

**Carlos Alberto Corrêa Antunes**



**PARTICIPAÇÃO DOS LEUCOTRIENOS NO  
DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA MURINO**

**Instituto de Microbiologia Profº Paulo de Góes  
Rio de Janeiro  
Março 2010**

Carlos Alberto Corrêa Antunes

Participação dos Leucotrienos no Desenvolvimento do Melanoma Murino.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof<sup>o</sup> Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadores: Cláudia Farias Benjamim e Marcelo Torres Bozza

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Microbiologia Prof<sup>o</sup> Paulo de Góes  
Rio de Janeiro  
2010

## Ficha catalográfica

Antunes, Carlos Alberto Corrêa

Participação dos leucotrienos no desenvolvimento do melanoma murino/  
Carlos Alberto Corrêa Antunes- Rio de Janeiro: UFRJ/ IMPPG, 2010.

XVIII, 70f. :il. ;31 cm.

Orientadores: Cláudia Farias Benjamim e Marcelo Torres Bozza.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ IMPPG/ Programa de Pós-Graduação  
em Ciências (Microbiologia), 2010.

Referências bibliográficas: f. 62-70.

1. Melanoma. 2. Leucotrienos. 3. 5-Lipoxigenase. 4. Câncer. I. Bozza,  
Marcelo Torres e Benjamim, Cláudia Farias. II. Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes,  
Programa de Pós-Graduação em ciências (microbiologia). III. Título.

Carlos Alberto Corrêa Antunes

Participação dos Leucotrienos no Desenvolvimento do Melanoma Murino.

Rio de Janeiro, 16 de Março de 2010

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Profº Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovado por:

---

Profº Dr. Bruno Lourenço Diaz- IBCCF - UFRJ

---

Profª Dra. Iolanda Margherita Fierro – IB - UERJ

---

Profª Dra. Elvira Saraiva- IMPPG - UFRJ

---

Profª Dra. Patrícia Dias Fernandes – ICB - UFRJ (suplente externa)

---

Profª Dra. Luciana Barros de Arruda Hinds – IMPPG - UFRJ (suplente interna)

---

Profª Dra. Juliana Echevarria Neves de Lima - IMPPG - UFRJ (revisora)

Março de 2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação, Estresse Oxidativo e Câncer (LIEC), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Cláudia Farias Benjamim e do Prof<sup>o</sup>. Marcelo Torres Bozza.

**“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”**

**Confúcio**

## **Agradecimentos**

À Deus por ter me dado forças para enfrentar esse desafio.

Aos meus pais Enilce Corrêa Antunes e Carlos Francisco Antunes pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos e, sem os quais eu não conseguiria chegar ao final

À minha irmã Alessandra Corrêa Antunes por conseguir me alegrar nos momentos mais improváveis e por todo o carinho que tem por mim,

Aos meus orientadores Claudia Farias Benjamim e Claudio Canetti por terem acreditado em mim desde o início, por sempre me permitirem trabalhar com a linha de pesquisa que mais me agradava, além da dedicação com os alunos e em conseguir melhorar a infra-estrutura do laboratório.

À doutoranda Cristiane Sécca pela sincera amizade e por sempre estar disposta a ajudar no que for e por preciso ter se mostrado uma pessoa muito especial em minha vida.

À mestranda Vanessa Martins pela ajuda com as referências bibliográficas e em experimentos, por ser uma grande amiga e por sempre me ajudar e ser um ombro amigo nas horas difíceis.

À aluna Cyntia Pecli que sempre tem uma palavra de apoio e carinho.

Ao aluno Leandro Ladislau, que conseguiu tornar os dias de trabalho mais engraçados com o seu “bom humor” peculiar.

À doutoranda Ariane Brogliato pelas primeiras orientações.

Ao doutorando Bruno Piva e ao professor Bruno Diaz por me ensinarem a trabalhar com cultura de células.

À professora Josiane Sabbadini Neves por ter fornecido o montelukast e por sempre estar disposta a tirar dúvidas e ajudar.

Ao professor Samuel Valença pela ajuda na realização das análises morfométricas.

À professora Claudia Netto Paiva pela ajuda na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao professor Marcelo Bozza por ter cedido seu espaço de laboratório e reagentes para a realização de experimentos.

À mestranda Ana Paula Monteiro e à doutoranda Carla Pinheiro pela ajuda com os experimentos de western blot.

À equipe do laboratório de Inflamação e Imunidade em especial aos alunos Guilherme Fortes, Letícia Alves, Fabianno Dutra e Jacilene que se mostraram sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos da graduação Flávia Dias, Ana Paula Martins, Janine Accioly, Bianca Barcellos, Débora Lauzin, Leandro Louback e Fabio Lírio pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos Claudio Monteiro e Cassiano Pereira, que, embora na maior parte do tempo longe, sempre se mostram verdadeiros amigos nos quais eu sempre posso contar.

Aos amigos de infância Franco Reis, Fernanda Reis e Daniele Araújo que sempre me apoiaram e que dispensam mais comentários

À amiga Luzia Maria da Silva, uma grande amiga e que faz o impossível para me ajudar.

À minha avó Maria da Conceição Paiva Corrêa (*in memorium*) que mesmo de longe continua a torcer por mim.

À minha avó Leonor Maria Antunes que sempre torceu por mim e que sempre é extremamente amorosa e carinhosa.

Aos meus padrinhos Oswaldina Vianna de Carvalho e Sebastião Carvalho que são para mim como meus segundos pai e mãe.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia Suellen D'arc de Oliveira, Humberto Muzzi, Marcela Jardim, Pedro Setti Perdigão e Renata Zardo pela convivência maravilhosa ao longo desses anos.

À doutoranda Tatiana Luna pela ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao CNPq e FAPERJ pelo financiamento do projeto.

Essa dissertação é dedicada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, em especial os meus pais Carlos Francisco Antunes e Enilce Corrêa Antunes, que me acompanharam de perto durante todos os momentos desta jornada

Carlos Alberto Corrêa Antunes

### Participação dos Leucotrienos no Desenvolvimento do Melanoma Murino

Resumo da Dissertação de Mestrado, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof<sup>o</sup> Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Nas últimas décadas o melanoma vem se tornando um importante problema de saúde pública, pois, o número de casos e a mortalidade aumentaram significativamente. Nosso trabalho teve como objetivo investigar o papel dos leucotrienos (LTs) nessa doença, utilizando camundongos selvagens (WT) e deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (5-LO<sup>-/-</sup>), animal incapaz de produzir tanto o LTB<sub>4</sub> quanto os cisteinil leucotrienos (cis-LTs; LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>). Para induzir um quadro de melanoma metastático, e grave administramos por via endovenosa a linhagem celular B16F10. Nossos resultados mostraram que independente das diferentes quantidades de células B16F10 injetadas, o número de nódulos tumorais metastáticos foi maior nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> do que nos animais WT. A análise histológica revelou um maior número de metástases tumorais nos animais 5-LO<sup>-/-</sup>, assim como a análise morfométrica também indicou um infiltrado leucocitário maior (macrófagos e neutrófilos) neste grupo experimental. Experimentos de sobrevida confirmaram a maior suscetibilidade dos animais 5-LO<sup>-/-</sup>, pois somente 30% destes animais sobreviveram contra 100% de sobrevivência dos animais WT. Avaliamos se esse efeito era restrito ao pulmão, injetamos as células subcutaneamente e observamos o mesmo fenômeno, isto é, um crescimento maior da massa tumoral nos animais deficientes. A fim de identificar a classe de LTs responsável pela proteção contra o melanoma, utilizamos antagonistas dos receptores BLT<sub>1</sub> (Ly292476) e Cys-LT<sub>1</sub> (montelukast). Verificamos em animais que receberam células B16F10 que em ambos os grupos tratados com os inibidores, houve aumento no número de nódulos, contudo, os Cys-LTs parecem ser mais importantes neste processo. A análise histológica também foi realizada e observamos que a estrutura alveolar e a pleura estavam mais comprometidas nos animais tratados com montelukast. Na tentativa de estabelecer o mecanismo envolvido no aumento da susceptibilidade observada nos animais 5-LO<sup>-/-</sup>, analisamos a produção de IL-4 nos animais injetados com as células B16F10. O resultado sugere uma tendência de aumento de produção dessa citocina nos animais 5-LO<sup>-/-</sup>. Em conjunto, nossos dados apontam para um importante papel dos LTs no controle do desenvolvimento tumoral.

Palavras chave: 5-lipoxigenase, melanoma, leucotrienos, B16F10, LTB<sub>4</sub>, cisteinil-leucotrienos.

