

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAFAEL SANGUINETTI CZEPIELEWSKI

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA SOBRE RESPOSTAS IMUNES**

PORTO ALEGRE

2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO PEPTÍDEO
LIBERADOR DE GASTRINA SOBRE RESPOSTAS IMUNES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Autor

Rafael Sanguinetti Czepielewski

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Cristina Bonorino

Co-orientadora

Dr^a. Bárbara Nery Porto

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer solenemente e intensamente à Dra. Bárbara Nery Porto. Sem ela, este trabalho não existiria, e um mestrado em 7 meses não seria possível. Dedico este trabalho a ela. Não é fácil conseguir conviver comigo tanto tempo. Obrigado pelos ensinamentos e os inúmeros momentos alegres desfrutados no laboratório até altas horas, juntamente com a Dra. Ana Paula Souza. Esta, sempre esteve disposta a auxiliar em tudo o que foi possível, da maneira mais meiga existente, contribuindo essencialmente para a estrutura de nosso grupo de pesquisa, formando o que ele é hoje. Agradeço imensamente a ela também por todos os ensinamentos, de básicos a discussões científicas.

Outro agradecimento caloroso vai a todos os colegas da pesquisa, principalmente ao Thiago Borges, Priscila Salvato, Andréia Wieck, Carine Prado, Lucas Rizzo, Talita Siara e Taiane Garcia. Todos foram fundamentais em manter-me no caminho para alcançar a conclusão deste projeto. Permitiram que as incessantes desilusões da pesquisa fossem sobrepujadas pelo companheirismo e auxílio mútuo. Além dos resultados na pesquisa, ficam histórias e diversos acontecimentos muito marcantes, que sempre serão por mim guardados, principalmente os ocorridos nos congressos! Um agradecimento especial ao amigo Thiago Borges, por carregar comigo a diferença de gênero, dentro de um laboratório feminino, além de todas as conversas científicas e ajudas nos experimentos e fora deles. Outro adendo também para o amigo Lucas Rizzo, por ter se desdobrado em dois para me auxiliar num Western Blot que nunca funcionou direito. E a todos as estagiárias, o obrigado pelas ajudas e desculpa pela minha irreverência.

Não posso deixar de fazer menção à minha companheira e namorada Laura Roesler Nery, pelos vários finais de semana que me ajudou em experimentos, nas mais diversas condições. Mas principalmente pelo apoio incondicional para manter-me no foco original de minhas aspirações. Com certeza esse trabalho teria sido descontinuado, ou até nem iniciado, se não fosse o apoio dela. Te amo.

Porém, nunca teria chegado até aqui sem a motivação constante de minha família. E dedico a meus pais e irmã todo o meu empenho na confecção e conclusão, um tanto tardia, deste projeto. Para mim, não existe sucesso sem eles. Obrigado por estarem sempre antes, durante e depois de minhas escolhas.

Dedido também esse trabalho a todos meus amigos mais próximos, que não são da área científica, para quem sou apenas um “matador de ratos”. Fica o agradecimento pelo interesse e envolvimento com a minha causa.

Finalmente, cabe a mim agradecer ao apoio financeiro do CNPq e a minha orientadora Dra. Cristina Bonorino, que me ensinou que a sorte é muito importante na pesquisa, assim como é essencial estar sempre em contato, fazendo conexões, com alegria.

“All truths are easy to understand once they are discovered;
the point is to discover them”.

Galileo Galilei

“No amount of experimentation can ever prove me right;
a single experiment can prove me wrong”.

Albert Einstein

“If you live each day as if it was your last,
someday you'll most certainly be right”

RESUMO

Neutrófilos são os principais personagens do processo inflamatório, tanto na imunidade inata como adaptativa. Sua migração para os sítios inflamatórios é crucial para o início da inflamação, assim como para o controle de infecções, apresentando envolvimento na perpetuação de diferentes doenças inflamatórias crônicas. O peptídeo liberador de gastrina (GRP: *Gastrin-releasing peptide*) é um neuropeptídeo que atua via receptores ligados a proteína G e que está envolvido em diferentes funções fisiológicas, atuando da motilidade gastrointestinal à modulação da memória. Seu receptor preferencial, GRPR (*Gastrin-releasing peptide receptor*), é expresso em vários tipos celulares, incluindo os sistemas gástrico, respiratório e nervoso, tendo sua expressão aumentada em células tumorais. RC-3095 é um dos antagonistas seletivos de GRPR, desenvolvido para o tratamento de câncer. Mais recentemente, o RC-3095 mostrou-se com propriedades anti-inflamatórias no tratamento de artrite e sepse. Os mecanismos pelos quais o GRP e o RC-3095 afetam o crescimento tumoral e o sistema imune ainda não foram totalmente determinados. Neste estudo, nós propomos caracterizar os efeitos pró-inflamatórios do GRP na indução de migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que o GRPR atua como um receptor quimiotático para neutrófilos. Injeções intraperitoneais de GRP recrutaram neutrófilos em quatro horas, um fenômeno antagonizado pelo RC-3095, depleção de macrófagos ou neutralização do TNF- α . Além disso, o GRP apresentou um efeito direto *in vitro*, atuando como quimiocina na indução de migração através da sinalização por GRPR, um mecanismo que é dependente de PI3K, ERK, p38 e independente de proteína G α i, demonstrando que o GRPR é um receptor quimiotático alternativo. Interessantemente, a migração de neutrófilos *in vitro* em direção ao líquido sinovial de pacientes com artrite foi abolida com o pré-tratamento com RC-3095, em uma magnitude comparada ao bloqueio do CXCR2. Discutimos aqui as implicações dessas descobertas para os tratamentos baseados no antagonista de GRPR em doenças inflamatórias e propomos que o GRPR é um novo receptor quimiotático alternativo que está envolvido nessa patogênese destes distúrbios.

ABSTRACT

Neutrophils are major players in inflammatory processes both in innate and adaptive immunity. Their migration to inflamed sites is crucial both for the initiation of inflammation as well as resolution of infection, and yet they are involved in the perpetuation of different chronic inflammatory diseases. Gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuropeptide that acts through G-protein coupled receptors involved in different physiological functions, from gastrointestinal motility to modulation of memory. The preferential receptor, GRPR (Gastrin-releasing peptide receptor), is expressed by various cell types, including the gastric, respiratory and nervous system, being over expressed on cancer cells. RC-3095 is one of GRPR's selective antagonists, developed for cancer treatment. More recently, RC-3095 has been found to have anti-inflammatory properties in arthritis and sepsis. The mechanism underlying GRP and RC-3095 effects in tumor growth and immune suppression has not been fully determined. In this study, we propose to characterize the pro-inflammatory effects of GRP on the migratory induction of leucocytes *in vitro* and *in vivo*, demonstrating that GRPR acts as a chemotactic receptor for neutrophils. Intraperitoneal injection of GRP attracts neutrophils in four hours, a phenomenon that is antagonized by RC3095 and macrophage depletion or neutralization of TNF- α . More importantly, GRP has a direct chemokine-like effect on neutrophils *in vitro*, inducing migration through GRPR signaling, in a mechanism dependent on PI3K, ERK and p38 and independent of G α i protein, demonstrating that GRPR is an alternative chemokine receptor. Interestingly, *in vitro* neutrophil migration towards synovial fluid of arthritis patients is abolished by pretreatment with RC-3095, in a magnitude comparable to blocking of CXCR2. We discuss the implications of these findings for GRPR antagonist-based treatment for inflammatory diseases and propose that GRPR is a new alternative chemokine receptor involved these pathogeneses.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - ALINHAMENTO DE AMINOÁCIDOS DOS PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA DA BOMBESINA.....	8
FIGURA 2 – PROCESSAMENTO DO PREPROGRP ATÉ O PEPTÍDEO FUNCIONAL GRP ₁₈₋₂₇	8
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GRPR.....	9
TABELA 1 – AFINIDADE AOS RECEPTORES NA FAMÍLIA DA BOMBESINA.....	11
TABELA 1 – PRESENÇA DE GRP E GRPR EM TUMORES HUMANOS.....	12

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1	1
1.1. INTRODUÇÃO	2
1.1.1. Resposta inflamatória	2
1.1.2. Migração e papel de neutrófilos	4
1.1.3. Receptores ligados à proteína G	6
1.1.4. Peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor (GRPR)	7
1.1.5. GRP e a resposta imune	14
1.2. OBJETIVOS	16
1.2.1. Objetivos Específicos	16
2. CAPÍTULO 2	17
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO	I
3. CAPÍTULO 3	50
3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO 1	74

1. CAPÍTULO 1

1.1.INTRODUÇÃO

1.1.1 Resposta inflamatória

A função do sistema imune é prevenir seu organismo de ser tomado por genomas diferentes dos codificados por sua linhagem germinativa, desempenhando diversos controles para eliminar interações excessivas dessa natureza, assim como remover células mortas e promover plasticidade celular durante o desenvolvimento. (Nathan, 2002; 2006; Vivier, Raulet, Moretta *et al.*, 2011).

Para promover esse controle, o sistema imune é comumente classificado de duas formas: sistema imune adaptativo e sistema imune inato. A imunidade adaptativa é encontrada em vertebrados e caracterizada por dois tipos de linfócitos: linfócitos T e linfócitos B. Estes expressam grande repertório de receptores para antígenos produzidos por recombinação, conhecidos como receptores de células T (TCR – *T cell receptor*) e anticorpos/receptores de células B (BCR – *B cell receptors*). Células T e B imaturas são apresentadas a antígenos pelas células apresentadoras de antígeno (APC – *antigen presenting cells*), rumando para órgãos linfóides específicos, onde realizam divisão clonal e maturam para exercerem suas funções efetoras. Por conseguinte, estas células atuam de maneira específica e têm a capacidade de gerar memória aos antígenos para os quais são expostas (Meffre, Casellas e Nussenzweig, 2000; Marrack, Scott-Browne, Dai *et al.*, 2008; Lund e Randall, 2010; Macleod, Kappler e Marrack, 2010).

O sistema imune inato é representado por uma variedade de células distintas de origem mielóide ou linfóide, como neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas, que exercem rápida função efetora, atuando com um limitado repertório de receptores geneticamente definidos. Estas células desencadeiam respostas imediatas nas infecções e danos celulares, causando inflamação, sem promover uma resposta duradoura. Entretanto, esta classificação é apenas utilizada como convenção para facilitar o entendimento de seus funcionamentos, porque ambas classificações do sistema imune (inato e adaptativo) atuam de maneira sinérgica e dependente para devolver a resposta adequada ao estímulo e promover o retorno à homeostase (Vivier, Raulet, Moretta *et al.*, 2011).

A vigilância promovida pelas células do sistema imune inato sobre agentes microbianos é realizada através dos receptores especializados que reconhecem moléculas conservadas e exclusivamente expressas por microorganismos. Essas moléculas são denominadas de *padrões moleculares associados a patógenos* (PAMPs) e são identificadas pelos *receptores de reconhecimento de padrão* (PRRs) (Medzhitov, 2001). Os PAMPs apresentam uma estrutura altamente conservada e invariante porque desenvolvem funções essenciais para a sobrevivência microbiana. Sendo assim, a imunidade inata tem a capacidade de identificar um grande número de classes de microorganismos com um número limitado de PRRs (Inohara e Nunez, 2003).

Atualmente os PRRs são divididos em: *Toll-like receptors* (TLRs) que são proteínas transmembrana localizadas na superfície celular e no endossomo, *NOD-like receptors* (NLRs) que são localizadas no citoplasma, *RIG-I-like receptors* (RLRs) que são também localizadas intracelularmente e envolvidas na resposta antiviral, e *absence in melanoma 2-like receptors* (AIM-2) que são caracterizadas por um domínio de reconhecimento de DNA microbiano, entre outros (Chen e Nunez, 2010). A partir do reconhecimento do ligante ou ruptura celular, esses receptores ativam vias de sinalização como NF- κ B, MAPKs e int rferon do tipo I, que resultam no aumento de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras respostas antimicrobianas (Hajishengallis e Lambris, 2011).

Os PRRs também reconhecem os *padrões moleculares associados a danos* (DAMPs), que são moléculas endógenas não-microbianas liberadas durante lesões ou morte celular. Esse reconhecimento dos DAMPs promove uma resposta semelhante ao combate microbiano, apesar da ausência de PAMPs, e por isso   chamada de “inflama o estéril” (Hajishengallis e Lambris, 2011). Os DAMPs são fatores geralmente intracelulares, e por isso ficam isolados de sua identifica o pelo sistema imune. A inflama o estéril desenvolve-se quando a morte celular ocorre via necrose, ao invés da morte celular programada (apoptose). Na apoptose, uma cascata de eventos promovida pela via das caspases gera uma retra o celular, causando perda de aderência com a matriz extracelular e com células vizinhas, a membrana celular forma prolongamentos, gerando corpos apoptóticos, a cromatina   condensada, e o DNA e o núcleo são fragmentados, além da exposi o extracelular das moléculas de fosfatidilserina contidas normalmente na face intracelular da membrana plasmática, o que promove um sinal para sua fagocitose (Li, Sarkisian, Mehal *et al.*, 2003). Porém, durante um processo necrótico a diferença marcante   a ruptura da membrana, liberando todo material intracelular, podendo ser reconhecido

pelos PRRs como DAMPs, como por exemplo, o DNA pelo TLR ou AIM2 (Fernandes-Alnemri, Yu, Datta *et al.*, 2009; Imaeda, Watanabe, Sohail *et al.*, 2009) e o ATP pelo NLR (Iyer, Pulskens, Sadler *et al.*, 2009).

Após o reconhecimento tanto de PAMPs como DAMPs, a resposta imune inata segue de maneiras similares, promovendo recrutamento de neutrófilos e macrófagos, e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, principalmente TNF e IL-1 (Chen e Nunez, 2010).

1.1.2. Migração e papel de neutrófilos

Respostas inflamatórias são coordenadas pela migração de leucócitos pelo sangue, órgãos linfóides secundários e tecidos inflamados (Luster, Alon e Von Andrian, 2005), onde células imunes residentes (macrófagos, monócitos ou células dendríticas) ou tecidos locais produzem citocinas e quimiocinas ao interagirem com um estímulo para desencadear a resposta (Stadnyk, 1994; Gordy, Pua, Sempowski *et al.*, 2010). Isto promove a migração de leucócitos do sangue para o sítio da inflamação (Vicente-Manzanares e Sanchez-Madrid, 2004; Nathan, 2006). O principal personagem nessa comunicação intercelular são as citocinas – uma família de pequenas moléculas solúveis (podendo ser peptídeos, proteínas ou glicoproteínas) secretadas por células imunes e alguns tecidos (Akdis, Burgler, Cramer *et al.*, 2011). Elas promovem diversas formas de imunomodulação utilizando receptores específicos e atuando em concentrações extremamente baixas (nano até picomolar) (Petrovsky e Harrison, 1998). Dentro dessa família, existem as citocinas que induzem quimiotaxia, consideradas citocinas quimiotáticas, também chamadas de *quimiocinas* (Thelen e Stein, 2008). As quimiocinas são moléculas pequenas (em sua maioria proteínas) de 8 a 14 kDa e responsáveis pela regulação desse tráfego de leucócitos no sistema imune (Rollins, 1997; Van Buul e Hordijk, 2004; Allen, Crown e Handel, 2007).

Além de quimiocinas, outras moléculas que também estimulam migração leucocitária são denominadas fatores quimiotáticos, podendo ter origem de peptídeos bacterianos (por exemplo, formil-Met-Leu-Fe, ou fMLP), mediadores lipídicos ou componentes do sistema complemento. Os fatores quimiotáticos que induzem o recrutamento de neutrófilos são produzidos por diversos tipos celulares, como: macrófagos, monócitos, linfócitos, plaquetas, os próprios neutrófilos e

células endoteliais, epiteliais e parenquimais (Van Buul e Hordijk; Vicente-Manzanares e Sanchez-Madrid, 2004).

O recrutamento de neutrófilos é essencial para a resposta inflamatória, porque são os primeiros leucócitos a chegarem ao sítio de inflamação (nas primeiras 12 horas após o estímulo), sendo guiados pelos fatores quimiotáticos, e após são substituídos por macrófagos e/ou eosinófilos (Ali, Haribabu, Richardson *et al.*, 1997; Soehnlein e Lindbom, 2010). Para alcançarem a região inflamatória, os neutrófilos migram governados por um gradiente de concentração dos fatores quimiotáticos, respondendo à indução solúvel de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6, e TNF), de quimiocinas (como CXCL1, CXCL2 e principalmente CXCL8, também conhecida como IL-8), do quinto fragmento do sistema complemento ativado (C5a), de mediadores lipídicos (como prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, ou PAF, e leucotrienos, principalmente o leucotrieno B4, LTB4), assim como fatores exibidos na matriz extracelular ou apresentados na superfície de outras células (Van Buul e Hordijk; Vicente-Manzanares e Sanchez-Madrid, 2004; Soehnlein e Lindbom, 2010).

No sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de controlar o foco infeccioso com diferentes aparatos celulares microbicidas. Estão equipados com grânulos contendo polipeptídeos antimicrobianos (como defensinas e proteases), que são secretados em vesículas logo após adentrarem no tecido (Faurischou e Borregaard, 2003). Porém, o principal mecanismo existente é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pelo complexo multienzimático ligado a membrana e a enzima NADPH oxidase. Este complexo reduz o oxigênio molecular a ânion superóxido, podendo ser convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), e este reagir com íons cloreto e produzir ácido hipocloroso (Nathan, 2006; Dale, Boxer e Liles, 2008). Todos esses reagentes oxidados têm grande potencial microbicida, atuando tanto no fagossomo como no espaço extracelular.

Mais recentemente, identificou-se que neutrófilos têm ainda a capacidade de liberar seu conteúdo nuclear, expondo a cromatina e proteínas associadas, como proteases, num processo chamado de *neutrophil extracellular traps* (NETs). As histonas presentes na cromatina, assim como grânulos, formam uma rede que prende e reage com agentes microbianos. Esse fenômeno é ativado via TLR, receptores Fc, quimiocinas e citocinas (Brinkmann, Reichard, Goosmann *et al.*, 2004; Papayannopoulos e Zychlinsky, 2009).

1.1.3. Receptores ligados à proteína G

As quimiocinas são as principais agentes controladoras do tráfego de leucócitos, promovendo quimiotaxia através de receptores específicos da família de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Thelen, 2001). Esses receptores são caracterizados por apresentarem sete domínios transmembranas e sua ativação promove polimerização de actina e assim comandando mudanças morfológicas necessárias para a movimentação celular, juntamente com influências nas moléculas de adesão expressas (Van Buul e Hordijk, 2004; Vicente-Manzanares e Sanchez-Madrid, 2004). A ativação dos GPCRs também promove ativação celular, exocitose e apoptose, através de diferentes vias de sinalização (Rose, Foley, Murphy *et al.*, 2004).

Predominantemente, os receptores de quimiocinas promovem sua sinalização através de proteínas G sensíveis à toxina Pertussis (PTx), da classe proteínas G-alfa inibitória ($G_{\alpha i}$) (Spangrude, Sacchi, Hill *et al.*, 1985; Wettschureck e Offermanns, 2005). Quando a quimiocina liga-se ao receptor em sua porção extracelular, ocorre o desencadeamento de uma mudança estrutural e ativação da proteína heterotrimérica. Essa ativação induz da troca de difosfato de guanosina (GDP) presente no estado basal inativo da proteína ligado à subunidade $G_{\alpha i}$, por trifosfato de guanosina (GTP), o que gera a dissociação do receptor e da proteína heterotrimérica em subunidades $G_{\alpha i}$ e $G\beta\gamma$ (Wettschureck e Offermanns, 2005). A subunidade $G_{\alpha i}$ inibe a adenilato ciclase (Katanaev, 2001) e as subunidades $G\beta\gamma$ prosseguem a sinalização para quimiotaxia (Neptune e Bourne, 1997), ativando fosfolipases ($PLC\beta$), e proteínas quinases, como fosfoinositol 3-quinase (PI3K, principalmente a isoforma γ – $PI3K\gamma$). Isto resulta em acúmulo de mediadores intracelulares, como fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), fluxo de cálcio e ativação de GTPases monoméricas, as quais coordenam os processos de adesão celular, polimerização de actina e eventos contráteis que polarizam a célula e permitem o movimento celular (Wu, Huang e Jiang, 2000; Cicchetti, Allen e Glogauer, 2002; Niggli, 2003; Rot e Von Andrian, 2004; Ward, 2004).

Durante o processo inflamatório, diferentes mediadores inflamatórios (PAMPs, DAMPs e outros fatores produzidos pelo organismo como citocinas e quimiocinas) podem estar presentes simultaneamente. Porém, o neutrófilo tem preferência em migrar em direção aos quimioatraentes derivados de patógenos, mesmo quando expostos a estímulos do organismo, como IL-8. Esse processo é guiado através da ativação seletiva de vias de sinalização específicas. Os derivados de

patógenos atuam primariamente através da ativação da p38/MAPK, e os derivados do organismo ativam a via de PI3K/AKT. A ativação da p38 inibe a via da PI3K/AKT, fazendo o neutrófilo migrar preferencialmente em direção aos estímulos derivados dos patógenos (Heit, Tavener, Raharjo *et al.*, 2002).

A via de migração através de proteína G α i tem um papel crítico na indução da migração dependente de quimiocinas, sendo postulada com o via clássica de estimulação migratória. Porém, os receptores quimiotáticos podem funcionar através de outras proteínas G, apresentando vias alternativas da migração de células imunes, principalmente em neutrófilos (Gerard e Gerard, 1994; Shi, Partida-Sanchez, Misra *et al.*, 2007). A principal via alternativa encontrada ocorre através de receptores ligados à proteína G α q, na qual a ligação do agonista (fator quimiotático) promove a liberação das subunidades G α q e $\beta\gamma$. A proteína G α q estimula diretamente PLC β 2 e β 3 a produzir mensageiros intracelulares trifosfato inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 desencadeia a liberação de cálcio dos estoques intracelulares e o DAG ativa a PKC, ativando outras vias de sinalização que irão promover indiretamente a ativação de PI3K, até fatores de transcrição como NF- κ B (Neves, Ram e Iyengar, 2002). Essa via alternativa é estimulada apenas por alguns fatores quimiotáticos, como fMLP, e encontrada atuante em certas populações leucocitárias, como neutrófilos e células dendríticas (DCs), não apresentando função em células T e B para esses fatores quimiotáticos (Shi, Partida-Sanchez, Misra *et al.*, 2007).

1.1.4. Peptídeo liberador de gastrina (GRP) e seu receptor (GRPR)

O tetrapeptídeo bombesina (BB) foi primeiramente caracterizado e isolado a partir da pele dos anfíbios *Bombina bombina* (Erspamer, Erpamer e Inselvini, 1970). Porém, somente após uma década foram identificados peptídeos similares a bombesina em mamíferos. Estes foram descobertos através da resposta antigênica contra o análogo anfíbio e nomeados como peptídeo liberador de gastrina (*Gastrin-releasing peptide*: GRP) devido ao seu papel inicialmente proposto na indução da secreção de gastrina pelas células G do antro gástrico (McDonald, Jornvall, Nilsson *et al.*, 1979), e neuromedina B (neuromedin B: NMB), em função de sua atuação neuromoduladora (Minamino, 1983). Estes peptídeos apresentam em sua porção carboxi-terminal um grupamento metilamida (Figura 1), e assim como outros neuropeptídeos com esse

Família dos peptídeos da Bombesina

Bombesina

pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-**Trp-Ala**-Val-**Gly**-His-Leu-**Met-NH₂**

GRP

Gly-Asn-His-**Trp-Ala**-Val-**Gly**-His-Leu-**Met-NH₂**

Neuromedina B

Gly-Asn-Leu-**Trp-Ala**-Thr-**Gly**-His-Phe-**Met-NH₂**

Figura 1 - Alinhamento de aminoácidos dos peptídeos da família da Bombesina.

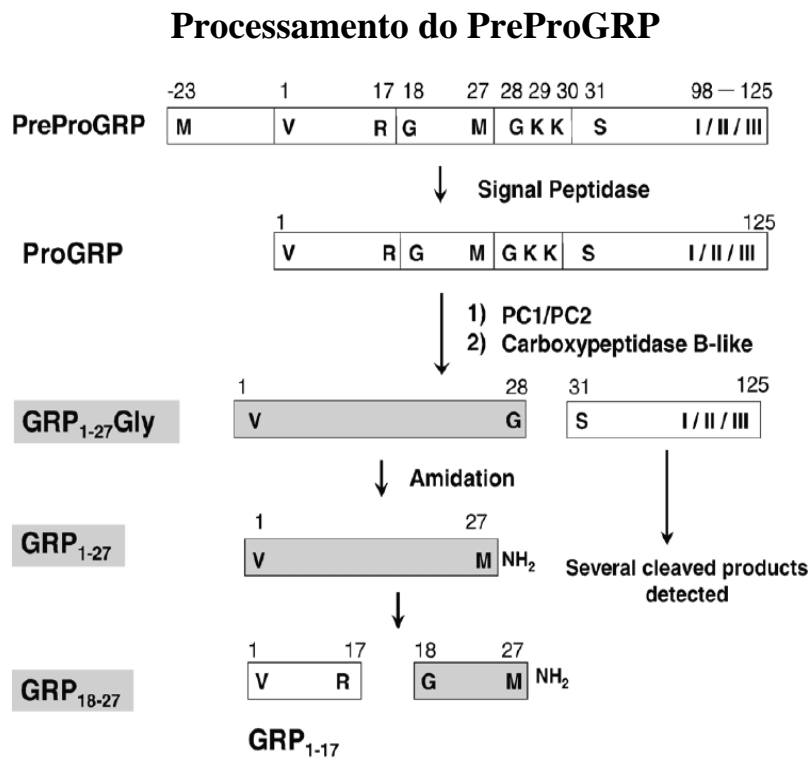


Figura 2 – Processamento do PreProGRP até o peptídeo funcional GRP₁₈₋₂₇.

Wada, Aoki *et al.*, 2005; Luft, Flores, Vianna *et al.*, 2006; Roesler, Luft, Oliveira *et al.*) e em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia (Roesler, Meller, Kopschina *et al.*, 2003; Roesler, Henriques e Schwartzmann; Roesler, Kopschina, Rosa *et al.*; Roesler, Lessa, Venturella *et al.*; Roesler, Henriques e Schwartzmann; Roesler, Luft, Oliveira *et al.*). O GRP também está envolvido no desenvolvimento fetal dos pulmões (Li, Nagalla e Spindel, 1994; Sunday, Yoder, Cuttitta *et al.*, 1998; Subramaniam, Sugiyama, Coy *et al.*, 2003; Shan, Emanuel, Dewald *et al.*, 2004) e como fator de crescimento de tecidos e tumores (Jensen, Carroll e Benya, 2001; Patel, Shulkes e Baldwin, 2006; Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007).

O GRP promove seu efeito através da ativação de receptores com sete domínios transmembrana, acoplados à proteína G, e promovendo suas funções através de proteína Gαq (Figura 3) (Corjay, Dobrzanski, Way *et al.*, 1991; Hellmich, Battey e Northup, 1997). Existem quatro subtipos de receptores descritos e clonados para família do GRP (*Bombesin-like peptides*: BLP): GRPR (Spindel, Gibson, Reeve *et al.*, 1990; Battey, Way, Corjay *et al.*, 1991), NMBR, BRS-3 e BB4-R (Jensen, Battey, Spindel *et al.*, 2008). Porém, somente três destes estão presentes em mamíferos, sendo o BB4-R encontrado apenas no cérebro de anfíbios (Nagalla, Barry, Creswick *et al.*, 1995). O BB4-R caracteriza-se por uma maior afinidade pela BB em comparação ao GRP, apresentando 56%, 61% e 70% de homologies ao GRPR, NMBR e BRS-3 humanos, respectivamente (Nagalla, Barry, Creswick *et al.*, 1995). O NMBR é assim nomeado devido a sua alta afinidade por NMB (100 vezes maior do que para GRP) e tem homologia de 55% com GRPR e 47% com BRS-3 (Fathi, Benya, Shapira *et al.*, 1993).

O GRPR humano apresenta 384 aa, com uma alta homologia (90 % de identidade entre os aa) com o GRPR de camundongos e uma identidade de 55% com o NMBR e de 51% com o BRS-3 (Corjay, Dobrzanski, Way *et al.*, 1991). Estes receptores também apresentam outra nomenclatura, onde NMBR, GRPR e o BRS-3 são denominados como *Bombesin 1 receptor* (BB1-R), *BB2 receptor* (BB2-R) e *BB3 receptor* (BB3-R), respectivamente (Jensen, Battey, Spindel *et al.*, 2008).

O GRPR é também chamado de *GRP preferring receptor*. Isso se deve à similaridade dos peptídeos que se ligam a esses receptores, causando uma ativação inespecífica, porém preferencial entre peptídeos e receptores de mesma nomenclatura por competição ao sítio de ligação (Tabela 1). O GRPR já foi clonado em 21 espécies e observou-se que as regiões mais

conservadas são os domínios transmembrana e o terceiro domínio intracelular, assegurando a importante função efetora do receptor na ativação do receptor e a inespecificidade das porções extracelulares que realizam os contatos com seus peptídeos agonistas (Ohki-Hamazaki, Iwabuchi e Maekawa, 2005; Baldwin, Patel e Shulkes, 2007). Essa ausência de especificidade pode demonstrar uma atividade altamente regulada para as concentrações e o balanço desses peptídeos fisiologicamente (Jensen, Battey, Spindel *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Afinidade aos receptores na família da Bombesina. Adaptado de Patel *et al.*, 2006.

Peptídeo	Afinidade ao receptor (nM)	
	GRPR	NMBR
Bombesina	2.1 ± 0.1 ^a	32 ± 2 ^b
GRP	6.6 ± 1.3 ^a	4800 ^b
NMB	700 ± 200 ^a	1.8 ± 0.3 ^b

Linhagens celulares: ^a Linha celular colorretal humana; ^b Fibroblasto 3T3 de camundongo Balb/C transfectado com NMBR humana.

O gene que codifica para GRPR está localizado (tanto em humanos, como em camundongos) no cromossomo X e a regulação de sua expressão já foi elucidada (Maslen e Boyd, 1993; Xiao, Wang, Hampton *et al.*, 2001).

A distribuição da expressão do mRNA de GRPR foi observada em várias espécies e em diferentes órgãos e sistemas. Em roedores foi mostrado um importante papel da presença de GRPR no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, respiratório, urogenital e gastrointestinal (Battey, Wada e Wray, 1994), sendo também expresso no trato digestivo, cólon e CNS (Moody e Merali, 2004; Kamichi, Wada, Aoki *et al.*, 2005). O receptor de GRP humano (hGRPR) vem sendo pesquisado em tecidos e tumores. Em células de fenótipo normal ele encontra-se mais expresso no pâncreas e em menos quantidade no estômago, próstata, musculatura esquelética e lisa, córtex adrenal (Ferris, Carroll, Lorimer *et al.*, 1997; Xiao, Wang, Hampton *et al.*, 2001).

Funcionalmente, o GRPR foi inicialmente observado no trato gastrointestinal na regulação da secreção gástrica na liberação de gastrina das células G, juntamente com a

somatostatina das células D (Schubert, Hightower, Coy *et al.*, 1991; Schubert), na regulação da mobilidade gastrointestinal (Degen, Peng, Collet *et al.*, 2001; Yegen, 2003), na estimulação da secreção pancreática (Nielbergall-Roth e Singer, 2001) e na liberação de insulina (Persson, Pacini, Sundler *et al.*, 2002). Além disso, o GRPR apresenta um papel importante no CNS, estando relacionado com doenças psiquiátricas e desordens neurológicas como ansiedade, esquizofrenia, autismo, demência, pânico e desordens alimentares como anorexia nervosa, bulimia e depressão (Roesler, Henriques e Schwartzmann, 2004; Hodges, Weissman, Haghighi *et al.*, 2009).

O GRP e a BB são considerados agentes mitogênicos, induzindo a proliferação e crescimento celular (Rozenfurt e Sinnott-Smith, 1983; Willey, Lechner e Harris, 1984; Lehy, Puccio, Chariot *et al.*, 1986; Puccio e Lehy, 1989), além de apresentarem efeitos protetores sobre a mucosa gastrointestinal (Mercer, Cross, Chang *et al.*, 1998; Gunal, Oktar, Ozcinar *et al.*, 2002).

Porém, estes peptídeos também atuam como importantes fatores de crescimento tumoral em uma diversificada gama de cânceres (Patel, Shulkes e Baldwin, 2006; Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007) (Tabela 2). Esta ação foi primeiramente identificada no câncer de pulmão de pequenas células humano (*Small-cells lung cancer: SCLC*) (Cuttitta, Carney, Mulshine *et al.*, 1985). Neste mesmo trabalho foi proposta a hipótese autócrina para o GRP, onde o próprio tumor produziria o fator de crescimento (neste caso o GRP) e seus receptores, gerando uma indução própria de sua proliferação (Cuttitta, Carney, Mulshine *et al.*, 1985). Além do SCLC, o GRP é encontrado em muitos tumores (Tabela 2), porém sem registros para sua presença em adenocarcinomas gástricos (Patel, Shulkes e Baldwin, 2006).

Tabela 2 – Presença de GRP e GRPR em tumores humanos. Adaptado de Patel *et al.*, 2006.

