842-857, 2009. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.022.

WHALLEY, E.T. et al. Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. **Expert. Opin. Drug. Discov.**, v. 7, n. 12, p. 1129-1148, 2012. DOI: 10.1517/17460441.2012.729038.

WHELAN, R. et al. Modulating the blood-brain barrier: a comprehensive review. **Pharmaceutics.**, v. 13, n. 11, p. 1980, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111980.

WICK, M.J. et al. An optimized Evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse. **J. Vis. Exp.**, v. 139, p. 57037, 2018. DOI: 10.3791/57037.

WONG, D. et al. Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. **Exp. Neurol.**, v. 190, n. 2, p. 446-455, 2004. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.08.008.

WU, H. et al. Modulation of blood-brain tumor barrier for delivery of magnetic hyperthermia to brain cancer. **J. Control. Release.**, v. 355, p. 248-258, 2023. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.01.072.

WU, S. et al. Programmed cell death 10 increased blood-brain barrier permeability through HMGB1/TLR4 mediated downregulation of endothelial ZO-1 in glioblastoma. **Cell. Signal.**, v. 107, p. 110683, 2023. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110683.

XIAO, C.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 560, p. 41-45, 2005. DOI: 10.1007/0-387-24180-9\_5.

YIN, Y-L. et al. Molecular basis for kinin selectivity and activation of the human bradykinin receptors. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 28, n. 9, p. 755-761, 2021. DOI: 10.1038/s41594-021-00645-y.

YUEH, C. et al. ClusPro-DC: dimer classification by the cluspro server for protein-protein docking. **J. Mol. Biol.**, v. 429, n. 3, p. 372-381, 2017. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.10.019.

ZAMYATINA, A.; HEINE, H. Lipopolysaccharide recognition in the crossroads of TLR4 and caspase-4/11 mediated inflammatory pathways. **Front. Immunol.**, v. 11, n. 585146, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.585146.

ZEUNER, M. et al. Controversial role of toll-like receptor 4 in adult stem cells. **Stem. Cell. Rev. Rep.**, v. 11, n. 4, p. 621-634, 2015. DOI: 10.1007/s12015-015-9589-5.

ZHANG, M. et al. Upregulating aggregation-induced-emission nanoparticles with blood-tumor-barrier permeability for precise photothermal eradication of brain tumors and induction of local immune responses. **Adv. Mater.**, v. 33, n. 22, p. e2008802, 2021. DOI: 10.1002/adma.202008802.

ZHANG, Q. et al. Increase in blood-brain barrier permeability is modulated by tissue kallikrein via activation of bradykinin B1 and B2 receptor-mediated signaling. **J. Inflamm. Res.**, v. 14, p. 4283-4297, 2021. DOI: 10.2147/JIR.S322225.

ZHANG, X. et al. Characterization of dual agonists for kinin B1 and B2 receptors and their biased activation of B2 receptors. **Cell. Signal.**, v. 24, n. 8, p. 1619-1631, 2012. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.04.002.

ZHENG, X. et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotide loaded spermine-modified acetalated dextran nanoparticles for B1 receptor-targeted genes therapy and antiangiogenesis therapy. **Adv. Sci. (Weinh.)**, v. 9, n. 5, p. e2103812, 2022. DOI: 10.1002/advs.202103812.

ZONG, H. et al. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 7, n.5, p. a020610, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a020610.