Rio de Janeiro  
Março de 2010

Carlos Alberto Corrêa Antunes

Participação dos Leucotrienos no Desenvolvimento do Melanoma Murino

Resumo da Dissertação de Mestrado, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof<sup>o</sup> Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

**ABSTRACT**

In the last decades the number of cases and mortality of melanoma increased significantly. Our work investigate the role of leukotrienes (LTs) on this disease, using wild type and 5-lipoxygenase deficient mice (5-LO<sup>-/-</sup>), in which the animal does not produce neither LTB<sub>4</sub> nor cysteinyl leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> or LTE<sub>4</sub>). In order to induce metastatic melanoma scenario, which is the most serious and worst prognostic of the disease, we injected intravenously the cellular lineage B16F10. Our results show that when the animals receive a inoculum with several amounts of B16F10 cells the 5-LO<sup>-/-</sup> animals presented higher number of tumoral nodules. Histological analysis also revealed a higher number of tumoral metastasis on the 5-LO<sup>-/-</sup> animals, and the morfometric analysis indicated a higher leukocyte infiltration (macrophages and neutrophils) in this experimental group. The survival experiment confirmed the previously observations, in which 5-LO<sup>-/-</sup> animals survived only 30% while 100% of WT mice survived. In order to evaluate if this effect was restricted to the lung tissue, we injected subcutaneously B16F10 cells and observed the same pattern of growth, a larger tumor mass in 5-LO<sup>-/-</sup> animals compared to WT mice. Then, we investigated which LTs class was responsible for the protection against melanoma by using antagonists for the receptors BLT<sub>1</sub> (Ly292476) and Cys-LT<sub>1</sub> (montelukast). We could observe in both groups, a great number of tumor nodules in the lung and pleura, however, Cys-LTs seemed to be more important in this process. The histological analysis was also performed and revealed more damages to the alveolar structure in the animals treated with montelukast. We tried to establish the mechanism involved in the increased susceptibility in the 5-LO<sup>-/-</sup> animals by checking the lung production of IL-4 in the injected animals with B16F10 cells. The result suggest a possible increase in the production of this cytokine by 5-LO<sup>-/-</sup> animals. Taken together our results suggest that LTs play a crucial role in the control of melanoma growth.

Keywords: 5-lipoxygenase, melanoma, leukotrienes, B16F10, LTB<sub>4</sub>, cysteinyl-leukotrienes.

Rio de Janeiro  
March 2010

## Índice

1- Introdução.....	18
1.1- Melanoma: Epidemiologia.....	18
1.2- Mecanismos do melanoma.....	20
1.3- Inflamação e Câncer.....	23
1.4- Enzima 5-lipoxigenase (5-LO).....	25
1.5- Leucotrienos e Imunidade Inata.....	29
1.6- Mediadores Lipídicos e Câncer.....	30
1.7 Linhagem celular B16F10.....	33
1.8- Terapêutica.....	34
2- Hipótese.....	36
3- Objetivos.....	36
4- Metodologia.....	37
4.1- Animais.....	37
4.2- Cultura de células.....	37
4.3- Modelo de metástase <i>in vivo</i> .....	37
4.4- Modelo de crescimento local <i>in vivo</i> .....	38
4.5- Análise histológica.....	38
4.6- Morfometria.....	38
4.7- Sobrevida.....	39
4.8- Inibição farmacológica.....	39
4.9- Quantificação de IL-4 por ELISA.....	39
4.10- Análise estatística.....	40
5- Resultados.....	41
5.1- Crescimento tumoral metastático nos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> .....	41
5.2- Quantificação do número de nódulos metastáticos por análise histológica em animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> desafiados com B16F10.....	44
5.3- Análise histológica dos pulmões dos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> desafiados com 2 x 10 <sup>5</sup> células B16F10.....	45
5.4- Análise morfométrica dos pulmões dos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> .....	47
5.5- Curva de sobrevida dos camundongos WT e 5-LO <sup>-/-</sup> injetados com células B16F10.....	48

5.6- Avaliação do crescimento tumoral local nos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> injetados com B16F10 .....	49
5.7-Inibição farmacológica.....	50
5.8- Quantificação de IL-4.....	55
6- Discussão.....	56
7- Conclusão.....	61
8- Perspectivas futuras.....	61
9- Referências Bibliográficas.....	62

## Índice de Figuras

Figura 1- Foto representativa de um melanoma.....	19
Figura 2- O <i>locus</i> CDKN2A e o controle do ciclo celular.....	21
Figura 3- Representação da estrutura da enzima 5-LO com seus respectivos domínios catalíticos.....	26
Figura 4- a) Representação da via da 5-LO com seus respectivos produtos. b) Representação da enzima 5 lipoxigenase evidenciando todas as moléculas que a regulam.....	28
Figura 5- Representação da produção de leucotrienos com a respectiva ligação dos mesmos aos seus receptores.....	32
Figura 6- Foto representativa do crescimento tumoral nos animais.....	42
Figura 7- Número de nódulos tumorais de animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> desafiados com células B16F10.....	43
Figura 8- Número de nódulos metastáticos por campo em animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> injetados com 2 x 10 <sup>5</sup> células B16F10.....	44
Figura 9 – Análise histológica do pulmão dos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> .....	46
Figura 10- Análise morfométrica de animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> .....	47
Figura 11- Sobrevida dos animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> desafiados com células B16F10.....	48
Figura 12- Massa dos tumores injetados s.c. em animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> .....	49
Figura 13- Número de nódulos tumorais em animais tratados com Ly 292476, montelukast e salina.....	51
Figura 14- Análise histológica do pulmão dos animais tratados com Salina e Ly 292476.....	52

Figura 15- Análise histológica do pulmão dos animais tratados com Salina e com montelukast.....	53
Figura 16- Análise morfológica de lâminas histológicas provenientes de animais WT tratados com salina, montelukast e Ly292476.....	54
Figura 17- Quantificação da citocina IL-4 em animais WT e 5-LO <sup>-/-</sup> desafiados com B16F10 ou salina.....	55
Figura 18- Representação esquemática das células que respondem ao LTD <sub>4</sub> através do receptor Cys-LT <sub>1</sub> e das células que respondem ao LTB <sub>4</sub> através do receptor BLT <sub>1</sub> .....	57

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1- Ciclinas e CDKs correspondentes.....	21
--	----

## Lista de abreviaturas

AA- Ácido Araquidônico

CaMKII – proteína quinase cálcio calmodulina

CCS- Centro de Ciências da Saúde

CCND1 – ciclina D1

CDKs – quinases dependentes de ciclinas

CEUA- Comissão de Ética e Uso de Animais

cPLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica

CR1 – receptor de complemento 1

CR3 – receptor de complemento 3

CR4 – receptor de complemento 4

Cys-LTs – cisteinil leucotrienos

DCs – células dendríticas

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EGF – fator de crescimento epidermal

ERK – quinases reguladas por sinais extracelulares

FLAP – proteína ativadora da 5-lipoxigenase

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

H&E- hematoxilina e eosina

ICB- Instituto de Ciências Biomédicas

IFN- $\alpha$  – interferon alfa

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IL-2 – interleucina - 2

IL-4 – interleucina - 4

IL-6 – interleucina – 6

INCA- Instituto Nacional do Câncer

i.p. – intraperitoneal

i.v. - intravenoso

LAT- Laboratório de Animais Transgênicos

LPS - lipopolissacarídeo

LTs – leucotrienos

LTA<sub>4</sub> – leucotrieno A<sub>4</sub>

LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>

LTC<sub>4</sub> – leucotrieno C<sub>4</sub>

LTD<sub>4</sub> – leucotrieno D<sub>4</sub>

LTE<sub>4</sub> – leucotrieno E<sub>4</sub>

MMP-9 –metalopeptidase matriz -9

NK – células natural killer

PAF – fator ativador de plaquetas

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

PBS – tampão salina fosfato

PDGF- fator de crescimento derivado de plaqueta

PKA – proteína quinase A

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

RB1 - proteína retinoblastoma 1

TAMs – macrófagos associados a tumores.

TXA<sub>2</sub> – tromboxana A<sub>2</sub>

TNF –  $\alpha$  – fator de necrose tumoral- $\alpha$

ROS – espécies reativas de oxigênio

s.c.- subcutâneo

STAT-3 – transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

SFB – Soro fetal bovino

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformador  $\beta$

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

WT – animal selvagem

5-LO – enzima 5-lipoxigenase

5-LO<sup>-/-</sup> - animal deficiente para a enzima 5- lipoxigenase

## 1) Introdução

### 1.1) Melanoma: Epidemiologia

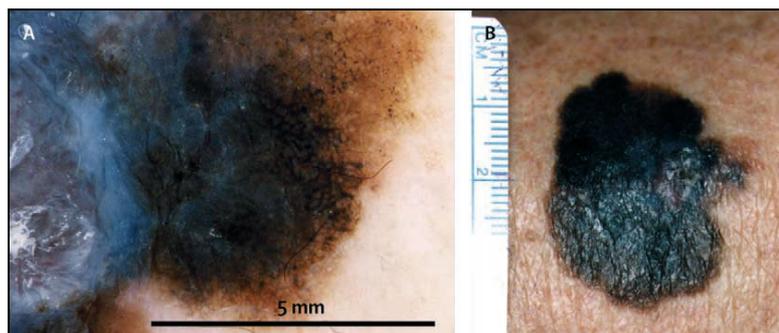
Nas últimas décadas, o melanoma tornou-se um importante problema de saúde pública, pois, desde 1960 sua incidência tem aumentado de 3 a 8% ao ano na população europeia, principalmente em homens idosos (AMSTRONG *et al.*, 2004).

Nos Estados Unidos, um estudo compreendido entre 1992 e 2004 verificou a incidência dessa patologia, onde diagnosticou-se 70.596 novos casos, representando um aumento geral no número de casos de 45% durante todo o período de estudo e de 3,1% ao ano. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou maior prevalência entre homens idosos, assim como no estudo europeu, e que a taxa de mortalidade da doença aumentou 0,4% ao ano (LINOS *et al.*, 2009).