Câncer	GRP				GRPR			
	Nº positivo/		Método	Referência	Nº positivo/		Método	Referência
Nº Total	%	Nº Total			%			
Pulmão (SCLC)	23/31	74	RIA	Wood <i>et al.</i> , 1981	17/20	85	PCR	Toi-Scott <i>et al.</i> , 1996
		71	RIA	Maruno <i>et al.</i> , 1989	11/38	29	PCR	Shingyoji <i>et al.</i> , 2003
	9/20	45	RIA	Guinee <i>et al.</i> , 1994	3/9	33	BD	Reubi <i>et al.</i> , 2002
	16/32	50	PCR	Saito <i>et al.</i> , 2003				
Próstata	18/30	60	IH	Constantinides <i>et al.</i> , 2003	30/30	100	BD	Markwalder e Reubi 1999

	27/42	64	IH	Ishimaru <i>et al.</i> , 2002	50/80	63	BD	Sun <i>et al.</i> , 2000
					20/22	91	PCR	Sun <i>et al.</i> , 2000
					12/12	100	BD	Reubi <i>et al.</i> , 2002
<i>Mama</i>	16/41	39	RIA	Yashi <i>et al.</i> , 2002	33/100	33	BD	Halmos <i>et al.</i> , 1995
	5/28	18	NB	Pagani <i>et al.</i> , 1991	29/46	63	BD	Gugger e Reubi, 1999
					41/57	72	BD	Reubi <i>et al.</i> , 2002
<i>Gástrico</i>					13/23	50	BD	Preston <i>et al.</i> , 1993
					8/20	40	PCR	Carroll <i>et al.</i> , 1999b
<i>Pancreático</i>	52/88	59	RIA	Sessa <i>et al.</i> , 1990	2/26	8	PCR	Ehlers <i>et al.</i> , 2000
					2/12	17	BD	Tang <i>et al.</i> , 1997
<i>Colorretal</i>	42/50	84	IH	Carroll <i>et al.</i> , 1999a	6/15	40	BD	Radulovic <i>et al.</i> , 1992
	23/23	100	PCR	Chave <i>et al.</i> , 2000	5/21	24	BD	Preston <i>et al.</i> , 1995
					27/29	93	PCR	Saurin <i>et al.</i> , 1999
					38/50	76	IH	Carroll <i>et al.</i> , 1999a
					23/23	100	PCR	Chave <i>et al.</i> , 2000
<i>Carcinóide</i>	12/20	60	IH	Bostwick <i>et al.</i> , 1984	22/26	85	IH	Scott <i>et al.</i> , 2004
	9/19	47	IH	Scott <i>et al.</i> , 2004				

RIA – Rádio imuno ensaio; IH – Imunoistoquímica; NB – Northern Blot; BD – Binding; PCR – Reverse-Transcriptase *Polymerase chain reaction*.

Devido ao GRP apresentar essa grande prevalência em tumores, seu receptor preferencial também foi pesquisado e, por conseguinte, sua presença mostrou-se chave para a atuação neoplásica do peptídeo liberador da gastrina. O GRPR também foi encontrado em diversos tumores (Tabela 2), e foi também envolvido nos mecanismos de angiogênese tumoral (Heuser, Schlott, Schally *et al.*; Kanashiro, Schally, Nagy *et al.*, 2005; Martinez, Zudaire, Julian *et al.*, 2005) e na formação de metástases de algumas neoplasias (Tatsuta, Iishi, Baba *et al.*, 2001).

Portanto, o GRPR tem sido proposto como um importante novo alvo terapêutico específico em câncer (Schwartzmann, Di Leone, Dal Pizzol *et al.*, 2005; Cornelio, Meurer, Roesler *et al.*, 2007; Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007), e antagonistas seletivos do GRPR, como o [D-Tpi6, Leu13, ψ (CH₂NH)-Leu14]-Bombesina(6-14) (RC-3095), foram pesquisados como potenciais novos agentes antitumorais (Radulovic, Miller e Schally, 1991; Szepeshazi, Schally, Halmos *et al.*, 1997; Kiaris, Schally, Sun *et al.*, 1999; Chatzistamou, Schally, Szepeshazi *et al.*, 2001).

O RC-3095 é um pseudonapeptídeo e antagonista seletivo dos receptores da família da bombesina, apresentando especificidade de ligação ao GRPR (Pinski, Yano, Rekasi *et al.*, 1992). Quando testado em camundongos *nude*, apresentou uma significativa redução tumoral de várias linhagens de câncer, incluindo SCLC, pâncreas, mama, próstata, gástrico e de ovário (Yano, Pinski, Groot *et al.*, 1992; Qin, Ertl, Cai *et al.*; Kiaris, Schally, Sun *et al.*, 1999; Chatzistamou, Schally, Szepeshazi *et al.*, 2001). A administração subcutânea diária do RC-3095 não apresentou efeitos tóxicos na concentração em que foi dosada (10-20 µg por animal) e promoveu a regressão tumoral completa em alguns casos. Após esses resultados o peptídeo sintético foi testado *in vitro* e *in vivo* para diversos tipos tumorais, apresentando bom prognóstico na redução e desaparecimento do tumor (Pinski, Schally, Halmos *et al.*, 1994; Szepeshazi, Schally, Halmos *et al.*, 1997; Bajo, Schally, Groot *et al.*, 2004; Engel, Keller, Schally *et al.*, 2005; Stangelberger, Schally, Letsch *et al.*, 2006; Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007). E em razão destes resultados promissores, o RC-3095 foi avaliando em um teste clínico de fase I, onde a sua toxicidade foi previamente testada em modelos animais específicos e sua dosagem foi estabelecida (Schwartzmann, Dileone, Horowitz *et al.*, 2006). Resultados favoráveis para o tratamento tumoral ainda não mostraram qual seria o mecanismo específico responsável pela ação antitumoral do peptídeo. Mas devido ao seu caráter seletivo, o RC-3095 apresenta-se como um ótimo modelo para compreender a atividade e interações do GRP/GRPR.

1.1.5. GRP e a resposta imune

O GRP foi relacionado como um modulador do sistema imune. Estudos iniciais mostraram o GRP ativando monócitos, linfócitos e macrófagos peritoneais, provavelmente através da ativação de PKC (proteína quinase C) (Ruff, Schiffmann, Terranova *et al.*, 1985; Del Rio e De La Fuente, 1994). O peptídeo também foi encontrado estimulando a proliferação de linfócitos (Del Rio, Hernanz e De La Fuente, 1994) e a atividade das células NK (*Natural Killers*) (De La Fuente, Del Rio e Hernanz, 1993).

Outro trabalho mostrou a influência do antagonista específico para o receptor de GRP, RC-3095, sobre um modelo animal de sepse (Dal-Pizzol, Di Leone, Ritter *et al.*, 2006). A administração do antagonista promoveu a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias,

IL-1 β e TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos camundongos e reduzindo o dano inflamatório após a indução com LPS, tendo também os níveis de óxido nítrico e a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) diminuídos.

Além disso, foi verificada uma correlação entre os níveis de GRP, mas não de outros neuropeptídeos estudados, com os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α no líquido sinovial de pacientes com Artrite Reumatóide (RA) e a severidade da doença (Grimsholm, Rantapaa-Dahlqvist e Forsgren, 2005; Origuchi, Iwamoto, Kawashiri *et al.*, 2010). Os resultados mostraram o GRP em concentração aumentada em pacientes com quadros mais graves da doença, auxiliando sua manutenção. Outro estudo mais recente também verificou a diminuição de citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , IL-6, IL-1 β , TNF- α), promovida pelo tratamento com o antagonista específico do GRP (RC-3095) em um modelo murino de artrite adjuvante, além da diminuição de hiperplasia nas patas dos animais (Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008).

Devido ao conjunto dessas últimas pesquisas, podemos considerar que o GRP apresenta um efeito inflamatório, modulando o sistema imune. E a utilização de um antagonista específico do seu receptor, como o peptídeo RC-3095, pode mostrar um possível envolvimento do GRP durante o curso de respostas inflamatórias. Este projeto se propõe aumentar a compreensão dos efeitos do peptídeo liberador de gastrina, seus agonistas e antagonistas, sobre as respostas inflamatórias.

1.2.OBJETIVOS

Caracterizar os efeitos pró-inflamatórios do GRP na indução de migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*.

1.2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito do GRP no recrutamento de leucócitos *in vivo*;
- Analisar o papel de citocinas na migração de neutrófilos induzida por GRP *in vivo*;
- Verificar o efeito do GRP e de seu antagonista RC-3095 na migração de neutrófilos *in vitro* (*Transwell*);
- Analisar o envolvimento de vias de sinalização (PI3K, PLC, ERK e p38) na migração de neutrófilos induzida por GRP;
- Avaliar a participação do GRP na migração de neutrófilos induzida pelo líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide.

2. CAPÍTULO 2

2.1.ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo enviado para: **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**

Manuscript

Biological Sciences – Immunology

A neuropeptide receptor with a new function – Gastrin-releasing Peptide Receptor mediates neutrophil chemotaxis

Rafael Sanguinetti Czepielewski^{a,b,*}, Bárbara Nery Porto^{a,*}, Lucas Bortolotto Rizzo^a, Rafael Roesler^{c,d,e}, Gilberto Schwartzmann^{d,e,f}, Larissa Pinto Garcia^g, Fernando de Queiroz Cunha^g, Cristina Bonorino^{a,b,1}.

**Rafael Sanguinetti Czepielewski and Bárbara Nery Porto contributed equally for this study*

^aLaboratory of Cellular and Molecular Immunology, Biomedical Research Institute (IPB), PUCRS, 90610-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bDepartment of Cellular and Molecular Biology (FABIO), PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dCancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eNational Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^fDepartment of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil

^gDepartment of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: cbonorino@pucrs.br

Corresponding Author:

Cristina Bonorino

Av. Ipiranga, 6690. 2nd floor, room 6. – São Lucas Hospital – IPB, PUCRS

Porto Alegre, RS – Brazil – 90610-900

Phone: (+55) 51-3320.3000 ext. 2725

Fax: (+55) 51-3320.3312

E-mail: cbonorino@pucrs.br

Abstract

Neutrophils are major players in inflammatory processes and their migration to inflamed sites is crucial both for the initiation of inflammation as well as resolution of infection, and yet these cells are involved in the perpetuation of different chronic inflammatory diseases. Gastrin-releasing peptide (GRP) is a neuropeptide that acts through G-protein coupled receptors involved in different physiological functions. Its receptor, Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), is expressed by various cell types, being overexpressed in cancer cells. RC-3095 is a selective GRPR antagonist, developed as an experimental targeted anticancer drug. Recently, RC-3095 was found to have anti-inflammatory properties in arthritis and sepsis models. The mechanisms underlying GRP and RC-3095 effects on tumor growth and in inflammatory processes have not been fully determined. Here we demonstrate that GRPR acts as a chemotactic receptor for neutrophils. Intraperitoneal injection of GRP attracts neutrophils in four hours, a phenomenon abolished by RC-3095, macrophage depletion or neutralization of TNF- α . Neutrophil migration towards synovial fluid of arthritis patients is abrogated by treatment with RC-3095, in a magnitude comparable to blocking of CXCR2. GRP-induced neutrophil migration was dependent on PLC- β 2, PI3K, ERK, p38 and independent of G α i protein. We propose that GRPR is an alternative chemokine receptor that may play a role in disease pathogenesis.

Introduction

Neuropeptides are small molecules used by neurons to regulate synaptic transmission and plasticity, also acting as neuromodulators. Nonetheless, these molecules can be versatile, also acting as chemical messengers in the periphery. Evidence for immunological functions for neuropeptides have more recently been provided by different studies, supporting the interesting hypothesis of a direct link between the immune and nervous systems (Genton e Kudsk, 2003). For example, some neuropeptides have been described as markers in immune pathologies (Gonzalez-Rey, Chorny e Delgado, 2007), while others appear to induce cytokine production by immune cells (Hernanz, Tato, De La Fuente *et al.*, 1996; Delgado, Mcmanus e Chambers, 2003).

Gastrin-releasing peptide (GRP) was first characterized as inducing gastrin secretion in the gastric-tract (McDonald, Jornvall, Nilsson *et al.*, 1979). GRP is the mammalian counterpart of the tetradecapeptide bombesin, originally isolated from the skin of the amphibian *Bombina bombina* (Anastasi, Erspamer e Bucci, 1971). GRP is a neuropeptide that acts through preferential receptors via G-protein, promoting a variety of different physiological functions: gastrointestinal motility, hormone and neurotransmitter release in the gut, intestine, colon, other endocrine organs (Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007) and other important roles in the peripheral and central nervous system, controlling circadian cycle (Roesler, Henriques e Schwartzmann, 2006), anxiety (Martins, Reinke, Valvassori *et al.*, 2005), fear (Roesler, Valvassori, Castro *et al.*, 2009), stress (Martinez e Tache, 2000), modulation of memory (Roesler, Lessa, Venturella *et al.*, 2004; Luft, Flores, Vianna *et al.*, 2006). It is also may be involved with neurodegenerative diseases such as autism and Schizophrenia (Presti-Torres, De Lima, Scalco *et al.*, 2007), Alzheimer's (Roesler, Henriques e Schwartzmann, 2006) and Parkinson's (Roesler, Kapczinski, Quevedo *et al.*, 2007).

This neuropeptide works preferentially through the receptor GRPR (Gastrin-releasing peptide receptor), also known as BB2-R. GRPR is a G-protein coupled receptor, expressed in various cell types, including cells from gastric, respiratory and nervous system, endocrine

glands and musculature (Xiao, Wang, Hampton *et al.*, 2001; Kamichi, Wada, Aoki *et al.*, 2005). In addition, it is over expressed on cancer cells (Mu, Honer, Becaud *et al.*, 2010). The production of GRP and the expression of GRPR on neoplastic cells can result in autocrine growth stimulation in several cancer cell types (Cuttitta, Carney, Mulshine *et al.*, 1985; Battey, Way, Corjay *et al.*, 1991; Cornelio, Roesler e Schwartzmann, 2007). Specific antagonists for GRPR were produced (Pinski, Yano, Rekasi *et al.*, 1992). One of these selective antagonists that have been used in cancer treatment is RC-3095 (the [D-Trp⁶, Leu¹³ ψ(CH₂NH)-Leu¹⁴] bombesin (6-14)) (Schwartzmann, Dileone, Horowitz *et al.*, 2006).

More recently, RC-3095 has been demonstrated to have an anti-inflammatory effect in arthritis models (Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008) and sepsis (Dal-Pizzol, Di Leone, Ritter *et al.*, 2006; Cornelio, Dal-Pizzol, Roesler *et al.*, 2007; Petronilho, Roesler, Schwartzmann *et al.*, 2007), downregulating the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-6, and TNF-α. However, there are no reports on cytokine production directly induced by GRP stimulation of immune cells. The mechanisms underlying the interaction of GRP and its antagonist with inflammatory scenarios are not clear. We hypothesized that GRP could act as a pro-inflammatory stimulus *in vivo*, even in the absence of infection. In this study, we report that GRP can be an endogenous inflammatory mediator, acting as a chemoattractant through GPCR, activating specific signaling pathways that promote neutrophil migration. We demonstrate that GRP can trigger neutrophil recruitment both indirectly, through macrophages, as well as directly, binding to GRPR in these cells.

Results

GRP induces neutrophil migration *in vivo*.

It has been previously shown that GRPR antagonist RC-3095 has anti-inflammatory activity in different animal models of inflammation (Dal-Pizzol, Di Leone, Ritter *et al.*, 2006; Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008; Petronilho, Araujo, Steckert *et al.*, 2009; Petronilho, De Souza, Vuolo *et al.*, 2010; Rezin, Petronilho, Araujo *et al.*, 2010). Thus, we hypothesized that GRP could have a pro-inflammatory potential. Initially, we investigated if GRP would have effect of on neutrophil recruitment *in vivo*, in a dose-response experiment. The intraperitoneal injection of GRP induced neutrophil recruitment after 4 hours in a dose-dependent fashion (Fig. 1A). Pretreatment of mice with RC-3095 immediately before the injection of GRP abolished neutrophil accumulation in peritoneal cavity of mice (Fig. 1B), indicating that GRP-induced neutrophil migration occurs specifically through activation of GRPR. Furthermore, the chemoattractant effect of GRP (0.6 µg/cavity) *in vivo* was restricted to neutrophils, since no recruitment of macrophages, B cells or T cells was observed from 1.5 hour to 72 hours (Fig. 1C and D), as assessed both by Diff-Quick staining and flow cytometry. Collectively, these results indicate that GRP has a selective effect over neutrophils *in vivo*, inducing their migration through activation of GRPR.

GRP-induced neutrophil recruitment *in vivo* depends on macrophages and TNF- α production.