No Brasil, as informações epidemiológicas referentes à doença são escassas, havendo um estudo realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) que consiste em uma estimativa de novos casos de diversos tipos de cânceres. Para o ano de 2010 são esperados 2.960 novos casos em homens e 2.970 novos casos em mulheres. A região Sul é a de maior prevalência, tanto em homens quanto em mulheres, mostrando que não há diferença significativa em relação ao gênero dos indivíduos afetados como indicado nos estudos americano e europeu (CORDEIRO *et al.*, 2009)

O diagnóstico dessa doença pode ser feito facilmente por um exame clínico, que observa determinadas características comuns aos melanomas, como **A**ssimetria, **B**orda irregular, **C**oloração diferenciada, com tons variando entre castanho escuro e preto, e **D**iâmetro superior a 6 mm, sistema **ABCD** de diagnóstico (FRIEDMAN *et al.*, 1985). Na **figura 1** podemos observar um caso clínico de melanoma onde os parâmetros acima descritos são observados.

Outra forma de diagnóstico é feita através da biópsia, que fornece detalhes da espessura do tumor, ulceração e alta taxa de mitose. Quando o diagnóstico clínico é incerto a possibilidade da existência de um melanoma não pode ser excluída (THOMPSON *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Foto representativa de um melanoma (THOMPSON *et al.*, 2005).

Uma vez diagnosticado, deve-se avaliar a profundidade da invasão que é o parâmetro histológico mais importante para avaliar o prognóstico de um tumor primário. Assim, foi criado um sistema de classificação em cinco níveis. No nível I, todas as células tumorais estão acima da membrana basal. No nível II, as células tumorais invadem a derme papilar. Quando ocorre evolução para o nível III, os tumores preenchem toda a derme papilar, podendo também haver células tumorais entre as fibras colágenas da derme reticular. O nível IV é caracterizado pela invasão da derme reticular. Quando os tumores invadem o tecido adiposo subcutâneo trata-se do nível V (MARKOVIC *et al.*, 2007).

Aliado à classificação mencionada anteriormente, deve-se realizar a biópsia do linfonodo sentinela que é, minimamente, invasiva para identificar pacientes com metástases ocultas nesta região. O racional deste procedimento reside no fato que, no caso de uma metástase para uma região de linfóide, o linfonodo sentinela seria o primeiro a ser atingido no decorrer do processo (DEMIERRE *et al.*, 2008).

A caracterização das amostras pode ser realizada por ensaio de coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e/ou através da marcação contra os antígenos S-100, Melan-A e HMB-45 encontrados em melanomas (DEMIERRE *et al.*, 2008). Esse procedimento é recomendado para todos os pacientes que possuam melanoma com espessura maior ou igual a 1 mm (DEMIERRE *et al.* 2008).

Como a identificação da fase em que se encontra a doença é fundamental para determinar a terapia a ser adotada, os estágios da doença serão listados a seguir (MARKOVIC *et al.*, 2007):

**Estágio I:** lesões primárias que possuem 1mm ou menos de espessura sem evidência de metástase, apresentando 85-99% de cura (BALCH *et al.*, 2001).

**Estágio II:** lesões mais espessas sem evidência de metástase, apresentando 85-99% de cura (BALCH *et al.*, 2001)

**Estágio III:** o melanoma se espalha para linfonodos regionais e/ou metástases *in-transit* ou satélite presentes, apresentando 25-60% de cura (BALCH *et al.*, 2001)

**Estágio IV:** o melanoma forma metástases em locais distantes incluindo a pele, tecido subcutâneo, linfonodos e órgãos distais, apresentando 9-15% de cura (BALCH *et al.*, 2001).

## 1.2) Mecanismos do melanoma

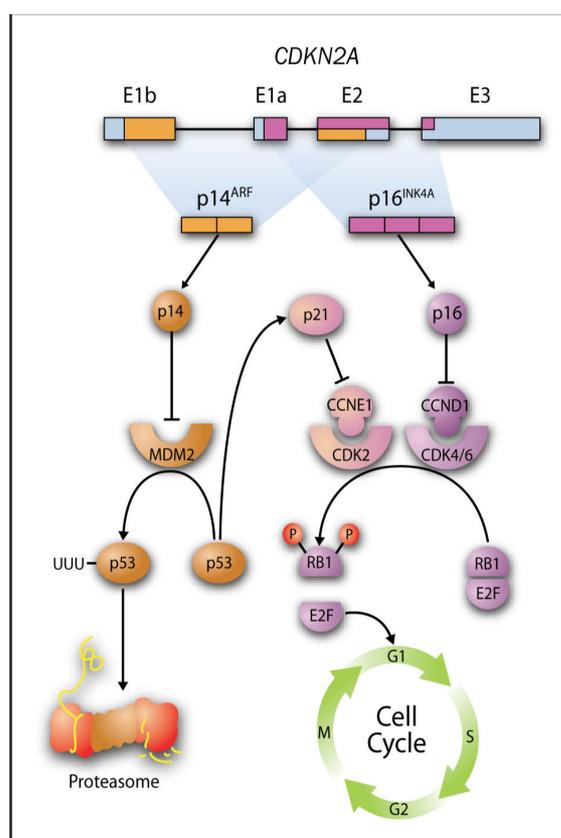
O mecanismo de desencadeamento da doença se dá, principalmente, através de alterações no controle do ciclo celular e dos mecanismos de sinalização celular.

O ciclo celular é uma sequência de eventos cuidadosamente orquestrada, influenciada por muitos fatores como a diferenciação celular, ativação de receptores celulares, disponibilidade de nutrientes e níveis de estresse celular. Praticamente todos esses fatores levam a mudanças nos padrões de sinalização celular que convergem em reguladores da progressão do ciclo celular, as ciclinas, as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores do ciclo celular, como por exemplo, a p16 que inibe CDK4 (p16<sup>INK4A</sup>) ou a p14 com *frame* de leitura alternativa (p14<sup>ARF</sup>). Durante o ciclo celular, diferentes ciclinas se ligam e ativam suas CDKs correspondentes, induzindo a fosforilação de proteínas alvo, que estimulam a progressão do ciclo celular. Os inibidores do ciclo celular bloqueiam a atividade dos complexos ciclinas-CDKs, impedindo os eventos de fosforilação que promovem proliferação (SEKULIC *et al.*, 2008).

Quando há desregulação no ciclo celular e/ou em seus componentes, pode ocorrer proliferação descontrolada com consequências catastróficas. Dentre as aberrações mais comuns, destacam-se as que afetam o *locus* genético da CDKN2A que controla as vias de RB1 (associada com supressão de tumores) e da proteína p53 (que também atua como supressora de tumores) como pode ser visto na **figura 2**. A **tabela 1** exemplifica os tipos de ciclinas e CDKs correspondentes.

Ciclina	CDK correspondente
Ciclina D	Cdk4, Cdk6
Ciclina E	Cdk2
Ciclina A	Cdk2, Cdk1
Ciclina B	Cdk1

**Tabela 1:** Ciclinas e CDKs correspondentes. (ALBERTS *et al.*, 2008)



**Figura 2:** O locus *CDKN2A* e o controle do ciclo celular. O RB1 controla a transição da fase G1 para S do ciclo celular, funcionando como uma importante ferramenta de manutenção do mesmo. Na sua forma nativa hipofosforilada, o RB1 se liga e sequestra o fator de transcrição E2F, evitando que esse fator induza a expressão de genes essenciais para a transição da fase G1 para S. Entretanto, quando RB1 é hiperfosforilado, o fator E2F é liberado, podendo agir em seus genes alvos, levando à progressão do ciclo celular. Esse passo crucial de fosforilação de RB1 é promovido pelo complexo ciclina D1 (CCND1) e CDK4 ou 6 (SEKULIC *et al.*, 2008). RB1 – retinoblastoma 1; E2F – família de genes que codificam fatores de transcrição; E1b, E1a, E2, E3 – regiões de éxons; MDM2 – oncogene murino duplo minuto.

Em casos de melanoma são observadas, frequentemente, mutações afetando o *locus* CDKN2A, que atingem a CDK4, sugerindo um papel essencial desta proteína na manutenção do controle do ciclo celular nos melanócitos. Em 50% dos casos o gene encontra-se eliminado, ou inativado por mutações pontuais, em aproximadamente, 9% dos casos de tumores (Bennett, 2008). Além disso, o gene CDK4 também pode estar silenciado por metilação na região promotora, processo que interfere com a expressão do gene. A hipermetilação tem sido descrita em proporções que variam de 20% a 75% dos melanomas (BENNETT 2008; MARINI *et al.*, 2006)

A proteína p53 ativa o bloqueio de segurança na proliferação celular. Alterações inibitórias na expressão da p53 são observadas em células tumorais, alterando o ciclo celular e favorecendo a proliferação.

Em relação às alterações nas vias de sinalização celular, podemos destacar o papel da MAPK, que possui uma função chave no desenvolvimento de muitos tumores sólidos, incluindo o melanoma.

A ativação de MAPK1 e MAPK3 induz inúmeros processos mitogênicos e de sobrevivência, incluindo proliferação e proteção contra a morte celular por apoptose, através da interação de múltiplos substratos no citosol e subsequente fosforilação de fatores de transcrição (BRAIG E SCHMITT 2006).

Outra forma de desencadeamento da doença se dá, principalmente, através da exposição à radiação UV, promovendo efeitos mutagênicos diretos no DNA, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da melanina. A melanina é convertida de uma forma antioxidante para uma forma pró-oxidante causando mutações ao DNA, afetando p53 e, como consequência, inibindo a apoptose. Assim, pode-se dizer que o melanoma se desenvolve a partir de anormalidades genéticas envolvendo a via de produção de melanina (SATYAMOORTHY *et al.*, 2002; MEYSKENS *et al.*, 2004).

### 1.3) Inflamação e Câncer

A resposta inflamatória é de vital importância para a sobrevivência frente aos patógenos e lesões. Contudo, em algumas doenças como o câncer a resposta inflamatória exacerbada e/ou duradoura pode gerar danos ao organismo (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Assim, várias células e mediadores estão envolvidos com a patologia do câncer, dentre os quais destacamos os macrófagos associados a tumores (TAM), células dendríticas e as citocinas fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 6 e 4 (IL-6 e IL-4).

O TNF- $\alpha$  é uma reconhecida citocina pró-inflamatória que exerce funções bastante distintas frente aos tumores. Em altas concentrações essa citocina é prejudicial ao tumor, induzindo a necrose dos vasos sanguíneos. Contudo, em concentrações menores, pode induzir a produção de mediadores angiogênicos e promover o crescimento tumoral, a medida que contribui para o remodelamento tecidual e para o desenvolvimento de um estroma necessário para o crescimento do tumor (GAIOTTI *et al.*, 2000).

Essa citocina pode ser detectada em vários tipos de cânceres entre eles: ovário (BURKE *et al.*, 1996), mama (KOONG *et al.*, 2000), próstata (KOLLIAS *et al.*, 1999), coloretal (LEJEUNE *et al.*, 1998), linfomas e leucemias (NAYLOR *et al.*, 1993). Foi mostrado que o TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a invasão e migração *in vitro* de melanoma humano através de uma camada de fibronectina (KATERINAKI *et al.*, 2003). Outra forte evidência do envolvimento direto do TNF- $\alpha$  em tumores provém das observações de que camundongos deficientes na expressão do gene que codifica o TNF- $\alpha$  são resistentes ao desenvolvimento de câncer de pele (BALWILL E MANTOVANI, 2001)

A citocina IL-6 é capaz de modular a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, assim como inibir a apoptose através da ativação da via de sinalização JAK-STAT (LIN E KARIN, 2007). A análise de biópsias de pacientes com câncer gástrico mostrou que os níveis dessa citocina estavam muito elevados quando comparados com a normal (KAI *et al.*, 2005). Além disso, em tumores de cólon, os níveis plasmáticos de IL-6 apresentaram uma correlação positiva com o desenvolvimento da doença (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Inicialmente, achava-se que a citocina IL-4 poderia desempenhar um importante papel no combate à diferentes tumores, pois observou-se em modelos murinos a rejeição de tumores que produziam IL-4 (GOLUMBEK *et al.* 1991). Verificou-se também que essa citocina exercia também efeito como agente anti-tumoral em câncer renal (GOLUMBEK *et al.*, 1991) e de cólon (STOPPACCIARO *et al.*, 1997; RODOLFO *et al.*, 1999). Entretanto, nos últimos anos essa citocina tem sido associada com o desenvolvimento tumoral, pois se trata de uma citocina de padrão Th2, responsável por induzir a diferenciação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não líticos contra tumores (KIENZLE *et al.*, 2002; KIENZLE *et al.*, 2005). Além disso, várias células tumorais expressam receptores para IL-4 como células de sarcoma murino (PURI *et al.*, 1991), células humanas de carcinoma renal (OBIRI *et al.*, 1993), câncer de pulmão humano (KAWAKAMI *et al.*, 2002a), sarcoma de Kaposi humano associado a AIDS (HUSAIN *et al.*, 1999),

Os macrófagos podem ser divididos em duas classes principais, os macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 se originam a partir do encontro com interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e estímulos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) e são caracterizados pela alta síntese de IL-12, ativação de resposta Th1, atividade citotóxica contra microorganismos fagocitados e células neoplásicas. (SOLINAS *et al.*, 2009)

Entretanto, os monócitos se diferenciam em macrófagos M2, quando são estimulados com IL-4 e IL-13, por imuno-complexos, ligantes de TLR, com IL-10 ou glicocorticóides. Essa classe de macrófagos é caracterizada pela secreção de grandes quantidades de IL-10, CCL17, CCL22, CCL18 e IL-1ra (SOLINAS *et al.*, 2009).

Os TAM são originados a partir de monócitos do sangue e ao alcançarem a massa tumoral, sofrem uma polarização para macrófagos M2 por conta da ausência de sinais como o IFN $\gamma$  ou LPS bacteriano que orientem a polarização para macrófagos M1. Além disso, ocorre também a infiltração de linfócitos Th2, secretores das citocinas IL-4 e IL-13 que contribuem para a polarização M2 (NEVALA *et al.*, 2009; DEEPAK *et al.*, 2007). Essas células produzem VEGF, PDGF e EGF que são fatores de crescimento muito importantes para o processo de angiogênese (LEEK *et al.*, 1996; BINGLE *et al.*, 2006).

Além de influenciarem o processo de angiogênese, os TAM são importantes para os processos de invasão e metástase. Foi demonstrado, em um modelo de melanoma murino, a produção de IL-1 $\beta$  pelos TAMs citocina associada à indução de metástase (GIAVAZZI *et al.*, 1990). Outras evidências mostram que essas células

produzem matriz metalopeptidase-9 (MMP-9) que também é importante para o processo de invasão e metástase (HIRATSUKA *et al.*, 2002).

As células dendríticas (DCs) operam na interface entre os tecidos periféricos e os órgãos linfóides e são importantes na indução de respostas imunes mediadas por células T, atuando como células apresentadoras de antígenos (BANCHEREAU *et al.*, 2000).

Muitos tumores possuem uma expressão aumentada da proteína STAT3 que aumenta a expressão de IL-10 e de TGF $\beta$ , citocinas imunossupressoras. (WANG *et al.*, 2004; KORTYLEWSKI *et al.*, 2005; KORTYLEWSKI *et al.*, 2008).

O microambiente imunossupressor criado pelas células tumorais, muito rico em TGF- $\beta$  gera DCs tolerogênicas. Dessa maneira, essas DCs mielóides possuem um fenótipo imaturo, promovendo a expansão de células T regulatórias nos linfonodos com a progressão do tumor, ou a ativação ineficaz das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras (GHIRINGHELLI *et al.*, 2005).

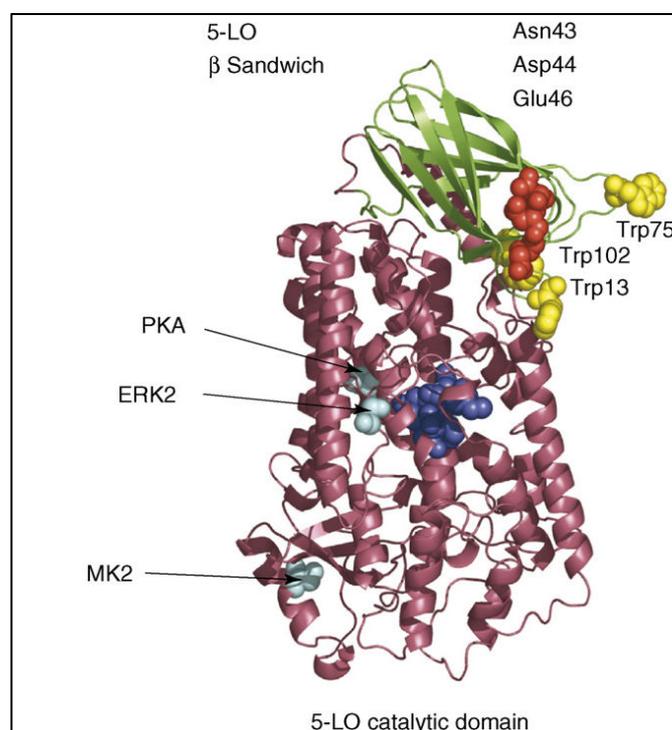
#### **1.4) Enzima 5-lipoxigenase (5-LO)**

A enzima 5-LO é responsável pela conversão, em duas etapas, do ácido araquidônico (AA) da membrana nuclear ou de fagossomos em um epóxido intermediário denominado LTA<sub>4</sub> (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005). A proteína ativadora da enzima 5-LO (FLAP) é ativa na forma de um homodímero, ligada à membrana, e possibilita a transferência do ácido araquidônico para a 5-LO. Trata-se de uma enzima fundamental para que ocorra a conversão do ácido araquidônico pela 5-LO, pois a reação não ocorre em células que não a possuem ou quando a mesma é inibida farmacologicamente (PLANTE *et al.*, 2006).