Neutrophil migration to sites of inflammation *in vivo* is mediated by the release of cytokines and chemokines by resident cells, such as macrophages. Thus, we decided to investigate the role of macrophages on neutrophil migration induced by GRP *in vivo*. We performed macrophage depletion by injecting chlodronate liposomes intraperitoneally in mice. Twenty-four hours later, we injected GRP or saline i.p. Macrophage depletion was assessed by flow cytometry analysis, staining peritoneal cells for CD11b+ and CD14+ (not shown). Depletion of macrophages inhibited almost completely GRP induced neutrophil

migration (Fig. 2A), suggesting that GRP could activate macrophages to release cytokines and/or neutrophil chemokines, attracting these cells to the peritoneal cavity of mice.

TNF- α is one of the major cytokines released by macrophages in response to inflammatory stimuli. Neutrophil migration has been reported to be enhanced by TNF- α , which can increase the expression of adhesion molecules on endothelial cells and neutrophils (Wagner e Roth, 2000), facilitating cell arrival to inflammatory sites. To investigate the role of TNF- α in this system, we pretreated mice with a commercial TNF- α neutralizing antibody (Infliximab – 20 μ g/cavity) or control human IgG twenty four hours before GRP injection. We observed that blocking of TNF- α significantly inhibited GRP-induced neutrophil recruitment to the peritoneal cavity (Fig. 2B). Altogether, these results suggest that *in vivo* neutrophil recruitment through GRPR is dependent on macrophage presence and TNF- α production.

GRP has a direct effect on neutrophils, acting as a chemoattractant molecule.

It has been recently demonstrated that neutrophils express GRPR (Zhou, Potts, Cuttitta *et al.*, 2011), and we have confirmed this expression both by western blot and Real-time PCR (results not shown). It has also been demonstrated that endogenous molecules can act as chemoattractants (Porto, Alves, Fernandez *et al.*, 2007), inducing cell chemotaxis. We therefore asked if GRP could have such an effect over neutrophils. In order to investigate that, we allowed neutrophils to migrate toward increasing concentrations of GRP *in vitro*, using a Transwell system. Our results showed that nanomolar amounts of GRP are sufficient to induce neutrophil migration in a dose-dependent manner (Fig. 3A). A typical bell shaped curve is observed, with the dose of 1nM of GRP consistently inducing the best response. To investigate the effects exerted by RC-3095 over this phenomenon, we performed a dose-response curve of this inhibitor using the optimal dose of GRP determined previously. We observed that RC-3095 does not inhibit GRP-induced migration while in equivalent nanomolar amounts (Fig. 3B). However, a 10-fold increase of the inhibitor significantly blocks the effect of GRP on neutrophil migration, and a 20-fold increase

completely abolishes it. We concluded that GRP can act as a chemotactic molecule, and this effect is dependent on GRPR engagement.

Neutrophil migration induced by GRP is independent of Gai proteins, but dependent on PLC- β , PI3K and MAPK.

The classical pathway of neutrophil migration involves triggering of GPCR receptors, such as CXCR2 and BLT1, which release G $\beta\gamma$ subunits from Gai proteins, activating specific signaling pathways, culminating in cell chemotaxis (Thelen, 2001; Rot e Von Andrian, 2004). However, GRPR is coupled to G α_q proteins (Hellmich, Battey e Northup, 1997), which are not typically identified with cell migration. It was possible that we were observing neutrophil migration in response to GRP because GRPR could be associating with Gai proteins; alternatively, GRP could be binding to a Gai-coupled GPCR, besides its typical, G α_q -coupled receptor, GRPR. To rule out these hypotheses, we first pretreated neutrophils with Pertussis toxin (PTx), which irreversibly inhibits Gai proteins (Wettschureck e Offermanns, 2005), and allowed cells to migrate towards GRP or LTB₄, used as a control. Pretreating neutrophils with PTx abrogated their migration to LTB₄ but did not affect migration towards GRP (Fig. 4A), suggesting that Gai proteins are not involved in neutrophil chemotaxis induced by GRP.

More recently, it has been shown that chemoattractants can couple to different G proteins to induce distinct responses by neutrophils (Prescott, Zimmerman, Stafforini *et al.*, 2000; Shibata, Konishi e Nakagawa, 2002). Since GRPR is coupled to G α_q protein, and triggering G α_q -coupled receptors leads to activation of phospholipase C- β (PLC- β) (Neves, Ram e Iyengar, 2002), we decided to investigate the involvement of this effector molecule on GRP-induced neutrophil migration. The pretreatment of cells with a selective inhibitor of PLC- β , U-73122, abolished neutrophil migration towards GRP (Fig. 4B), indicating that GRP activates PLC- β to induce neutrophil chemotaxis.

To determine downstream signaling pathways activated in GRP-induced neutrophil migration, we pretreated the cells with selective inhibitors of PI3K, ERK and p38. Blocking these signaling pathways completely inhibited neutrophil migration towards GRP (Fig. 4C), indicating that GRP activates PI3K and MAPK, similarly to other chemoattractant molecules. Cell viability at the end of experiments was always higher than 97%, for controls as well as for cells treated with inhibitors.

Neutrophil migration towards synovial fluid of arthritis patients can be blocked by RC-3095.

Previous studies revealed an anti-inflammatory effect of RC-3095 in arthritis (Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008) and sepsis models (Dal-Pizzol, Di Leone, Ritter *et al.*, 2006). This effect was attributed mainly to the inhibition of IL-1 β and TNF- α production. Other studies reported an increase of GRP concentrations in synovial fluid of arthritis patients, correlating the neuropeptide with the severity of the disease (Grimsholm, Rantapaa-Dahlqvist e Forsgren, 2005; Grimsholm, Rantapaa-Dahlqvist, Dalen *et al.*, 2008; Origuchi, Iwamoto, Kawashiri *et al.*, 2010). In view of our results, we hypothesized that at least part of the effect of RC-3095 in arthritis could be explained by an inhibition of neutrophil recruitment to the arthritic joint.

To test this hypothesis, we analyzed neutrophil migration towards synovial fluid from arthritis patients in our Transwell system. Synovial fluid induced neutrophil migration, comparable to what is observed with GRP (Fig. 5A). The migration however is abrogated by pretreatment of neutrophils with RC-3095, indicating that GRP in the synovial fluid can activate GRPR and trigger neutrophil chemotaxis. The inhibition of neutrophil migration by RC-3095 was comparable to what was observed with pretreatment of neutrophils with a CXCR2 antagonist (SB225002) – the concentration of IL-8 in synovial fluid samples was determined to be greater than 300 pg/ml (data not shown). To exclude the possibility that GRP in synovial fluid could be binding directly to CXCR2, we allowed neutrophils pretreated

with SB225002 to migrate towards GRP. This pretreatment did not inhibit GRP-induced neutrophil migration (Fig. 5B), suggesting the effect of GRP was restricted to GRPR binding.

Discussion

Neutrophil recruitment to inflamed sites during an innate immune response to infection or damage is a key aspect of the inflammatory response (Hickey e Kubes, 2009). However, such a rapid response requires sentinel cells pre-stationed in the tissues, like macrophages and mast cells. Macrophage-derived cytokines and chemokines attract and activate neutrophils (Nathan, 2002). Once in the inflamed tissue, neutrophil migration is governed by extracellular signals such as chemoattractant gradients. Neutrophil chemoattractants include chemokines (Rollins, 1997; Rot e Von Andrian, 2004), cytokines (Witko-Sarsat, Rieu, Descamps-Latscha *et al.*, 2000), bacterial peptides (Hajishengallis e Lambris, 2011), lipid mediators and complement-derived peptides (Wagner e Roth, 2000). Despite the different nature of the ligands, all of them bind to, and activate G protein-coupled receptors (GPCR) (Thelen, 2001). In this study we describe a new function for the neuropeptide GRP and its receptor, GRPR, in the chemotaxis of neutrophils. Our results indicate that GRP can directly induce the migration of neutrophils, which express GRPR.

Our initial observations *in vivo* indicated that macrophages could be induced to secrete cytokines or chemokines that would attract neutrophils in response to GRP injection. We performed extensive cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-4, TNF- α , IL-10, IL-17, INF- γ), as well as IL-8 analysis in response to GRP stimulation of cells, such as murine peritoneal macrophages, human monocytes and neutrophils, and bone marrow-derived dendritic cells (BMDC). We did not observe induction of any of these mediators in any of these cells in response to GRP. It is possible that peritoneal macrophages are producing other inflammatory mediators that synergize with TNF- α recruiting neutrophils to the peritoneal cavity. Previous studies showed that peritoneal macrophages (De La fuente, 1991) or total lymph node cells (Medina, 2005) incubated with GRP migrated more efficiently towards casein and fMLP, respectively. It's

possible that in addition to being a chemotactic factor for neutrophils, GRP can also prime cells to migrate towards other stimuli – a property that would be consistent with the growth factor function described for this peptide (Lehy, Puccio, Chariot *et al.*, 1986). However, in our system, GRP acts as a specific stimulus for neutrophil recruitment, because no other cells were observed to migrate to the peritoneal cavity in response to GRP injections.

We report here that GRPR mediates chemotaxis, acting independently of G α i proteins. Despite the crucial importance of G α i proteins on chemoattractant-induced cell migration, it has been known that chemokine receptors can couple to other classes of G proteins, including G α q proteins (Gerard e Gerard, 1994). G α i-coupled GPCR is known as a “classical” chemokine receptor and it induces cell migration through release of the $\beta\gamma$ subunits from the G protein, which can activate selective signaling pathways, such as PI3K, PKC and MAPKs, culminating in cell chemotaxis (Neves, Ram e Iyengar, 2002). However, an alternative signaling pathway has been recently demonstrated which is induced by some, but not all, chemoattractants. This alternative chemokine receptor signaling pathway is dependent on G α q-containing G proteins (Shi, Partida-Sanchez, Misra *et al.*, 2007). The importance of G α q on neutrophil chemotaxis was revealed by using genetically deficient murine neutrophils. G α q-deficient neutrophils are not able to migrate toward fMLP *in vitro*, but they are still able to migrate toward IL-8, indicating that IL-8 is a ligand of the classical pathway, while fMLP is a ligand of the alternative pathway. (Shi, Partida-Sanchez, Misra *et al.*, 2007). The same study also evidenced that this was a pathway employed by neutrophils, but not other cells, such as BMDCs and T cells. We believe our results are in agreement with these findings.

The activation of G α q-coupled receptors leads to dissociation of G α q and $\beta\gamma$ subunits. The “signature” activity of G α q protein is to activate one or more PLC- β isoforms, which catalyze the production of the intracellular messengers inositol triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG), promoting intracellular calcium release (Neves, Ram e Iyengar, 2002). PLC- β 2 and PLC- β 3 were shown to be crucial for neutrophil activation induced by chemokines (Thelen, 2001). Our results have demonstrated that GRP activates the PLC- β 2

isoform, since the U-73122 inhibitor is specific for this isoenzyme (Hou, Kirchner, Singer *et al.*, 2004). GRPR is a well-known Gαq-coupled GPCR (Hellmich, Battey e Northup, 1997), and our results indicate that GRP is a ligand of the alternative signaling pathway.

Because Gαq also activates PI3K, and it has been shown that PI3K is essential for neutrophil migration toward different chemoattractants (Hirsch, Katanaev, Garlanda *et al.*, 2000), we showed that activation of PI3K is essential for GRP-induced neutrophil migration. We extended our observations by showing that besides the requirement of PLC-β2 and PI3K, GRP also activates MAPK, such as ERK and p38, to induce neutrophil chemotaxis. These pathways were analyzed because they are known to be downstream of GPCR. In fact, different neutrophil chemoattractants, such as fMLP, IL-8, LTB₄ and C5a, activate ERK and p38 to stimulate neutrophil migration (Heit, Tavener, Raharjo *et al.*, 2002; Coxon, Rane, Uriarte *et al.*, 2003), after triggering either classical or alternative chemokine receptors.

Our results provide a candidate mechanism for the anti-inflammatory effect of GRPR antagonist RC-3095 in models of arthritis (Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008) and sepsis (Dal-Pizzol, Di Leone, Ritter *et al.*, 2006). We can also extend our hypothesis to explain the pro-inflammatory effect of GRP, since a GRP blocking agent effectively prevented asthma exacerbation in animal models (Zhou, Potts, Cuttitta *et al.*, 2011). Yet, the effective role of GRP in inflammation has not been characterized. This is the first study to demonstrate that injection of GRP can lead to upregulation of an inflammatory process.

The migration of neutrophils to arthritic joints has been linked to the severity of disease (Santos, Fan, Hall *et al.*, 2011). The presence of GRP in inflammatory scenarios, independently of infection, could either directly recruit neutrophils via a non-classical pathway, as well as induce macrophages to produce other neutrophil-recruiting molecules (model summarized in Figure 6), and both are blocked by RC3095. The fact that GRP is a neuropeptide poses the intriguing possibility that neutrophil recruitment, and consequent disease exacerbation, could ensue in situations of emotional stress, when GRP can be released by neurons (Martinez e Tache, 2000; Kamichi, Wada, Aoki *et al.*, 2005). Disease relapse in response to stress is a common aspect of autoimmune diseases (Stojanovich,

2010), as well as asthma (Frieri, 2003). We are currently performing studies to clarify the *in vivo* mechanisms mediating cell migration induced by GRP, to optimize the use of molecules that block GRP or GRPR in inflammatory diseases.

Methods

1. Mice and Reagents

Mice (C57Bl/6 females, 6-8 weeks old) were purchased from FEPPS (Porto Alegre, Brazil) and were housed in temperature-controlled rooms and given water and food *ad libitum* until use. Care and handling of the animals were in accordance with the National Institute of Health Guidelines. Gastrin-releasing peptide (GRP) and chlodronate liposomes were purchased from Sigma. RC-3095, originally synthesized in the Schally laboratory by solid-phase methods, was made by Zentaris (Frankfurt am Main, Germany). LTB₄, LY294002 (PI3K inhibitor), PD98059 (ERK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), SB225002 (CXCR2 antagonist), were purchased from Cayman Chemical. U-73122 (PLC-β inhibitor) was a gift from Dr. Marcelo T. Bozza, UFRJ. Infliximab was donated by the Rheumatology Service of São Lucas Hospital. Synovial fluid was obtained from patients diagnosed with rheumatoid arthritis by physicians of the Rheumatology Service of São Lucas Hospital, at PUCRS. All patients signed an informed consent term approved under Ethics protocol nr. 858/05-CEP.

2. Human neutrophil isolation

Human neutrophils were isolated from heparin-treated peripheral venous blood of healthy human volunteers using a gradient of Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Erythrocytes were removed by hypotonic lysis and neutrophils were resuspended in RPMI 1640 medium 2% fetal calf serum (FCS). Neutrophil purity and viability were always higher than 97 and 99%, respectively.

3. Neutrophil chemotaxis assay

Neutrophil chemotaxis was assayed in a Transwell System (Corning) using 5-μm polycarbonate membrane. Inducers of neutrophil chemotaxis were added to the bottom wells in RPMI 1640 medium in the presence of 2% FCS. Neutrophils suspended in RPMI 1640 in the presence of 2% FCS (2×10^5 cells/100μL) were added to top wells and incubated for 2 h

at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Following incubation, the migrated neutrophils were collected and counted in Neubauer chambers. Neutrophil migration toward RPMI 1640 medium alone (random chemotaxis) was used as negative control, and migration toward 1 nM leukotriene B₄ (LTB₄) was used as positive control. To evaluate the involvement of PLC-β, PI3K, MAPK (p38 and ERK) and CXCR2 on GRP-induced neutrophil chemotaxis, the cells were pretreated with selective inhibitors at 37°C under 5% CO₂ for 1 hour. To analyze the role of Gαi protein, cells were pretreated with Pertussis toxin (PTx) at 37°C under 5% CO₂ for 2 hours. The trypan blue exclusion assay was used to evaluate the viability of cells treated with these inhibitors, and at the end of incubation the cellular viability was always higher than 97%. The chemotactic index was calculated as the ratio of the number of migrated neutrophils in chemoattractant-containing wells divided by the number of neutrophils that migrated to RPMI 1640 medium alone.

4. *In vivo* neutrophil migration assay

Intraperitoneal single injections of GRP (0.06 - 6 µg/cavity) and/or RC-3095 (6 µg/cavity) were performed in a volume of 200 µL. The control group received an intraperitoneal injection of endotoxin-free saline solution in a same volume. After 4 h of injection, the animals were sacrificed in a CO₂ chamber, and their peritoneal cavities were rinsed with 3 mL of cold phosphate-buffered saline. Total leukocytes in the peritoneal fluid were determined in Neubauer chambers after dilution in Trypan solution. Differential counting of leukocytes was carried out on Diff-Quick (Baxter Travenol Laboratories)-stained slices.