Após a conversão do AA em LTA<sub>4</sub>, este pode ser convertido em leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), em cisteinil leucotrienos (Cys-LTs) ou em lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>). O LTB<sub>4</sub> é gerado pela enzima LTA<sub>4</sub> hidrolase que converte o LTA<sub>4</sub> em LTB<sub>4</sub>. A LXA<sub>4</sub> é originada a partir da ação da enzima 12-lipoxigenase encontrada em plaquetas (FIERRO *et al.*, 2001). Já os cisteinil leucotrienos são gerados pela conjugação com glutatona reduzida pela enzima LTC<sub>4</sub> sintase que irá gerar o LTC<sub>4</sub>, podendo esse ser convertido em LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>. Existe uma especificidade celular no perfil de leucotrienos gerados, sendo que mastócitos e eosinófilos sintetizam principalmente os Cys-LTs, neutrófilos e células

dendríticas produzem o LTB<sub>4</sub> e os macrófagos sintetizam ambas as classes (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2004).

A 5-LO contém 672 ou 673 aminoácidos cuja estrutura (baseada por analogia com a estrutura da enzima 15-lipoxigenase), possui dois domínios: o catalítico C-terminal (resíduos 121-673), com estrutura em hélice contendo um íon Fe<sup>2+</sup>, e um domínio N-terminal menor, com estrutura em alça (GILLMOR *et al.*, 1997). Os resíduos desse último domínio possuem a capacidade de ligar Ca<sup>2+</sup>, etapa importante para a ativação da 5-LO, como pode ser visto na **figura 4** (HAMMARBERG *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Representação da estrutura da enzima 5-LO com seu respectivo domínio catalítico e as estruturas em cabeça e barril (RADMARK *et al.*, 2007).

Dentre as células que expressam a 5-LO, podemos destacar os granulócitos, monócitos/macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células de Langerhans. Também é importante ressaltar que a expressão dessa enzima é muito mais pronunciada em células mielóides diferenciadas do que em células indiferenciadas (STEINHILBER, 1999). Assim, diferentes indutores como o dimetilsulfóxido (DMSO), ácido retinóico, 1 $\alpha$ ,25-diiodorxivitamina D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] e TGF- $\beta$  vêm sendo utilizados, levando a um aumento na expressão de RNAm e na síntese proteica da 5-LO. (HARLE *et al.*, 1999).

Em seu estado de repouso, a 5-LO pode estar localizada tanto no citosol (em neutrófilos, eosinófilos e macrófagos peritoniais) ou em um compartimento solúvel do núcleo associado à cromatina (em macrófagos alveolares e células de Langerhans) (WERZ, 2002). Sequências de importação nuclear (NIS), que são ricas em aminoácidos básicos, estão presentes tanto no domínio N-terminal e próximas ao C-terminal da 5-LO. A elicitação de células em repouso por glicogênio ou citocinas causa a importação nuclear da 5-LO que, na maioria dos tipos celulares, confere um aumento na capacidade de síntese de LTs. A exceção são os eosinófilos, onde a localização nuclear da 5-LO suprime a sua atividade (LUO *et al.*, 2004a; BROCK, 2005).

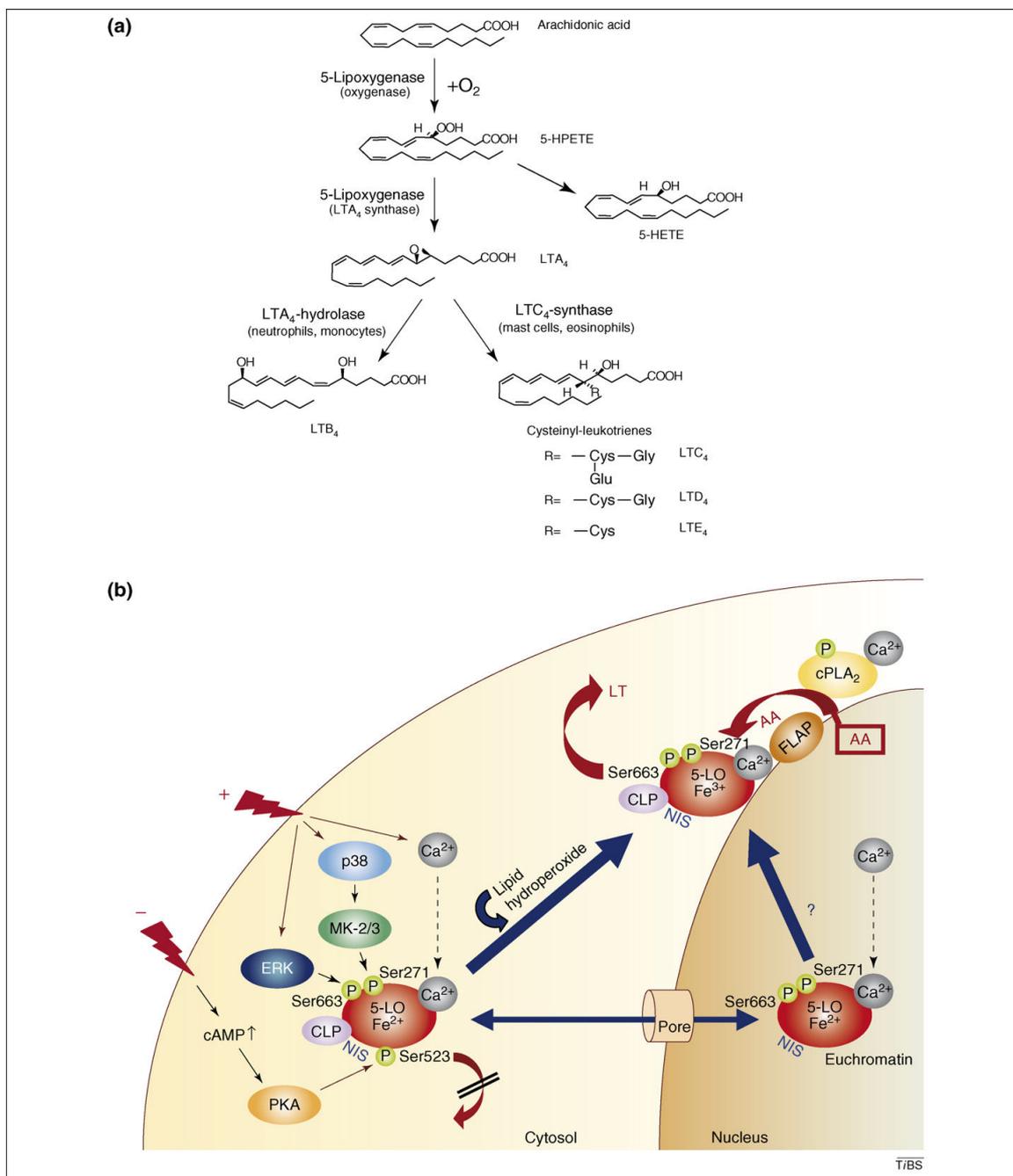
A enzima 5-LO também pode ser encontrada no interior de estruturas denominadas corpúsculos lipídicos, que são organelas lipídicas encontradas em grandes quantidades em leucócitos (em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e células endoteliais. A gênese dessas organelas ocorre durante infecções, neoplasias e outras condições inflamatórias, como por exemplo a arteriosclerose. Esses corpúsculos lipídicos são delimitados por uma monocamada de fosfolípidios, sendo a parte interna dessas estruturas ricas em lipídios neutros (BOZZA *et al.*, 2009).

A atividade da 5-LO é extremamente controlada. A quantidade de AA disponível como substrato (ZARINI *et al.*, 2006) e a sua acessibilidade para a 5-LO são determinantes para a biossíntese de LTs (LUO *et al.*, 2004a). Dessa forma, alguns estímulos capazes de ativar a formação de LTs como o fator ativador de plaquetas (PAF), zimosan opsonizado, C5a, IL-8 e ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  causam tanto a ativação da 5-LO quanto da fosfolipase  $A_2$  citosólica (cPLA<sub>2</sub>) (WERZ, 2002).

Quando ocorre a estimulação celular a 5-LO e a fosfolipase  $A_2$  citosólica (cPLA<sub>2</sub>) migram de um compartimento solúvel para a membrana nuclear, onde cPLA<sub>2</sub> libera o AA a partir da membrana fosfolipídica. A enzima 5-LO pode ser fosforilada, pois a mesma possui aminoácidos passíveis de fosforilação por proteínas quinases como a p38, ERK1/2, CaMKII e PKA (Luo *et al.*, 2004b). As condições que induzem a ativação de MAPKAPK-2/3 e das ERKS (como estresse celular) induzem a translocação nuclear da 5-LO e aumento na formação de seus produtos, sendo que este processo pode ser inibido por inibidores de quinases (RADMARK *et al.*, 2007).

Como a catálise pela 5-LO requer a oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  o equilíbrio redox é muito importante para a sua atividade. Assim, condições que promovam peroxidação lipídica, como por exemplo, a formação de espécies reativas de oxigênio, adição de peróxidos, inibição da enzima antioxidante GPx, redução de glutathiona,

umentam a síntese de produtos da 5-LO (WERZ *et al.*, 2001; WERZ *et al.*, 2002) A **figura 5** evidencia todas as etapas reguladoras mostradas até aqui.