5. Flow Cytometry

Peritoneal cells were washed in PBS, blocked for 15 minutes in ice with Fc Block solution (supernatant of 24G2 cells supplemented by 5% mouse serum and 10 % rat serum), and stained in flow cytometry buffer (PBS 1% fetal calf serum and 0.01% sodium azide) with the following mouse antibodies from Beckton Dickinson: anti-CD14 PE, anti-GR-1 PE, anti-CD11b APC, anti-CD11c PE-Cy7, anti-CD4 FITC, anti-B220 PE-Cy5.5.

6. Ethics

This study was approved by the Ethics committee at PUCRS under protocol nr CEUA 10/00186.

7. Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm S.E. Results were analyzed using a statistical software package (GraphPad Prism 5). Statistical differences among the experimental groups were evaluated by analysis of variance with Tukey correction or with Student's *t* test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Acknowledgements – The authors wish to acknowledge grant support from CNPq nr. **474697/2008-8**, and Dr. José Carlos Alves Filho for the PTx gift. Rafael Czepielewski is recipient of a CNPq fellowship, and Bárbara Porto, of a CAPES-PNPD fellowship. RR and GS are supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant 303703/2009-1 to R.R); National Institute for Translational Medicine (INCT-TM); and the South American Office for Anticancer Drug Development. The authors declare no conflict of interests.

References

1. Genton L & Kudsk KA (2003) Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg* 186(3):253-258.
2. Gonzalez-Rey E, Chorny A, & Delgado M (2007) Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 7(1):52-63.
3. Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, & Arnalich F (1996) Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. *J Neuroimmunol* 71(1-2):25-30.
4. Delgado AV, McManus AT, & Chambers JP (2003) Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37(6):355-361.
5. McDonald TJ, *et al.* (1979) Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 90(1):227-233.
6. Anastasi A, Erspamer V, & Bucci M (1971) Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 27(2):166-167.
7. Cornelio DB, Roesler R, & Schwartzmann G (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18(9):1457-1466.
8. Roesler R, Henriques JA, & Schwartzmann G (2006) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(2):197-204.
9. Martins MR, *et al.* (2005) Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides* 26(12):2525-2529.
10. Roesler R, *et al.* (2009) Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. *Peptides* 30(6):1192-1196.
11. Martinez V & Tache Y (2000) Bombesin and the brain-gut axis. *Peptides* 21(11):1617-1625.
12. Roesler R, *et al.* (2004) Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *Eur J Neurosci* 19(4):1041-1045.
13. Luft T, *et al.* (2006) A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *Neuroreport* 17(9):935-939.
14. Presti-Torres J, *et al.* (2007) Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* 52(3):724-732.
15. Roesler R, Kapczinski F, Quevedo J, Dal Pizzol F, & Schwartzmann G (2007) The gastrin-releasing peptide receptor as a therapeutic target in central nervous system disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2(2):125-129.
16. Xiao D, Wang J, Hampton LL, & Weber HC (2001) The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene* 264(1):95-103.
17. Kamichi S, *et al.* (2005) Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Res* 1032(1-2):162-170.
18. Mu L, *et al.* (2010) In vitro and in vivo characterization of novel 18F-labeled bombesin analogues for targeting GRPR-positive tumors. *Bioconjug Chem* 21(10):1864-1871.
19. Cuttitta F, *et al.* (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 316(6031):823-826.

20. Battey JF, *et al.* (1991) Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2):395-399.
21. Pinski J, *et al.* (1992) High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. *Regul Pept* 41(3):185-193.
22. Schwartzmann G, *et al.* (2006) A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24(5):403-412.
23. Oliveira PG, *et al.* (2008) Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 29(10):1726-1731.
24. Dal-Pizzol F, *et al.* (2006) Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173(1):84-90.
25. Cornelio DB, Dal-Pizzol F, Roesler R, & Schwartzmann G (2007) Targeting the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor to treat sepsis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2(3):178-181.
26. Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, & Dal Pizzol F (2007) Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6(4):197-200.
27. Petronilho F, *et al.* (2009) Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 30(8):1460-1465.
28. Petronilho F, *et al.* (2010) Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in carrageenan-induced pleural inflammation in rats. *Inflamm Res* 59(9):783-789.
29. Rezin GT, *et al.* (2010) Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist or N-acetylcysteine combined with Omeprazol Protect against Mitochondrial Complex II Inhibition in a Rat Model of Gastritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
30. Wagner JG & Roth RA (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 52(3):349-374.
31. Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, & Sunday ME (2011) Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(5):2100-2105.
32. Porto BN, *et al.* (2007) Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem* 282(33):24430-24436.
33. Thelen M (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2(2):129-134.
34. Rot A & von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928.
35. Hellmich MR, Battey JF, & Northup JK (1997) Selective reconstitution of gastrin-releasing peptide receptor with G alpha q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2):751-756.
36. Wettschureck N & Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85(4):1159-1204.
37. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, & McIntyre TM (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69:419-445.
38. Shibata F, Konishi K, & Nakagawa H (2002) Chemokine receptor CXCR2 activates distinct pathways for chemotaxis and calcium mobilization. *Biol Pharm Bull* 25(9):1217-1219.
39. Neves SR, Ram PT, & Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296(5573):1636-1639.
40. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, & Forsgren S (2005) Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7(3):R416-426.
41. Grimsholm O, Rantapaa-Dahlqvist S, Dalen T, & Forsgren S (2008) Observations favouring the occurrence of local production and marked effects of bombesin/gastrin-

- releasing peptide in the synovial tissue of the human knee joint--comparisons with substance P and the NK-1 receptor. *Neuropeptides* 42(2):133-145.
42. Origuchi T, *et al.* (2010) Reduction in serum levels of substance P in patients with rheumatoid arthritis by etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Mod Rheumatol*.
 43. Hickey MJ & Kubes P (2009) Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol* 9(5):364-375.
 44. Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917):846-852.
 45. Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90(3):909-928.
 46. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, & Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
 47. Hajishengallis G & Lambris JD (2011) Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 11(3):187-200.
 48. Lehy T, Puccio F, Chariot J, & Labeille D (1986) Stimulating effect of bombesin on the growth of gastrointestinal tract and pancreas in suckling rats. *Gastroenterology* 90(6):1942-1949.
 49. Gerard C & Gerard NP (1994) The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *Curr Opin Immunol* 6(1):140-145.
 50. Shi G, *et al.* (2007) Identification of an alternative G α q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *J Exp Med* 204(11):2705-2718.
 51. Hou C, *et al.* (2004) In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole -2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. *J Pharmacol Exp Ther* 309(2):697-704.
 52. Hirsch E, *et al.* (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287(5455):1049-1053.
 53. Heit B, Tavener S, Raharjo E, & Kubes P (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 159(1):91-102.
 54. Coxon PY, *et al.* (2003) MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal* 15(11):993-1001.
 55. Santos LL, *et al.* (2011) Macrophage migration inhibitory factor regulates neutrophil chemotactic responses in inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 63(4):960-970.
 56. Stojanovich L (2010) Stress and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 9(5):A271-276.
 57. Frieri M (2003) Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 90(6 Suppl 3):34-40.

Figure Legends

Fig.1. GRP induces neutrophil recruitment to the peritoneal cavity of mice.

A) Mice were injected i.p. with different doses of GRP (0.06 – 6 µg/cavity). After 4h, animals were sacrificed and differential counts in the peritoneal fluid were determined. **p <0.01 compared to saline-treated group. **B)** Mice were injected with GRP (0.6 µg/cavity), RC-3095 (6 µg/cavity), or RC-3095 (6 µg/cavity) + GRP (0.6 µg/cavity). The control group received an i.p. injection of endotoxin-free saline solution. *** p<0.001 compared to GRP-injected group. **C)** Mice were injected with GRP (0.6 µg/cavity). After 1.5, 4, 8, 16, 24, 48 and 72 hours, animals were sacrificed, cells were cytocentrifuged, stained with Diff-Quick and cell counts in the peritoneal fluid were determined. Filled circles represent neutrophil counted on saline control groups and open circles are neutrophils counted on GRP-treated groups (N ϕ = neutrophils). Filled squares represent other mononuclear cells counted on saline control groups and open squares are the other mononuclear cells counted on GRP-treated groups (MN= other mononuclear cells counted). *** p<0.001 compared to saline-injected group. **D)** Mice were injected with GRP (0.6 µg/cavity). After 1.5, 4, 8, 16, 24, 48 and 72 hours, animals were sacrificed and cell in the peritoneal fluid were analyzed by flow cytometry. Gates 1 through 4 were determined based on FSC x SSC distribution and staining with CD14, CD11c, CD4, B220. G1=lymphocytes; G2=larger lymphocytes and DCs; G3=macrophages; G4=neutrophils. For each of the gates grouped, filled forms represent saline control groups and open forms are GRP-treated groups. Data are representative of two independent experiments (n = 4 for each group of treatment) and expressed as the mean \pm S.E. of the number of cells in the peritoneal fluid.

Fig.2. GRP-induced neutrophil recruitment *in vivo* depends on macrophages and TNF- α production.

A) Mice were injected i.p. with a single dose of chlodronate liposomes (500 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) to deplete macrophages, or with saline as control, 24 h prior to GRP (0.6 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) or RC-3095 (6 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) + GRP (0.6 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) injection. After 4 h of injection, animals were sacrificed, their peritoneal cavities were rinsed with cold PBS and differential counts in the peritoneal fluid were determined. *** $p < 0.001$ when compared to GRP-injected group. **B)** Mice were pretreated with anti-TNF mAb (Infliximab - 20 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) or IgG control (20 $\mu\text{g}/\text{cavity}$) prior to i.p. injection of GRP (0.6 $\mu\text{g}/\text{cavity}$). Four hours later, animals were sacrificed and differential counts in the peritoneal fluid were determined. Data are representative of two independent experiments ($n = 4$ for each group of treatment) and expressed as the mean \pm S.E. of the number of cells in the peritoneal fluid.

Fig.3. GRP has a direct chemoattractant effect on neutrophils.

A) Human neutrophils were allowed to migrate toward different concentrations of GRP (0.001 – 10 nM) in the presence of 2% FCS for 2 h at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to negative control. **B)** Neutrophils were preincubated with RC-3095 (1 – 20 nM) for 1 hour at 37°C under 5% CO₂ and stimulated to migrate toward GRP (1 nM) for 2 h at 37°C under 5% CO₂. *** $p < 0.001$ compared to negative control and ### $p < 0.001$ compared to GRP-treated group. Following incubation, the migrated cells were counted, and the chemotactic index was calculated. The negative control was medium alone, and the positive control was LTB₄ (1 nM). Data are representative of two independent experiments, performed in triplicate for each sample, and expressed as mean \pm S.E.

Fig.4. GRP induces neutrophil migration independently of Gai protein and dependently on PLC- β 2, PI3K and MAPK.

Neutrophils were preincubated with: **A)** Pertussis toxin 100 ng/ml (Gai protein inhibitor) for 2 h; **B)** U-73122 1 μM (PLC- β 2 inhibitor); **C)** LY294002 50 μM (PI3K inhibitor), SB203580 10

μM (p38 inhibitor) and PD98059 30 μM (ERK inhibitor) for 1 h at 37°C under 5% CO_2 and stimulated to migrate toward GRP (1 nM) or LTB_4 (1 nM) for 2 h at 37°C under 5% CO_2 . Following incubation, the migrated cells were counted, and the chemotactic index was calculated. Data are representative of two independent experiments, performed in triplicate for each sample, and expressed as mean \pm S.E. *** $p < 0.001$ compared to negative control and ### $p < 0.001$ compared to LTB_4 - or GRP-treated group.

Fig.5. Synovial fluid-induced migration of neutrophils is partially inhibited by RC-3095.

A) Human neutrophils were allowed to migrate toward GRP (1 nM) in the presence of 2% FCS for 2 h at 37°C under 5% CO_2 atmosphere or synovial fluid of an arthritis patient, with or without incubation with RC-3095 or SB225002 (CXCR2 antagonist). The negative control was medium alone. **B)** Neutrophils were preincubated with SB225002 (300 nM) for 1 hour at 37°C under 5% CO_2 and stimulated to migrate toward GRP (1 nM) for 2 h at 37°C under 5% CO_2 . Following incubation, the migrated cells were counted and the chemotactic index was calculated. Data are representative of two independent experiments, performed in triplicate for each sample, and expressed as mean \pm S.E. *** $p < 0.001$ compared to negative control, ### $p < 0.001$ compared to synovial fluid group.

Fig.6. Schematic representation of the proposed mechanisms underlying GRP-induced neutrophil migration.

Intraperitoneal injection of GRP attracts neutrophils, either indirectly, in a process dependent on macrophages and $\text{TNF-}\alpha$, or directly binding to GRPR expressed by neutrophils, signaling through G α_q protein, dependent on PLC- β_2 , PI3K, ERK, and p38. GRPR antagonist RC-3095 blocks binding of GRP to its receptor, inhibiting chemotaxis.

Figure 1:

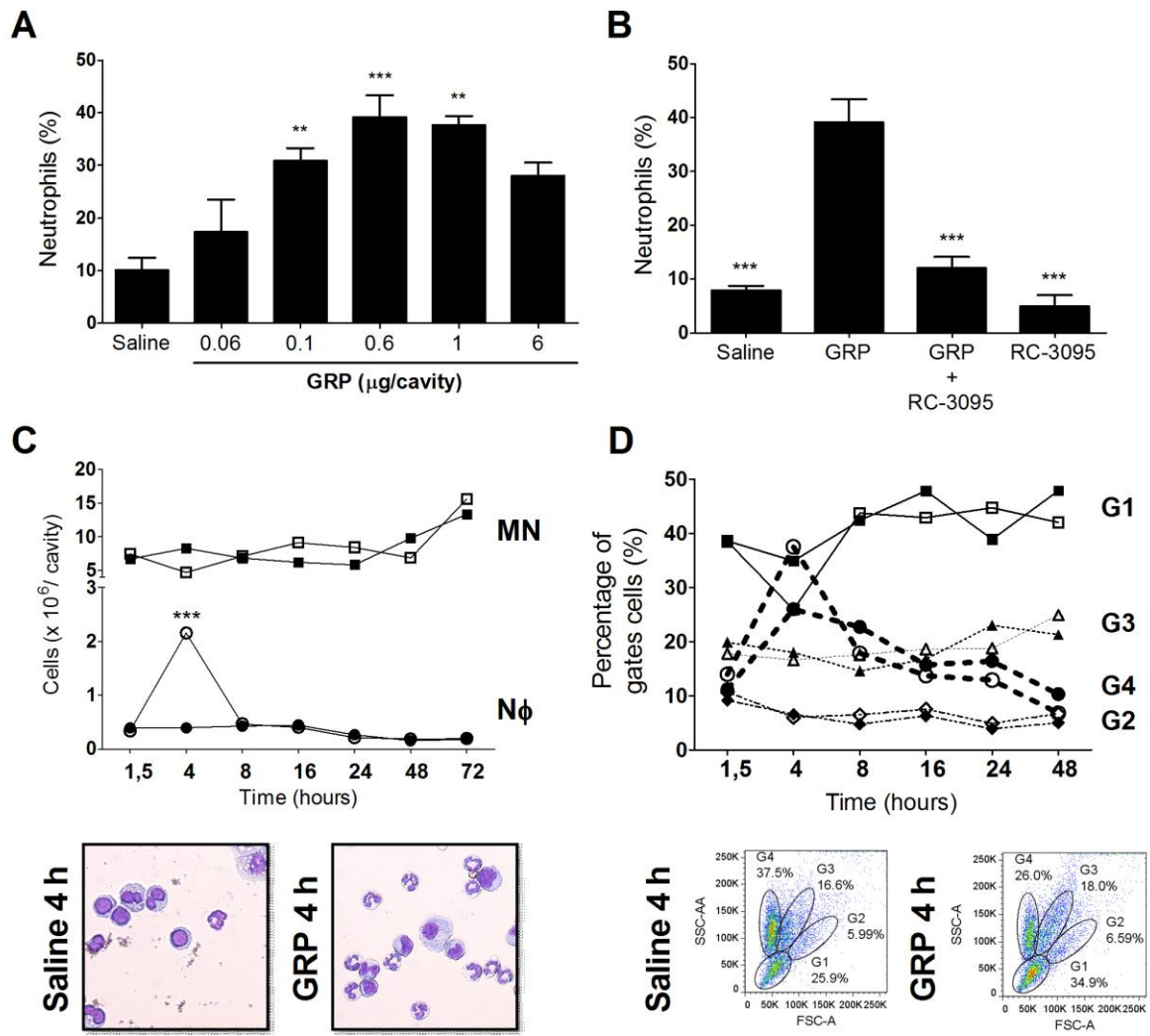


Figure 2:

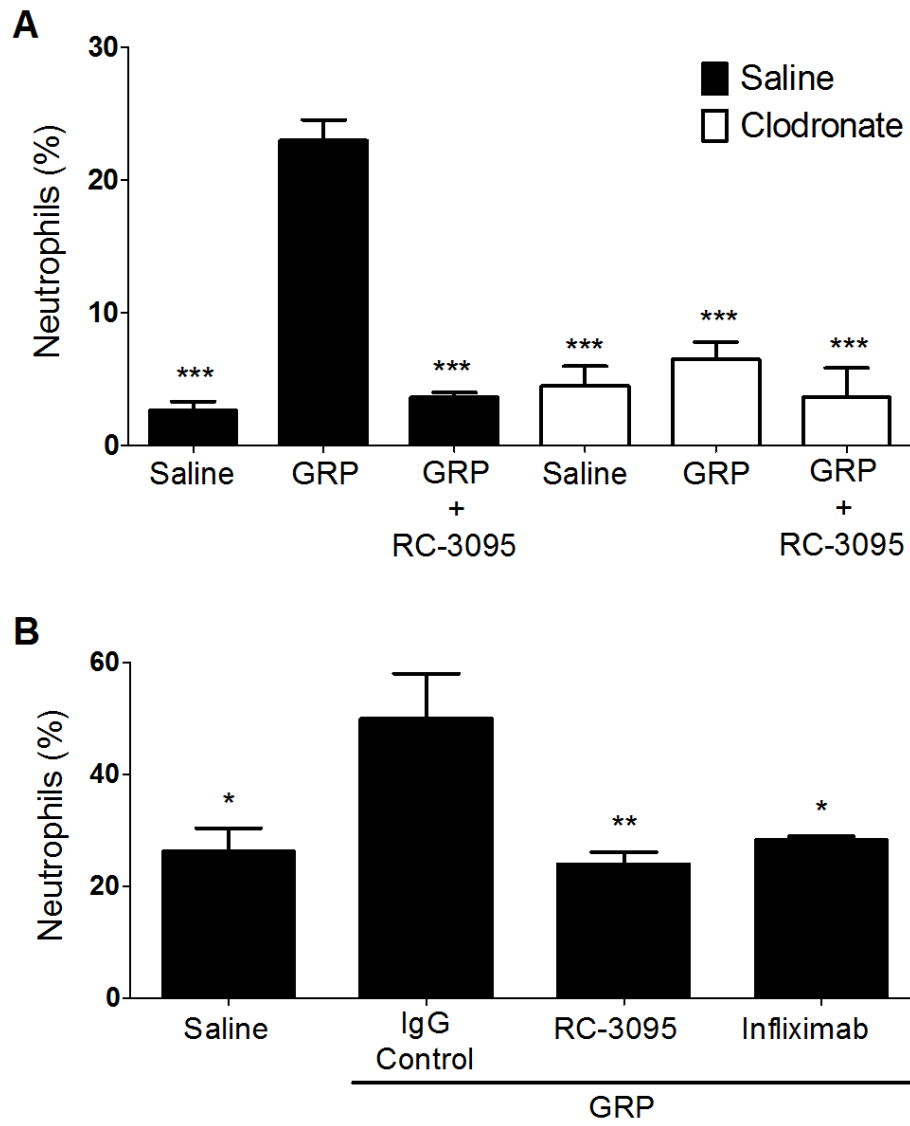


Figure 3:

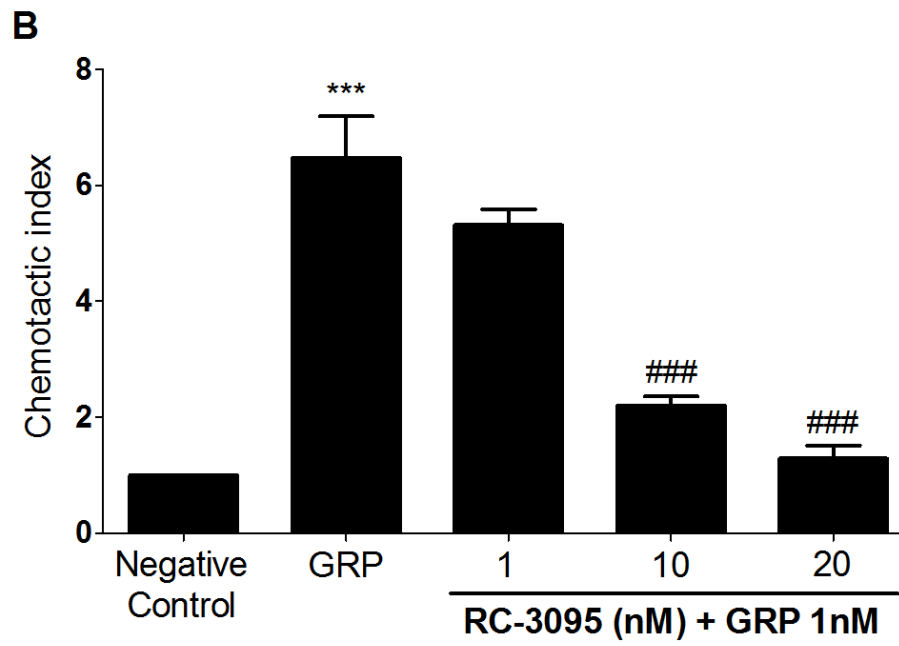
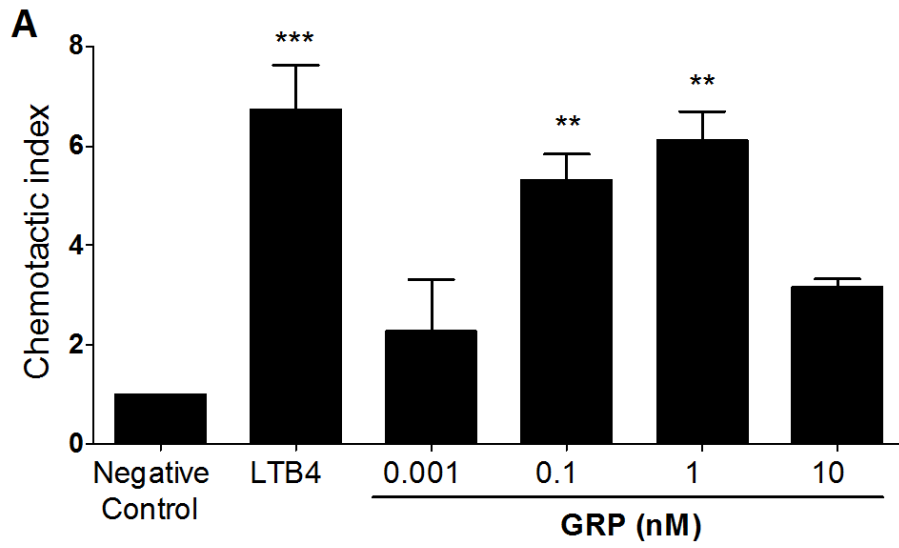


Figure 4:

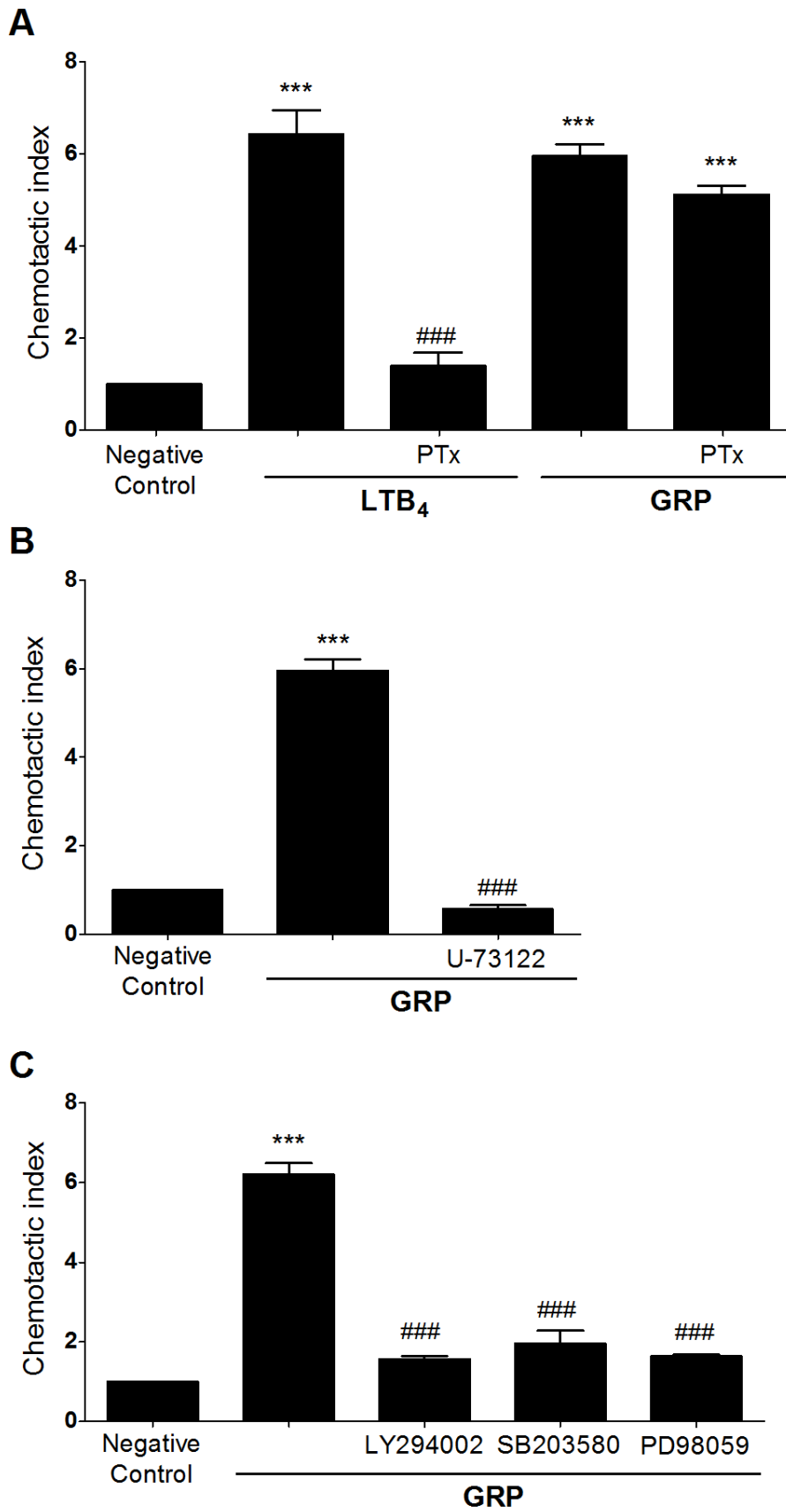


Figure 5:

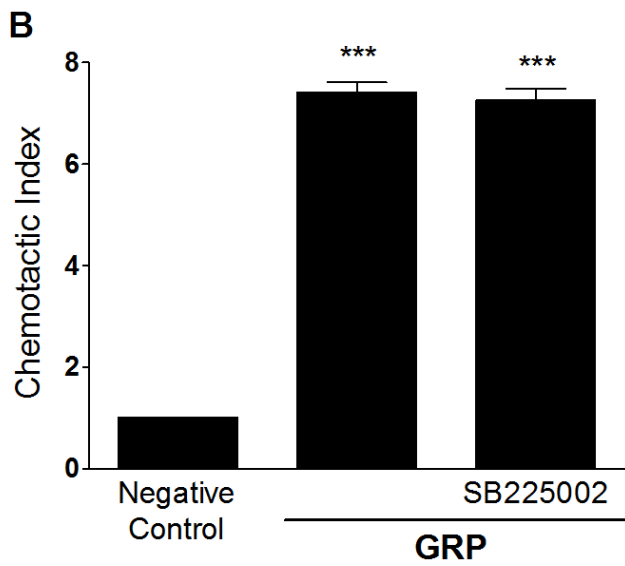
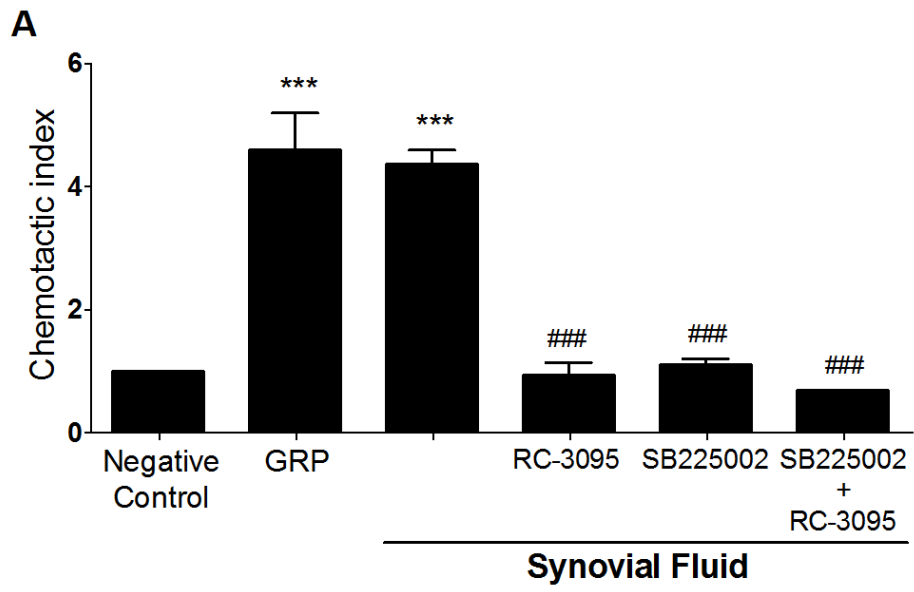
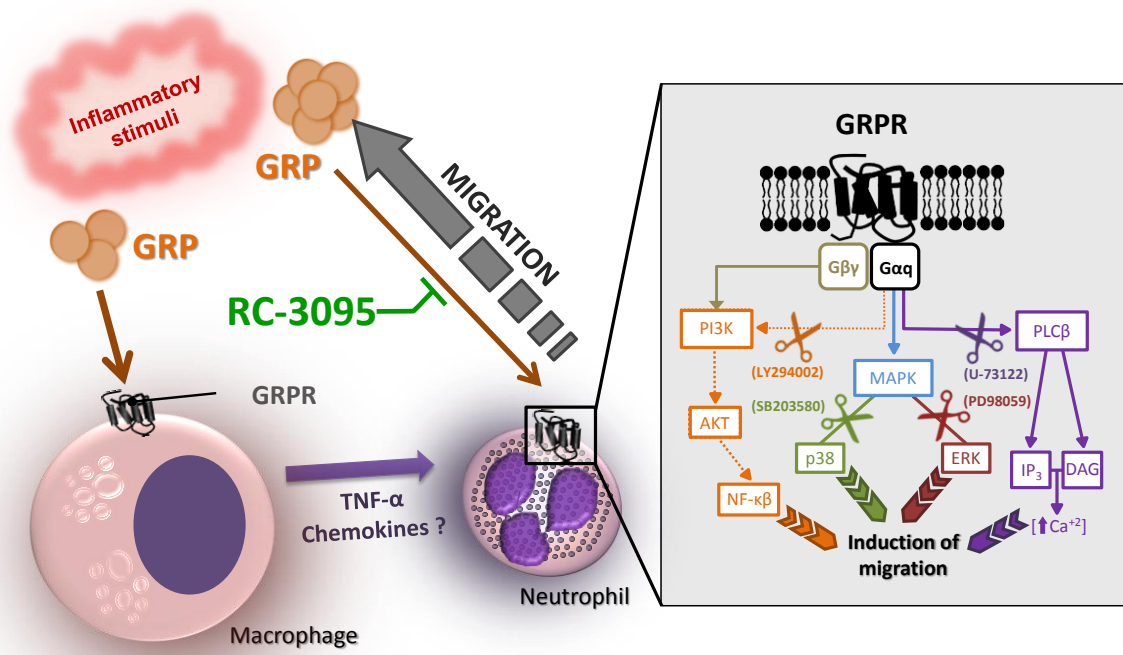


Figure 6:



3. CAPÍTULO 3

3.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho caracterizamos um novo papel de resposta da interação do GRP ao seu receptor específico, GRPR, descrevendo esse receptor como um receptor quimiotático. Observamos que o neuropeptídeo GRP pode induzir de forma direta a migração de neutrófilos humanos em um gradiente dose-dependente em forma de sino, classicamente encontrado quando se analisam os fatores quimiotáticos. Atestamos que essa migração depende de uma via alternativa de quimioatração, não dependente de proteína G α i, e provavelmente dependente de proteína G α q, pois o GRPR é um receptor transmembrana dessa natureza. Esse receptor atua através de vias de sinalização como PLC- β 2, PI3K e MAPK, p38 e ERK (resumo na figura 6 do Artigo Científico), que descrevemos através do pré-tratamento com antagonistas para essas quinases.