**Figura 4.** a) Representação da via da 5-LO com seus respectivos produtos. b) Representação da enzima 5 lipoxigenase evidenciando todas as moléculas que a regulam (RADMARK *et al.*, 2007) (-) estímulo negativo (+) estímulo positivo. Ser 663, Ser 271 e Ser 523 – resíduos fosforilados pelas proteínas quinases.

## 1.5) Leucotrienos e Imunidade Inata

Os LTs são responsáveis por estimular o crescimento de células hematopoiéticas pluripotentes CD34<sup>+</sup> na medula óssea e a posterior migração das mesmas na corrente sanguínea. Além desses efeitos, os LTs também aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio (aumentando assim a adesão leucocitária à microvasculatura) e promovendo motilidade celular, levando à transmigração para os tecidos (PETERS-GOLDEN E HENDERSON 2007).

Além dessas ações dos LTs acima citadas, a sua síntese é aumentada durante infecções bacterianas (HOPKINS *et al.*, 1989), fúngicas (WOLF *et al.*, 1992), virais (VOLOVITZ *et al.*, 1988) e por protozoários (LOCKSLEY *et al.*, 1985). Isso se deve ao fato dos leucócitos interagirem com os microorganismos através de receptores localizados na superfície celular, que podem ser tanto através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) quanto por moléculas opsonizantes (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005).

As moléculas opsonizantes mais estudadas são a IgG e proteínas do sistema complemento. A interação entre microorganismos opsonizados com IgG e o receptor Fc $\gamma$  de fagócitos desencadeia a liberação de AA e a síntese de LTs (MANCUSO *et al.*, 1998), fato que não é surpreendente uma vez que a ligação ao receptor Fc $\gamma$  aumenta os níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular (GREENBERG E GRINSTEIN 2002). Entretanto, a fagocitose de partículas opsonizadas com os peptídios de complemento C3b e C3bi através dos receptores de complemento (CR)1, CR3 e CR4 não promovem a liberação de AA ou a biossíntese de LTs (FERNANDEZ *et al.*, 2003).

Dentre as funções efetoras dos LTs na imunidade inata podemos destacar: a indução de acúmulo leucocitário, fagocitose, atividade antimicrobiana e geração de mediadores inflamatórios.

Os LTs induzem o recrutamento de leucócitos, estimulando a quimiotaxia de uma gama variada de células, como por exemplo, neutrófilos, células T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> (pelo LTB<sub>4</sub>) para locais inflamatórios (TAGER *et al.*, 2003) assim como também de linfócitos T gammadelta (COSTA *et al.*, 2009) e de células dendríticas (DC) para locais de estimulação antigênica (PARAMESWARAN *et al.*, 2004) e linfonodos (pelos cysLTs) (ROBBIANI *et al.*, 2000). Juntamente com a habilidade em recrutar leucócitos,

os LTs aumentam a sobrevivência dos mesmos inibindo a apoptose (HEBERT *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2000).

Os LTs induzem o aumento da fagocitose, amplificando o sinal gerado a partir das opsoninas ou dos receptores associados a patógenos (MANCUSO *et al.*, 2001).

A atividade anti-microbiana é aumentada, pois ocorre a liberação de enzimas lisossomais (SERHAN *et al.*, 1982) e de  $\alpha$ -defensinas (em neutrófilos humanos) estimuladas pelo LTB<sub>4</sub> (FLAMAND *et al.*, 2004). O complexo enzimático NADPH oxidase responsável por gerar espécies reativas de oxigênio pode ser ativado tanto pelo LTB<sub>4</sub> (DEWALD E BAGGIOLINI, 1985) quanto pelos CysLTs em neutrófilos humanos e em macrófagos alveolares (LARFARS *et al.*, 1999).

Além de possuírem efeitos diretos nos leucócitos, os LTs promovem respostas imunes inatas estimulando a produção de outros mediadores inflamatórios, como por exemplo as citocinas e quimiocinas, que ativam o recrutamento de leucócitos e mecanismos anti-microbianos. A fim de exemplificar tal fenômeno, podemos citar que o LTB<sub>4</sub> induz a produção de TNF- $\alpha$  (GOLDMAN *et al.*, 1993) e MCP-1 em monócitos (HUANG *et al.*, 2004) e de IL-8 em neutrófilos (KUHNS *et al.*, 2001). E os CysLTs induzem em mastócitos a produção de IL-5, TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  (MELLOR *et al.*, 2002).

## 1.6) Mediadores Lipídicos e Câncer

O estudo sobre o envolvimento de mediadores lipídicos no processo tumoral não é recente, e vem sendo focado, principalmente, na produção e função da prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>.

A PGE<sub>2</sub> é responsável por regular diversos processos fisiológicos, como inflamação, agregação plaquetária, dor, liberação de neurotransmissores, função renal e modulação do sistema imune. A produção de PGE<sub>2</sub> depende da ação da enzima ciclooxigenase, que converte o AA da membrana celular em PGH<sub>2</sub>. A PGH<sub>2</sub> recém formada pode ser convertida em PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> por enzimas sintases terminais (HARRIS *et al.*, 2002).

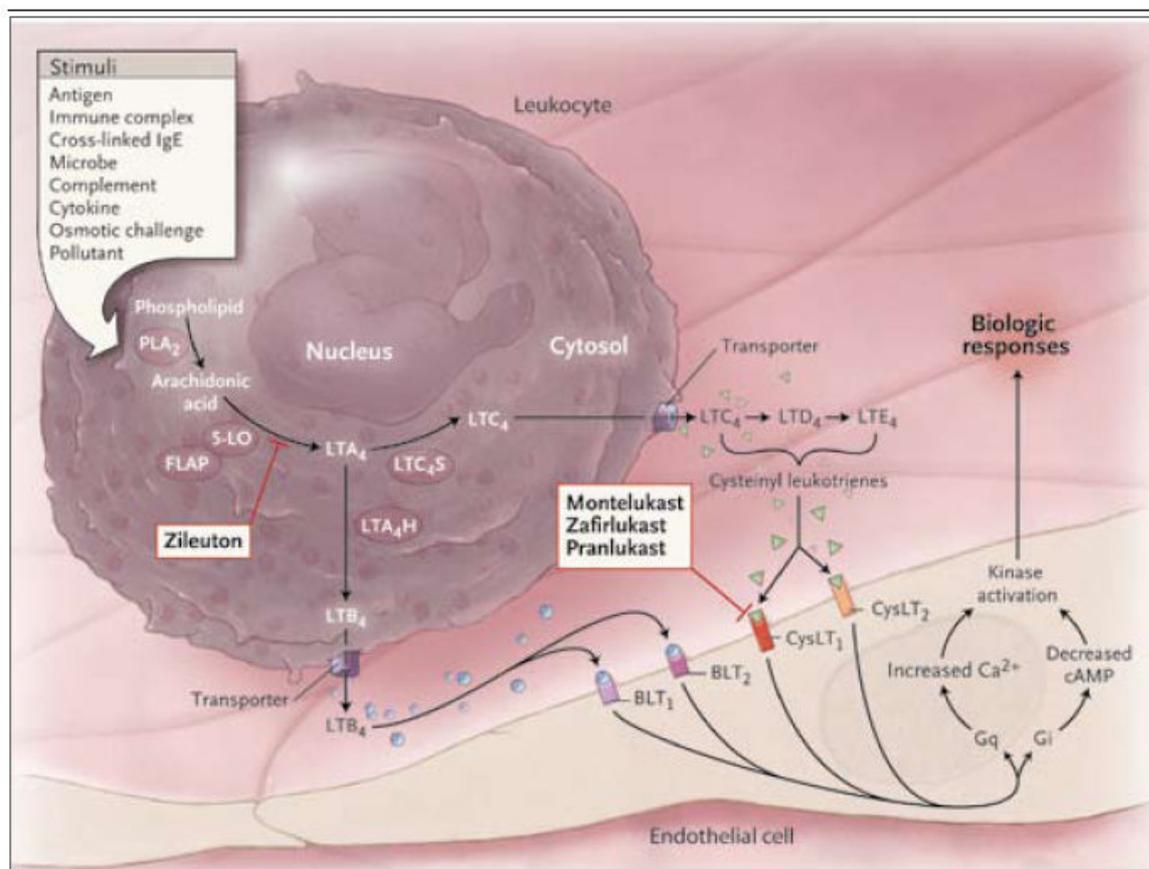
A participação da PGE<sub>2</sub> no processo tumoral ocorre, principalmente, na promoção do seu desenvolvimento, pois a produção da mesma se dá em maiores quantidades em tecidos tumorais do que em tecidos normais (CHULADA *et al.*, 2000). A PGE<sub>2</sub> exerce efeitos antiapoptóticos pelo aumento da expressão da proteína Bcl-2,

promove angiogênese aumentando a produção de fatores de crescimento como o VEGF, além de estimular diretamente o crescimento do tumor (TSUJII *et al.*, 1995; Pai *et al.*, 2001; SHENG *et al.*, 1998).

Foi reportado também que a PGE<sub>2</sub> é responsável por mudar o perfil de resposta imunológica no microambiente tumoral de Th1 (anti-tumoral) para Th2 (imunossupressora) através da inibição de citocinas de padrão Th1 como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e aumento da produção de citocinas de padrão Th2 como IL-4 e IL-10 (HUANG *et al.*, 1998; STOLINA *et al.*, 2000).

Além disso, nos últimos anos estudos demonstraram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de inibir a proliferação e atividade de células T CD8<sup>+</sup>, a atividade anti-tumoral de células NK e estimular a expansão de células T reguladoras e de células mielóides supressoras (WANG E DUBOIS, 2010)

As ações dos LTs ocorrem através da ligação dos mesmos a receptores específicos localizados na face externa da membrana plasmática de células estruturais e inflamatórias (TAGER E LUSTER 2003; KANAOKA E BOYCE, 2004). O LTB<sub>4</sub> liga-se aos receptores BLT<sub>1</sub> (de alta afinidade) e BLT<sub>2</sub> (de baixa afinidade). O receptor BLT<sub>1</sub> interage com uma proteína Gq, resultando ao final do processo em um aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular. O receptor BLT<sub>1</sub> é responsável por mediar às ações próinflamatórias e quimioatraentes do LTB<sub>4</sub> (TAGER E LUSTER 2003). Os Cys-LTs se ligam aos receptores cysLT<sub>1</sub> (de alta afinidade) e ao cysLT<sub>2</sub> (de baixa afinidade). O receptor cysLT<sub>1</sub> interage com uma proteína Gi, resultando em diminuição dos níveis de AMPc intracelulares (KANAOKA E BOYCE 2004). O receptor cysLT<sub>1</sub> induz broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e edema nas vias aéreas, tanto que antagonistas deste receptor são utilizados amplamente no tratamento da asma. O receptor cysLT<sub>2</sub> não é responsável pela broncoconstrição, mas contribui com a permeabilidade vascular e fibrose tecidual (LYNCH *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Representação da produção de leucotrienos com a respectiva ligação dos mesmos aos seus receptores (PETERS-GOLDEN AND HENDERSON 2007).

O estudo da participação da enzima 5-LO e dos LTs em tumores se intensificou nos últimos anos, embora seja ainda muito menos significativo do que os estudos envolvendo a  $PGE_2$ . Assim, pode-se citar um trabalho em que pacientes com câncer de esôfago apresentaram alta expressão da enzima 5-LO em comparação com os indivíduos saudáveis. A inibição farmacológica da enzima reduziu a viabilidade de linhagens de células tumorais de esôfago através da indução de apoptose. Além disso, os efeitos desse inibidor eram revertidos quando  $LTB_4$  exógeno era administrado, indicando que a diminuição na sobrevivência celular devia-se à interrupção na biossíntese de  $LTB_4$  (HOQUE *et al.*, 2005).

Outros estudos também demonstraram que as enzimas 5-LO e a FLAP encontram-se aumentadas em casos de câncer colo retal, pancreático, adenocarcinoma, linfomas e leucemias (AVIS *et al.*, 1996; ROMANO *et al.*, 2001).

Células de leucemias linfóides crônicas expressam grandes quantidades de 5-LO e de  $BLT_1$ , e o tratamento destas células com inibidores da 5-LO e da FLAP

bloqueia a ativação das mesmas. Contudo, esse efeito foi revertido quando se adicionou LTB<sub>4</sub> à cultura (RUNARSSON *et al.*, 2005).

Em modelo murino de câncer de pulmão induzido por um carcinógeno específico de tabaco, o tratamento com um inibidor da FLAP reduziu a biossíntese de LTs e o volume dos tumores (RIOUX E CASTONGUAY 1998).

Outro estudo demonstrou que pacientes com câncer de próstata possuem níveis de LTB<sub>4</sub>, significativamente, maiores que os de pessoas saudáveis, mas o mecanismo ainda precisa ser elucidado (LARRÉ *et al.*, 2008).

Recentemente, foi demonstrado também que a inibição da via da 5-LO com ácido caféico e MK886 reduz o volume de crescimento tumoral subcutâneo em camundongos inoculados com as células Tm1 de melanoma murino. Esse mesmo estudo mostra que o LTB<sub>4</sub> é responsável por um crescimento tumoral exacerbado mesmo quando se inocula quantidades subtumorigênicas de células Tm1 (BACHI *et al.*, 2009).

Zhang e colaboradores demonstraram uma baixa ou ausente expressão por imunohistoquímica, do receptor CysLT<sub>1</sub> em células endoteliais microvasculares do cérebro humano de regiões normais da massa cinzenta ou branca. Contudo, em casos de injúria traumática, sua expressão é aumentada em neurônios e células da glia das massas branca e cinzenta. O receptor CysLT<sub>1</sub> também foi detectado em células de astrocitoma, glioma e adenocarcinoma metastático (ZHANG *et al.*, 2004).

O grupo de Sjolander demonstrou que o LTD<sub>4</sub> está envolvido com a sobrevivência e disseminação de células de câncer de cólon e que o receptor CysLT<sub>1</sub> é altamente expresso em adenocarcinoma col retal (OHD *et al.*, 2003). Em células humanas epiteliais intestinais normais a estimulação do receptor CysLT<sub>1</sub> pelo LTD<sub>4</sub> reduz a apoptose (WIKSTROM *et al.*, 2003) e causa regulação positiva de  $\beta$ -catenina, que ao se translocar para o núcleo dispara a ativação de protooncogenes (MEZHYBOVSKA *et al.*, 2005). Essas observações reforçam o conceito de que o LTD<sub>4</sub> e o CysLT<sub>1</sub> facilitam a sobrevivência e proliferação de células de câncer de cólon.

### **1.7) Linhagem celular B16F10**

Em 1973, Fidler utilizando a linhagem de células de melanoma B16 com baixo potencial metastático *in vivo* obteve uma linhagem celular de melanoma com potencial

de metástase mais elevado. Posteriormente, foram selecionadas as variantes que tinham a habilidade de se implantarem, invadir, sobreviver e crescer, formando colônias tumorais no pulmão, após a injeção intravenosa (i.v.) em camundongos C57BL/6 isogênicos. Quando os nódulos tumorais no pulmão se formaram, os mesmos eram identificados pela pigmentação da melanina e removidos para posterior crescimento em cultura. Essas células que cresceram em cultura depois da primeira seleção *in vivo* eram denominadas B16F1 e foram novamente injetadas i.v. para obter a linhagem duas vezes selecionada B16F2. Após 10 seleções a linhagem B16F10 foi obtida possuindo capacidade metastática muito maior do que a linhagem B16F1 (FIDLER, 1973).

A especificidade metastática das células B16F10 para o pulmão foi avaliada seguindo a distribuição de células de melanoma marcadas com [<sup>125</sup>I]-5-iodo-2'deoxiuridina após injeção i.v. (veia caudal) ou intracardíaca (i.c.) no ventrículo esquerdo. Pela via i.c. ocorre sequestro extra-pulmonar, e posterior recirculação antes que as células atinjam a microcirculação pulmonar. Um dia após a injeção das células tumorais, os órgãos e o sangue foram analisados quanto a quantidade de células tumorais marcadas e, o mesmo número de células viáveis foram encontradas no pulmão, independente da via de administração. Quando os animais foram sacrificados, 2 semanas após a injeção das células B16F10, o mesmo número de nódulos tumorais foram encontrados, independentemente da via de administração. Além dessa especificidade para o pulmão, não foram encontradas metástases extra-pulmonares (FIDLER E NICOLSON, 1976)

O uso dessa linhagem como modelo de metástase de melanoma murino é amplamente difundido desde a sua criação, sendo fácil quantificar o crescimento tumoral, uma vez que o mesmo possui coloração negra devido à presença de melanina, somando-se ao fato de representar um meio de estudar o melanoma *in vivo* que não demande grandes gastos de recursos financeiros.

## **1.8) Terapêutica**

A intervenção terapêutica mais eficiente utilizada para o melanoma maligno é a excisão cirúrgica. Em pacientes com tumores primários com menos de 1 mm de espessura, o risco do tumor originar metástases locais ou distantes é mínimo, sendo dispensável a busca por metástases viscerais no pré-operatório. Já nos casos em que o

melanoma são mais espessos do que 1 mm, devem ser realizados o raio X do tórax e testes para avaliar a função hepática. Para pacientes que estejam no estágio III da doença, deve-se realizar também uma tomografia computadorizada. Quando se depara com um paciente no estágio IV, o mesmo procedimento para o estágio III é empregado, sendo que a detecção do local de metástase é fundamental para determinar uma melhor ou pior sobrevida para o paciente (MARKOVIC *et al.*, 2007).

A remoção cirúrgica é acompanhada também pela remoção das margens da lesão, sendo que a extensão da excisão varia de acordo com a espessura do tumor. Para tumores menores que 1 mm remove-se uma margem de 1 cm, de 1,1 a 2 mm remove-se de 1 a 2 cm e de 2,1 mm ou mais remove-se 2 cm (MARKOVIC *et al.*, 2007).