A migração de leucócitos conhecida até recentemente dependia da ativação de receptores quimiotáticos acoplados a proteína G α i (Rot e Von Andrian, 2004). Nos últimos anos foi descoberta a participação de receptores que se apresentam acoplada a proteína G α q (Shi, Partida-Sanchez, Misra *et al.*, 2007). Este trabalho caracterizou um novo receptor que possivelmente atua através dessa via de quimioatração alternativa. Porém, estudos complementares devem ser realizados para confirmar esse fato. Além disso, as outras vias de sinalização, induções de modificações no citoesqueleto e de ativação celular ainda não foram estudadas durante a indução de proteína G α q na quimiotaxia, e muito menos em resposta a indução por GRP.

In vivo, encontramos uma ativação indireta do recrutamento de neutrófilos, sendo abolida pelo anticorpo contra TNF- α , uma citocina pró-inflamatória chave para as respostas inflamatórias. Todavia, não encontramos nenhuma produção de outras citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, INF- γ) induzida por GRP ou diminuição destas, comparada ao controle, pelo antagonista específico RC-3095 em macrófagos peritoneais, BMDCs (*Bone marrow-derived dendritic cells*) e linfócitos T de camundongos, assim como neutrófilos, DCs e linfócitos humanos.

Realizamos Western Blot e Real-Time PCR para confirmar que todas essas subpopulações de células imunes pesquisadas expressavam o GRPR. Inicialmente no projeto, este dado era desconhecido na literatura, mas recentemente foi elucidado e por isso não foi apresentado no artigo científico (Zhou, Potts, Cuttitta *et al.*, 2011). Também observamos que a

linhagem de melanoma murino B16/F10 expressa o receptor, e este dado será incluído em próximos estudos de nosso grupo de pesquisa.

Como o GRP tem um papel importante como fator de crescimento, procuramos verificar se o tratamento com GRP e RC-3095 de linfócitos humanos e murinos, induzidos com PHA (fitohemaglutinina) ou ConA (concaivalina A), respectivamente, poderiam alterar a proliferação de linfócitos T, observada através do método de CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Todavia, não encontramos nenhuma diferença significativa por essa abordagem. Também tentamos verificar se a maturação de BMDCs era influenciada pelo tratamento com GRP ou RC-3095. Utilizando citometria de fluxo e anticorpos marcadores de maturação (CD11c, CD86 e B220), novamente não houve alterações comparadas ao controle nesses parâmetros.

O papel dos neuropeptídeos na Artrite Reumatóide (RA) foi recentemente descrito (Grimsholm, Rantapaa-Dahlqvist e Forsgren, 2005; Origuchi, Iwamoto, Kawashiri *et al.*, 2010), relacionando o GRP principalmente com a severidade da doença. Como neutrófilos estão envolvidos na inflamação das regiões afetadas, adaptamos nosso modelo de quimioatração para verificar a influência do GRP contido no líquido sinovial (LS) de paciente diagnosticados com a doença. Verificamos que pré-tratando neutrófilos com RC-3095, reduzimos a estimulação da migração em direção ao LS. Fato esse não foi dependente da citocina IL-8 presente no LS. Esse resultado, somado ao de outros autores, expressa que novos estudos utilizando o RC-3095 para o tratamento de RA devem ser desenvolvidos (Oliveira, Brenol, Edelweiss *et al.*, 2008).

Como abordado na introdução, a literatura de GRP predominantemente desenvolve-se em torno de sua função tumoral. Como sabemos, o sistema imune regula das mais variadas formas a prevenção do desenvolvimento tumoral, assim como por vezes os tumores aproveita-se de alguns tipos de respostas dele, como inflamação, para progredir (Swann, Vesely, Silva *et al.*, 2008; Hanahan e Weinberg, 2011). Em nossa descrição, o GRP está atuando diretamente, assim como indiretamente, como um quimioatrator de neutrófilos, o que evoca novas perguntas sobre o papel desse peptídeo na evolução de metástases e o crescimento tumoral estimulado pela resposta inflamatória associada a essas células imunes migratórias.

A função neuronal do GRP também foi bastante elucubrada e podemos assim fazer um paralelo das possíveis influências do peptídeo e seu receptor dentro das vias de interação do sistema nervoso e o sistema imune. Influências do estresse, depressão e desordens psiquiátricas em respostas imunes são conhecidas, porém dificilmente tratadas com essa perspectiva

(Segerstrom e Miller, 2004). Estudos mais aprofundados sobre a produção e atuação dos neuropeptídeos modulando processos imunológicos ainda devem ser desenvolvidos, assim como estudos mais detalhados sobre os efeitos do RC-3095 durante essa regulação.

Em suma, esse trabalho vem a contribuir na compreensão do GRP como molécula pró-inflamatória e propor um novo mecanismo pelo qual a ligação GRP/GRPR atua em doenças inflamatórias. Por conseguinte, propomos que futuros estudos utilizem-se dessa informação para avaliar melhores tratamentos para essas doenças.

REFERÊNCIAS

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMARES, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTZIK, A.; VAN DE VEEN, W.; ZELLER, S.; ZIMMERMANN, M.; AKDIS, C. A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-721 e70, Mar 2011.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Med Clin North Am**, v. 81, n. 1, p. 1-28, Jan 1997.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 787-820, 2007.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. **Experientia**, v. 27, n. 2, p. 166-7, Feb 15 1971.

BAJO, A. M.; SCHALLY, A. V.; GROOT, K.; SZEPEHAZI, K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. **Br J Cancer**, v. 90, n. 1, p. 245-52, Jan 12 2004.

BALDWIN, G. S.; PATEL, O.; SHULKES, A. Phylogenetic analysis of the sequences of gastrin-releasing peptide and its receptors: biological implications. **Regul Pept**, v. 143, n. 1-3, p. 1-14, Oct 4 2007.

BATTEY, J.; WADA, E.; WRAY, S. Bombesin receptor gene expression during mammalian development. **Ann N Y Acad Sci**, v. 739, p. 244-52, Oct 31 1994.

BATTEY, J. F.; WAY, J. M.; CORJAY, M. H.; SHAPIRA, H.; KUSANO, K.; HARKINS, R.; WU, J. M.; SLATTERY, T.; MANN, E.; FELDMAN, R. I. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 2, p. 395-9, Jan 15 1991.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 5 2004.

CHATZISTAMOU, I.; SCHALLY, A. V.; SZEPESHAZI, K.; GROOT, K.; HEBERT, F.; ARENCIBIA, J. M. Inhibition of growth of ES-2 human ovarian cancers by bombesin antagonist RC-3095, and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix. **Cancer Lett**, v. 171, n. 1, p. 37-45, Sep 28 2001.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010.

CICCHETTI, G.; ALLEN, P. G.; GLOGAUER, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 3, p. 220-8, 2002.

CORJAY, M. H.; DOBRZANSKI, D. J.; WAY, J. M.; VIALLET, J.; SHAPIRA, H.; WORLAND, P.; SAUSVILLE, E. A.; BATTEY, J. F. Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. **J Biol Chem**, v. 266, n. 28, p. 18771-9, Oct 5 1991.

CORNELIO, D. B.; DAL-PIZZOL, F.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Targeting the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor to treat sepsis. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 2, n. 3, p. 178-81, Nov 2007.

CORNELIO, D. B.; MEURER, L.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. **Oncology**, v. 73, n. 5-6, p. 340-5, 2007.

CORNELIO, D. B.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. **Ann Oncol**, v. 18, n. 9, p. 1457-66, Sep 2007.

COXON, P. Y.; RANE, M. J.; URIARTE, S.; POWELL, D. W.; SINGH, S.; BUTT, W.; CHEN, Q.; MCLEISH, K. R. MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. **Cell Signal**, v. 15, n. 11, p. 993-1001, Nov 2003.

CUTTITTA, F.; CARNEY, D. N.; MULSHINE, J.; MOODY, T. W.; FEDORKO, J.; FISCHLER, A.; MINNA, J. D. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. **Nature**, v. 316, n. 6031, p. 823-6, Aug 29-Sep 4 1985.

DAL-PIZZOL, F.; DI LEONE, L. P.; RITTER, C.; MARTINS, M. R.; REINKE, A.; PENS GELAIN, D.; ZANOTTO-FILHO, A.; DE SOUZA, L. F.; ANDRADES, M.; BARBEIRO, D. F.; BERNARD, E. A.; CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R.; SORIANO, F. G.; CLAUDIO, J.; MOREIRA, F.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 1, p. 84-90, Jan 1 2006.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-45, Aug 15 2008.

DE LA FUENTE, M.; DEL RIO, M.; HERNANZ, A. Stimulation of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities in mouse leukocytes by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C: involvement of cyclic AMP, inositol 1,4,5-trisphosphate and protein kinase C. **J Neuroimmunol**, v. 48, n. 2, p. 143-50, Nov-Dec 1993.

DEGEN, L. P.; PENG, F.; COLLET, A.; ROSSI, L.; KETTERER, S.; SERRANO, Y.; LARSEN, F.; BEGLINGER, C.; HILDEBRAND, P. Blockade of GRP receptors inhibits gastric emptying and gallbladder contraction but accelerates small intestinal transit. **Gastroenterology**, v. 120, n. 2, p. 361-8, Feb 2001.

DEL RIO, M.; DE LA FUENTE, M. Chemoattractant capacity of bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C is mediated through PKC activation in murine peritoneal leukocytes. **Regul Pept**, v. 49, n. 3, p. 185-93, Jan 13 1994.

DEL RIO, M.; HERNANZ, A.; DE LA FUENTE, M. Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C. **Peptides**, v. 15, n. 1, p. 15-22, Jan 1994.

DELGADO, A. V.; MCMANUS, A. T.; CHAMBERS, J. P. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. **Neuropeptides**, v. 37, n. 6, p. 355-61, Dec 2003.

ENGEL, J. B.; KELLER, G.; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G.; HAMMANN, B.; NAGY, A. Effective inhibition of experimental human ovarian cancers with a targeted cytotoxic bombesin analogue AN-215. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 6, p. 2408-15, Mar 15 2005.

ERSPAMER, V.; ERPAMER, G. F.; INSELVINI, M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. **J Pharm Pharmacol**, v. 22, n. 11, p. 875-6, Nov 1970.

FATHI, Z.; BENYA, R. V.; SHAPIRA, H.; JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F. The fifth transmembrane segment of the neuromedin B receptor is critical for high affinity neuromedin B binding. **J Biol Chem**, v. 268, n. 20, p. 14622-6, Jul 15 1993.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1317-27, Nov 2003.

FERNANDES-ALNEMRI, T.; YU, J. W.; DATTA, P.; WU, J.; ALNEMRI, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 509-13, Mar 26 2009.

FERRIS, H. A.; CARROLL, R. E.; LORIMER, D. L.; BENYA, R. V. Location and characterization of the human GRP receptor expressed by gastrointestinal epithelial cells. **Peptides**, v. 18, n. 5, p. 663-72, 1997.

FRIERI, M. Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 90, n. 6 Suppl 3, p. 34-40, Jun 2003.

GENTON, L.; KUDSK, K. A. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. **Am J Surg**, v. 186, n. 3, p. 253-8, Sep 2003.

GERARD, C.; GERARD, N. P. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. **Curr Opin Immunol**, v. 6, n. 1, p. 140-5, Feb 1994.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 1, p. 52-63, Jan 2007.

GORDY, C.; PUA, H.; SEMPOWSKI, G. D.; HE, Y. W. Regulation of steady-state neutrophil homeostasis by macrophages. **Blood**, Oct 27 2010.

GRIDER, J. R. Gastrin-releasing peptide is a modulatory neurotransmitter of the descending phase of the peristaltic reflex. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 6, p. G1109-G1115, 2004.

GRIMSHOLM, O.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S.; DALEN, T.; FORSGREN, S. Observations favouring the occurrence of local production and marked effects of bombesin/gastrin-releasing peptide in the synovial tissue of the human knee joint--comparisons with substance P and the NK-1 receptor. **Neuropeptides**, v. 42, n. 2, p. 133-45, Apr 2008.

GRIMSHOLM, O.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S.; FORSGREN, S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 3, p. R416-26, 2005.

GUNAL, O.; OKTAR, B. K.; OZCINAR, E.; TANSUKER, D.; ARBAK, S.; YEGEN, B. C. Healing-promoting effect of bombesin treatment on chronic gastric ulcer in rats. **Regul Pept**, v. 106, n. 1-3, p. 81-8, Jun 15 2002.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 187-200, Mar 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HEIT, B.; TAVENER, S.; RAHARJO, E.; KUBES, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. **J Cell Biol**, v. 159, n. 1, p. 91-102, Oct 14 2002.

HELLMICH, M. R.; BATTEY, J. F.; NORTHUP, J. K. Selective reconstitution of gastrin-releasing peptide receptor with G alpha q. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 2, p. 751-6, Jan 21 1997.

HERNANZ, A.; TATO, E.; DE LA FUENTE, M.; DE MIGUEL, E.; ARNALICH, F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. **J Neuroimmunol**, v. 71, n. 1-2, p. 25-30, Dec 1996.

HEUSER, M.; SCHLOTT, T.; SCHALLY, A. V.; KAHLER, E.; SCHLIEPHAKE, R.; LAABS, S. O.; HEMMERLEIN, B. Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell

carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. **J Urol**, v. 173, n. 6, p. 2154-9, Jun 2005.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 364-75, May 2009.

HIRSCH, E.; KATANAEV, V. L.; GARLANDA, C.; AZZOLINO, O.; PIROLA, L.; SILENGO, L.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A.; ALTRUDA, F.; WYMANN, M. P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science**, v. 287, n. 5455, p. 1049-53, Feb 11 2000.

HODGES, L. M.; WEISSMAN, M. M.; HAGHIGHI, F.; COSTA, R.; BRAVO, O.; EVGRAFOV, O.; KNOWLES, J. A.; FYER, A. J.; HAMILTON, S. P. Association and linkage analysis of candidate genes GRP, GRPR, CRHR1, and TACR1 in panic disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 150B, n. 1, p. 65-73, Jan 5 2009.

HOU, C.; KIRCHNER, T.; SINGER, M.; MATHEIS, M.; ARGENTIERI, D.; CAVENDER, D. In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17beta-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole -2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 2, p. 697-704, May 2004.

IMAEDA, A. B.; WATANABE, A.; SOHAIL, M. A.; MAHMOOD, S.; MOHAMADNEJAD, M.; SUTTERWALA, F. S.; FLAVELL, R. A.; MEHAL, W. Z. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. **J Clin Invest**, v. 119, n. 2, p. 305-14, Feb 2009.

INOHARA, N.; NUNEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 5, p. 371-82, May 2003.

IYER, S. S.; PULSKENS, W. P.; SADLER, J. J.; BUTTER, L. M.; TESKE, G. J.; ULLAND, T. K.; EISENBARTH, S. C.; FLORQUIN, S.; FLAVELL, R. A.; LEEMANS, J. C.;

SUTTERWALA, F. S. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 48, p. 20388-93, Dec 1 2009.

JENSEN, J. A.; CARROLL, R. E.; BENYA, R. V. The case for gastrin-releasing peptide acting as a morphogen when it and its receptor are aberrantly expressed in cancer. **Peptides**, v. 22, n. 4, p. 689-99, Apr 2001.

JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; SPINDEL, E. R.; BENYA, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 1, p. 1-42, Mar 2008.

KAMICHI, S.; WADA, E.; AOKI, S.; SEKIGUCHI, M.; KIMURA, I.; WADA, K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. **Brain Res**, v. 1032, n. 1-2, p. 162-70, Jan 25 2005.

KANASHIRO, C. A.; SCHALLY, A. V.; NAGY, A.; HALMOS, G. Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. **Int J Oncol**, v. 27, n. 1, p. 169-74, Jul 2005.

KATANAEV, V. L. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 66, n. 4, p. 351-68, Apr 2001.

KIARIS, H.; SCHALLY, A. V.; SUN, B.; ARMATIS, P.; GROOT, K. Inhibition of growth of human malignant glioblastoma in nude mice by antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide. **Oncogene**, v. 18, n. 50, p. 7168-73, Nov 25 1999.

LEHY, T.; PUCCIO, F.; CHARIOT, J.; LABELLE, D. Stimulating effect of bombesin on the growth of gastrointestinal tract and pancreas in suckling rats. **Gastroenterology**, v. 90, n. 6, p. 1942-9, Jun 1986.

LI, K.; NAGALLA, S. R.; SPINDEL, E. R. A rhesus monkey model to characterize the role of gastrin-releasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. **J Clin Invest**, v. 94, n. 4, p. 1605-15, Oct 1994.

LI, M. O.; SARKISIAN, M. R.; MEHAL, W. Z.; RAKIC, P.; FLAVELL, R. A. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1560-3, Nov 28 2003.

LUFT, T.; FLORES, D. G.; VIANNA, M. R.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I. A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. **Neuroreport**, v. 17, n. 9, p. 935-9, Jun 26 2006.

LUND, F. E.; RANDALL, T. D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 4, p. 236-47, Apr 2010.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat Immunol**, v. 6, n. 12, p. 1182-90, Dec 2005.

MACLEOD, M. K.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. **Immunology**, v. 130, n. 1, p. 10-5, May 2010.

MARRACK, P.; SCOTT-BROWNE, J. P.; DAI, S.; GAPIN, L.; KAPPLER, J. W. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 171-203, 2008.

MARTINEZ, A.; ZUDAIRE, E.; JULIAN, M.; MOODY, T. W.; CUTTITTA, F. Gastrin-releasing peptide (GRP) induces angiogenesis and the specific GRP blocker 77427 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 24, n. 25, p. 4106-13, Jun 9 2005.

MARTINEZ, V.; TACHE, Y. Bombesin and the brain-gut axis. **Peptides**, v. 21, n. 11, p. 1617-25, Nov 2000.

MARTINS, M. R.; REINKE, A.; VALVASSORI, S. S.; MACHADO, R. A.; QUEVEDO, J.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2525-9, Dec 2005.

MASLEN, G. L.; BOYD, Y. Comparative mapping of the Grpr locus on the X chromosomes of man and mouse. **Genomics**, v. 17, n. 1, p. 106-9, Jul 1993.

MCDONALD, T. J.; JORNVALL, H.; NILSSON, G.; VAGNE, M.; GHATEI, M.; BLOOM, S. R.; MUTT, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 90, n. 1, p. 227-33, Sep 12 1979.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, Nov 2001.

MEFFRE, E.; CASELLAS, R.; NUSSENZWEIG, M. C. Antibody regulation of B cell development. **Nat Immunol**, v. 1, n. 5, p. 379-85, Nov 2000.

MERCER, D. W.; CROSS, J. M.; CHANG, L.; LICHTENBERGER, L. M. Bombesin prevents gastric injury in the rat: role of gastrin. **Dig Dis Sci**, v. 43, n. 4, p. 826-33, Apr 1998.

MINAMINO, N. Neuromedin B: A novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, n. 2, p. 541-548, 1983.

MOODY, T. W.; MERALI, Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 511-20, Mar 2004.

MU, L.; HONER, M.; BECAUD, J.; MARTIC, M.; SCHUBIGER, P. A.; AMETAMEY, S. M.; STELLFELD, T.; GRAHAM, K.; BORKOWSKI, S.; LEHMANN, L.; DINKELBORG, L.; SRINIVASAN, A. In vitro and in vivo characterization of novel ¹⁸F-labeled bombesin analogues for targeting GRPR-positive tumors. **Bioconjug Chem**, v. 21, n. 10, p. 1864-71, Oct 20 2010.

NAGALLA, S. R.; BARRY, B. J.; CRESWICK, K. C.; EDEN, P.; TAYLOR, J. T.; SPINDEL, E. R. Cloning of a receptor for amphibian [Phe¹³]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 13, p. 6205-9, Jun 20 1995.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 3, p. 173-82, Mar 2006.

NEPTUNE, E. R.; BOURNE, H. R. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of G_i, not by activating G_q or G_s. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 26, p. 14489-94, Dec 23 1997.

NEVES, S. R.; RAM, P. T.; IYENGAR, R. G protein pathways. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1636-9, May 31 2002.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 12, p. 1619-38, Dec 2003.

OHKI-HAMAZAKI, H.; IWABUCHI, M.; MAEKAWA, F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. **Int J Dev Biol**, v. 49, n. 2-3, p. 293-300, 2005.

OLIVEIRA, P. G.; BRENOL, C. V.; EDELWEISS, M. I.; BRENOL, J. C.; PETRONILHO, F.; ROESLER, R.; DAL-PIZZOL, F.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, R. M. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1726-31, Oct 2008.

ORIGUCHI, T.; IWAMOTO, N.; KAWASHIRI, S. Y.; FUJIKAWA, K.; ARAMAKI, T.; TAMAI, M.; ARIMA, K.; NAKAMURA, H.; YAMASAKI, S.; IDA, H.; KAWAKAMI, A.; UEKI, Y.; MATSUOKA, N.; NAKASHIMA, M.; MIZOKAMI, A.; KAWABE, Y.; MINE, M.; FUKUDA, T.; EGUCHI, K. Reduction in serum levels of substance P in patients with rheumatoid arthritis by etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. **Mod Rheumatol**, Dec 29 2010.

ORLOFF, M. S.; REEVE, J. R., JR.; BEN-AVRAM, C. M.; SHIVELY, J. E.; WALSH, J. H. Isolation and sequence analysis of human bombesin-like peptides. **Peptides**, v. 5, n. 5, p. 865-70, Sep-Oct 1984.

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends Immunol**, v. 30, n. 11, p. 513-21, Nov 2009.

PATEL, O.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrin-releasing peptide and cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1766, n. 1, p. 23-41, Aug 2006.

PERSSON, K.; PACINI, G.; SUNDLER, F.; AHREN, B. Islet function phenotype in gastrin-releasing peptide receptor gene-deficient mice. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3717-26, Oct 2002.

PETRONILHO, F.; ARAUJO, J. H.; STECKERT, A. V.; REZIN, G. T.; FERREIRA, G. K.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. **Peptides**, v. 30, n. 8, p. 1460-5, Aug 2009.

PETRONILHO, F.; DE SOUZA, B.; VUOLO, F.; BENETTON, C. A.; STRECK, E. L.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL, F. Protective effect of gastrin-releasing peptide receptor antagonist in carrageenan-induced pleural inflammation in rats. **Inflamm Res**, v. 59, n. 9, p. 783-9, Sep 2010.

PETRONILHO, F.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL PIZZOL, F. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 6, n. 4, p. 197-200, Dec 2007.

PETROVSKY, N.; HARRISON, L. C. The chronobiology of human cytokine production. **Int Rev Immunol**, v. 16, n. 5-6, p. 635-49, 1998.

PINSKI, J.; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G.; SZEPESHAZI, K.; GROOT, K. Somatostatin analogues and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of human glioblastomas in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 54, n. 22, p. 5895-901, Nov 15 1994.

PINSKI, J.; YANO, T.; REKASI, Z.; CAI, R. Z.; RADULOVIC, S.; SCHALLY, A. V. High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. **Regul Pept**, v. 41, n. 3, p. 185-93, Oct 13 1992.

PORTO, B. N.; ALVES, L. S.; FERNANDEZ, P. L.; DUTRA, T. P.; FIGUEIREDO, R. T.; GRACA-SOUZA, A. V.; BOZZA, M. T. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. **J Biol Chem**, v. 282, n. 33, p. 24430-6, Aug 17 2007.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 419-45, 2000.

PRESTI-TORRES, J.; DE LIMA, M. N.; SCALCO, F. S.; CALDANA, F.; GARCIA, V. A.; GUIMARAES, M. R.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats:

Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 724-32, Mar 2007.

PUCCIO, F.; LEHY, T. Bombesin ingestion stimulates epithelial digestive cell proliferation in suckling rats. **Am J Physiol**, v. 256, n. 2 Pt 1, p. G328-34, Feb 1989.

QIN, Y.; ERTL, T.; CAI, R. Z.; HALMOS, G.; SCHALLY, A. V. Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. **Cancer Res**, v. 54, n. 4, p. 1035-41, Feb 15 1994.

RADULOVIC, S.; MILLER, G.; SCHALLY, A. V. Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin releasing peptide antagonist (RC-3095). **Cancer Res**, v. 51, n. 21, p. 6006-9, Nov 1 1991.

REZIN, G. T.; PETRONILHO, F. C.; ARAUJO, J. H.; GONCALVES, C. L.; DAUFENBACH, J. F.; CARDOSO, M. R.; ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G.; DAL-PIZZOL, F.; STRECK, E. L. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist or N-acetylcysteine combined with Omeprazol Protect against Mitochondrial Complex II Inhibition in a Rat Model of Gastritis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Dec 8 2010.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A.; SCHWARTSMANN, G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 5, p. 241-2; author reply 242-3, May 2004.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 197-204, Apr 2006.

ROESLER, R.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHWARTSMANN, G. The gastrin-releasing peptide receptor as a therapeutic target in central nervous system disorders. **Recent Pat CNS Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 125-9, Jun 2007.

ROESLER, R.; KOPCHINA, M. I.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A.; SOUZA, D. O.; SCHWARTSMANN, G. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 486, n. 1, p. 35-41, Feb 13 2004.

ROESLER, R.; LESSA, D.; VENTURELLA, R.; VIANNA, M. R.; LUFT, T.; HENRIQUES, J. A.; IZQUIERDO, I.; SCHWARTSMANN, G. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 4, p. 1041-5, Feb 2004.

ROESLER, R.; LUFT, T.; OLIVEIRA, S. H.; FARIAS, C. B.; ALMEIDA, V. R.; QUEVEDO, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHRODER, N.; IZQUIERDO, I.; SCHWARTSMANN, G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 2, p. 350-7, Aug 2006.

ROESLER, R.; MELLER, C. A.; KOPCHINA, M. I.; SOUZA, D. O.; HENRIQUES, J. A.; SCHWARTSMANN, G. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. **Peptides**, v. 24, n. 7, p. 1069-74, Jul 2003.

ROESLER, R.; VALVASSORI, S. S.; CASTRO, A. A.; LUFT, T.; SCHWARTSMANN, G.; QUEVEDO, J. Phosphoinositide 3-kinase is required for bombesin-induced enhancement of fear memory consolidation in the hippocampus. **Peptides**, v. 30, n. 6, p. 1192-6, Jun 2009.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 909-28, Aug 1 1997.

ROSE, J. J.; FOLEY, J. F.; MURPHY, P. M.; VENKATESAN, S. On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 24372-86, Jun 4 2004.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 891-928, 2004.

ROZENGURT, E.; SINNETT-SMITH, J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 10, p. 2936-40, May 1983.

RUFF, M.; SCHIFFMANN, E.; TERRANOVA, V.; PERT, C. B. Neuropeptides are chemoattractants for human tumor cells and monocytes: a possible mechanism for metastasis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 387-96, Dec 1985.

SANTOS, L. L.; FAN, H.; HALL, P.; NGO, D.; MACKAY, C. R.; FINGERLE-ROWSON, G.; BUCALA, R.; HICKEY, M. J.; MORAND, E. F. Macrophage migration inhibitory factor regulates neutrophil chemotactic responses in inflammatory arthritis in mice. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 4, p. 960-70, Apr 2011.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 18, n. 6, p. 639-49, Nov 2002.

SCHUBERT, M. L.; HIGHTOWER, J.; COY, D. H.; MAKHLOUF, G. M. Regulation of acid secretion by bombesin/GRP neurons of the gastric fundus. **Am J Physiol**, v. 260, n. 1 Pt 1, p. G156-60, Jan 1991.

SCHWARTSMANN, G.; DI LEONE, L. P.; DAL PIZZOL, F.; ROESLER, R. MAPK pathway activation in colorectal cancer: a therapeutic opportunity for GRP receptor antagonists. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 7, p. 444-5, Jul 2005.

SCHWARTSMANN, G.; DILEONE, L. P.; HOROWITZ, M.; SCHUNEMANN, D.; CANCELLA, A.; PEREIRA, A. S.; RICHTER, M.; SOUZA, F.; DA ROCHA, A. B.; SOUZA, F. H.; POHLMANN, P.; DE NUCCI, G. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide

(BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. **Invest New Drugs**, v. 24, n. 5, p. 403-12, Sep 2006.

SEGERSTROM, S. C.; MILLER, G. E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. **Psychol Bull**, v. 130, n. 4, p. 601-30, Jul 2004.

SHAN, L.; EMANUEL, R. L.; DEWALD, D.; TORDAY, J. S.; ASOKANATHAN, N.; WADA, K.; WADA, E.; SUNDAY, M. E. Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, n. 1, p. L165-73, Jan 2004.

SHI, G.; PARTIDA-SANCHEZ, S.; MISRA, R. S.; TIGHE, M.; BORCHERS, M. T.; LEE, J. J.; SIMON, M. I.; LUND, F. E. Identification of an alternative G α q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. **J Exp Med**, v. 204, n. 11, p. 2705-18, Oct 29 2007.

SHIBATA, F.; KONISHI, K.; NAKAGAWA, H. Chemokine receptor CXCR2 activates distinct pathways for chemotaxis and calcium mobilization. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 9, p. 1217-9, Sep 2002.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 427-39, Jun 2010.

SPANGRUDE, G. J.; SACCHI, F.; HILL, H. R.; VAN EPPS, D. E.; DAYNES, R. A. Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. **J Immunol**, v. 135, n. 6, p. 4135-43, Dec 1985.

SPINDEL, E. R.; GIBSON, B. W.; REEVE, J. R., JR.; KELLY, M. Cloning of cDNAs encoding amphibian bombesin: evidence for the relationship between bombesin and gastrin-releasing peptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 24, p. 9813-7, Dec 1990.

STADNYK, A. W. Cytokine production by epithelial cells. **FASEB J**, v. 8, n. 13, p. 1041-7, Oct 1994.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A. V.; LETSCH, M.; SZEPESHAZI, K.; NAGY, A.; HALMOS, G.; KANASHIRO, C. A.; COREY, E.; VESSELLA, R. Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 inhibits growth of experimental human prostate cancers. **Int J Cancer**, v. 118, n. 1, p. 222-9, Jan 1 2006.

STOJANOVICH, L. Stress and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A271-6, Mar 2010.

SUBRAMANIAM, M.; SUGIYAMA, K.; COY, D. H.; KONG, Y.; MILLER, Y. E.; WELLER, P. F.; WADA, K.; WADA, E.; SUNDAY, M. E. Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, n. 5, p. 601-11, Sep 1 2003.

SUNDAY, M. E.; YODER, B. A.; CUTTITTA, F.; HALEY, K. J.; EMANUEL, R. L. Bombesin-like peptide mediates lung injury in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. **J Clin Invest**, v. 102, n. 3, p. 584-94, Aug 1 1998.

SWANN, J. B.; VESELY, M. D.; SILVA, A.; SHARKEY, J.; AKIRA, S.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 2, p. 652-6, Jan 15 2008.

SZEPESHAZI, K.; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G.; LAMHARZI, N.; GROOT, K.; HORVATH, J. E. A single in vivo administration of bombesin antagonist RC-3095 reduces the levels and mRNA expression of epidermal growth factor receptors in MXT mouse mammary cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 20, p. 10913-8, Sep 30 1997.

TACHE, Y. CNS peptides and regulation of gastric acid secretion. **Annu Rev Physiol**, v. 50, p. 19-39, 1988.

TATSUTA, M.; IISHI, H.; BABA, M.; NARAHARA, H.; UEDO, N.; YANO, H.; YAMAMOTO, R.; MUKAI, M.; AKEDO, H. Induction by bombesin of peritoneal metastasis of gastric cancers induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Gastric Cancer**, v. 4, n. 1, p. 14-9, 2001.

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. **Nat Immunol**, v. 2, n. 2, p. 129-34, Feb 2001.

THELEN, M.; STEIN, J. V. How chemokines invite leukocytes to dance. **Nat Immunol**, v. 9, n. 9, p. 953-9, Sep 2008.

VAN BUUL, J. D.; HORDIJK, P. L. Signaling in leukocyte transendothelial migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 5, p. 824-33, May 2004.

VICENTE-MANZANARES, M.; SANCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 2, p. 110-22, Feb 2004.

VIVIER, E.; RAULET, D. H.; MORETTA, A.; CALIGIURI, M. A.; ZITVOGEL, L.; LANIER, L. L.; YOKOYAMA, W. M.; UGOLINI, S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 7 2011.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 349-74, Sep 2000.

WARD, S. G. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? **Trends in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 67-74, 2004.

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. **Physiol Rev**, v. 85, n. 4, p. 1159-204, Oct 2005.

WILLEY, J. C.; LECHNER, J. F.; HARRIS, C. C. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. **Exp Cell Res**, v. 153, n. 1, p. 245-8, Jul 1984.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 617-53, May 2000.

WU, D.; HUANG, C. K.; JIANG, H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 17), p. 2935-40, Sep 2000.

XIAO, D.; WANG, J.; HAMPTON, L. L.; WEBER, H. C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. **Gene**, v. 264, n. 1, p. 95-103, Feb 7 2001.

YANO, T.; PINSKI, J.; GROOT, K.; SCHALLY, A. V. Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. **Cancer Res**, v. 52, n. 16, p. 4545-7, Aug 15 1992.

YEGEN, B. C. Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. **Curr Pharm Des**, v. 9, n. 12, p. 1013-22, 2003.

ZHOU, S.; POTTS, E. N.; CUTTITTA, F.; FOSTER, W. M.; SUNDAY, M. E. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 5, p. 2100-5, Feb 1 2011.

ANEXO 1