Embora a excisão da lesão maligna seja o principal tratamento utilizado existem terapias adjuvantes a fim de erradicar micro-metástases indetectáveis, como por exemplo, a imunoterapia, que consiste em melhorar o *status* imunológico do paciente. Entre os principais agentes utilizados destacamos o interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucina-2 (IL-2). O IFN- $\alpha$  é utilizado em altas doses (20 milhões U/m<sup>2</sup>) durante 5 dias por mês, diminuindo-se a dose nos meses posteriores (10 milhões U/m<sup>2</sup>) 3 vezes por semana durante os 11 meses seguintes. O IFN- $\alpha$  intensifica a atividade citotóxica de células natural killer (NK) e aumentam a expressão de MHC classe I (MARKOVIC *et al.*, 2007). O GM-CSF, atua ativando macrófagos citotóxicos promovendo a lise de células tumorais, sendo utilizado subcutaneamente na dose de 125mg/m<sup>2</sup> por pelo menos 1 ano, intercalando o uso de 2 em 2 semanas. Essas abordagens imunoterapêuticas possuem um elevado custo, e, somente o tratamento com IL-2 é aprovado pelo FDA (MARKOVIC *et al.*, 2007).

A IL-2 é uma citocina que tem a habilidade de ativar células T CD8<sup>+</sup> e células NK, resultando, inicialmente na regressão do melanoma murino B16. A partir dessa observação a IL-2 passou a ser utilizada em estudos clínicos, gerando resultados consistentes, mas pouco expressivos, com uma resposta total de cerca de 13-17%. (FANG *et al.*, 2008).

Como se pode observar, embora seja uma doença de fácil diagnóstico e com um simples tratamento (remoção cirúrgica), o melanoma em seus estágios mais avançados apresenta um prognóstico muito ruim, com poucas chances de cura. Como a relação entre inflamação e câncer vem sendo estudada nos últimos tempos, decidimos investigar a participação de mediadores lipídicos inflamatórios no desenvolvimento desta doença.

## 2) Hipótese

Os LTs modulam o desenvolvimento do melanoma murino.

## 3) Objetivos

Caracterizar a participação dos LTs na evolução do melanoma murino, em animais selvagens (WT) e deficientes na expressão da enzima 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>).

Os objetivos específicos são:

- A) Verificar o crescimento tumoral através da quantificação de número de nódulos em animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>;
- B) Analisar a sobrevivência dos camundongos de ambos os grupos;
- C) Analisar o crescimento tumoral no tecido extra-vascular dos camundongos;
- D) Analisar histologicamente e morfometricamente o tecido pulmonar dos camundongos de ambos os grupos;
- E) Verificar qual classe de LTs é responsável pela proteção frente ao melanoma murino, através do uso de antagonistas específicos.

## 4) Metodologia

### 4.1) Animais

Camundongos SV 129 e 129-Alox5<sup>tm1Fun</sup> (CHEN *et al.*, 1994), que possuem o mesmo *background* genético dos animais S.V.129, pesando de 20 à 24g de ambos os sexos foram mantidos no laboratório de animais transgênicos (LAT) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ) e na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Posteriormente, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da UFRJ por no mínimo 1 semana antes da utilização, sob condições de ciclo claro/escuro de 12 por 12 h, temperatura ambiente de 23°C e com livre acesso a ração e água. Os protocolos envolvendo procedimentos com os animais de experimentação foram realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFRJ, protocolo número DFBCICB 028. Os grupos experimentais utilizados foram sempre de animais do mesmo sexo equiparados pelo peso/idade.

### 4.2) Cultura de células

Células B16F10 provenientes do INCA e livres de contaminação por micoplasma foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), penicilina G sódica (100 U/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), hepes (3 mg/mL), bicarbonato (2,2 mg/mL) e L-glutamina (0,3 mg/mL). As células foram repicadas 2 vezes por semana, até atingirem confluência, sendo diluídas 10 vezes em cada passagem.

### 4.3) Modelo de metástase *in vivo*

Células B16F10 foram administradas i.v. nas concentrações de 1, 2 ou 3 x 10<sup>5</sup>/400 µL em tampão salina fosfato (PBS). Duas semanas após o inóculo, os animais foram eutanaziados com dose letal de hidrato de cloral (800 mg/kg). Em seguida, a traquéia foi canulada e o pulmão inflado com solução de PBS para que a contagem dos

nódulos tumorais fosse realizada. A contagem dos nódulos foi realizada com o auxílio de uma lupa, os mesmos foram quantificados um por um independente do tamanho e utilizando somente a superfície do pulmão voltada para cima.

#### **4.4) Modelo de crescimento local *in vivo***

Células B16F10 foram injetadas subcutaneamente (s.c.) no dorso dos animais na concentração de  $5 \times 10^5 / 400 \mu\text{L}$  em PBS . Trinta dias após, os animais foram eutanaziados. Após a confirmação da morte dos animais, os tumores foram removidos cirurgicamente e pesados em balança analítica.

#### **4.5) Análise histológica**

Duas semanas após a injeção de células B16F10, a cavidade torácica dos animais foi aberta e o pulmão dos animais foi perfundido pelo ventrículo esquerdo com 1 mL de PBS e, em seguida, com 1 mL de formol em 10% de PBS. Posteriormente, o pulmão foi inflado via traquéia com 1 mL de formol em 10% de PBS. Foram feitos blocos de parafina e cortes de  $5 \mu\text{m}$  para a montagem das lâminas. As lâminas foram coradas por H&E, para que, em seguida, fosse realizada a análise histológica e morfométrica.

#### **4.6) Morfometria**

O número total de metástases, macrófagos e neutrófilos alveolares foi estimado, contando-se dez campos aleatórios em lâminas não identificadas. Os campos foram observados com a objetiva de 40x através de um monitor (Philips mod. PV461/781, Manaus, Brasil) ligado a um sistema de vídeo-microscopia (câmera de vídeo colorida JVC mod. TK-C380, Osaka, Japão e microscópio Carl Zeiss mod. Axiolab, Oberkochen, Alemanha) em 30 campos de  $26000 \mu\text{m}^2$  (10 campos aleatórios de três diferentes seções). A morfometria foi realizada em lâminas não identificadas por dois investigadores em tempos distintos.

#### **4.7) Sobrevida**

Para avaliar a sobrevivência dos animais de ambos os grupos experimentais,  $10^5$  células B16F10 foram injetadas i.v. e a mortalidade foi acompanhada durante 60 dias. Os resultados são expressos como porcentagem de sobreviventes. Parâmetros como piloereção, letargia e insuficiência respiratória eram observados como fatores de impossibilidade de melhora e assim, os animais eram eutanaziados.

#### **4.8) Inibição farmacológica**

No experimento de inibição farmacológica, utilizamos o montelukast (Merck) como antagonista do receptor  $CysLT_1$ , na dose de 1 mg/kg injetado intraperitonealmente (i.p.) e o composto Ly 292476 (Eli Lilly, Indianápolis, IN) como antagonista do receptor  $BLT_1$ , na dose de 1,5 mg/kg injetado subcutaneamente (s.c.). Após esse tratamento, os pulmões foram analisados histologicamente e morfometricamente. Os inibidores foram injetados 30 minutos antes de se injetar as células e depois diariamente por 14 dias.

#### **4.9) Quantificação de IL-4 por ELISA**

O lóbulo esquerdo do pulmão dos animais foi retirado 2 semanas após o inóculo com  $2 \times 10^5$  células B16F10, homogeneizado em 1 mL de tampão de lise (50 mM de Tris e 100 mM de NaCl pH-8), contendo inibidor de proteases (Sigma), centrifugado a 1500 rpm e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o dia da dosagem. Placas de 96 poços foram cobertas com anticorpo específico anti-IL-4 (PeproTech). Este anticorpo foi diluído em solução de ligação (0.05 % Tween 20 - Sigma, 0.1 % BSA - Sigma em PBS) e incubado por 18 h a  $4^\circ\text{C}$ . As placas então foram lavadas quatro vezes com PBS + 0,05 % Tween 20. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS + 1 % BSA por 2 h à temperatura ambiente. Amostras e o padrão de IL-4 recombinante (PeproTech) foram adicionados nas placas e incubados por 24 h a  $4^\circ\text{C}$ . As placas foram lavadas com PBS-Tween-20 e incubadas com anticorpo anti-IL-4 biotilado (PeproTech). Após 1 h, as placas foram lavadas mais 4 vezes com PBS-Tween 20, e o conjugado avidina-peroxidase adicionado segundo as especificações do

fabricante (PeproTech) e as placas foram incubadas por mais 30 min. As placas foram lavadas com PBS-Tween 20 mais 4 vezes e incubadas com 0,2 mg/ ml do substrato TMB (terametilbenzidina, Sigma) em tampão citrato pH 5,0. Após 20 min, a reação foi interrompida com HCl 1 N e a densidade ótica (D.O.) quantificada à 450 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices).

#### **4.10) Análise estatística**

A curva de sobrevivência foi expressa como porcentagem de sobreviventes durante 60 dias. Para a análise estatística da curva de sobrevivência foi utilizado o teste Mantel-Cox Logrank ( $X^2$  *chi squared*), sendo que a diferença foi considerada estatisticamente significativa para  $P < 0,05$ .

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o teste Mann Whitney, sendo que os valores obtidos foram representados pela média e pelo erro padrão da média, e, somente valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5) Resultados

### 5.1) Crescimento tumoral metastático nos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>.

O modelo de metástase de melanoma murino já é bem estabelecido, desde 1973, quando Fidler obteve a linhagem B16F10 com especificidade para produzir nódulos metastáticos nos pulmões dos camundongos C57Bl6.

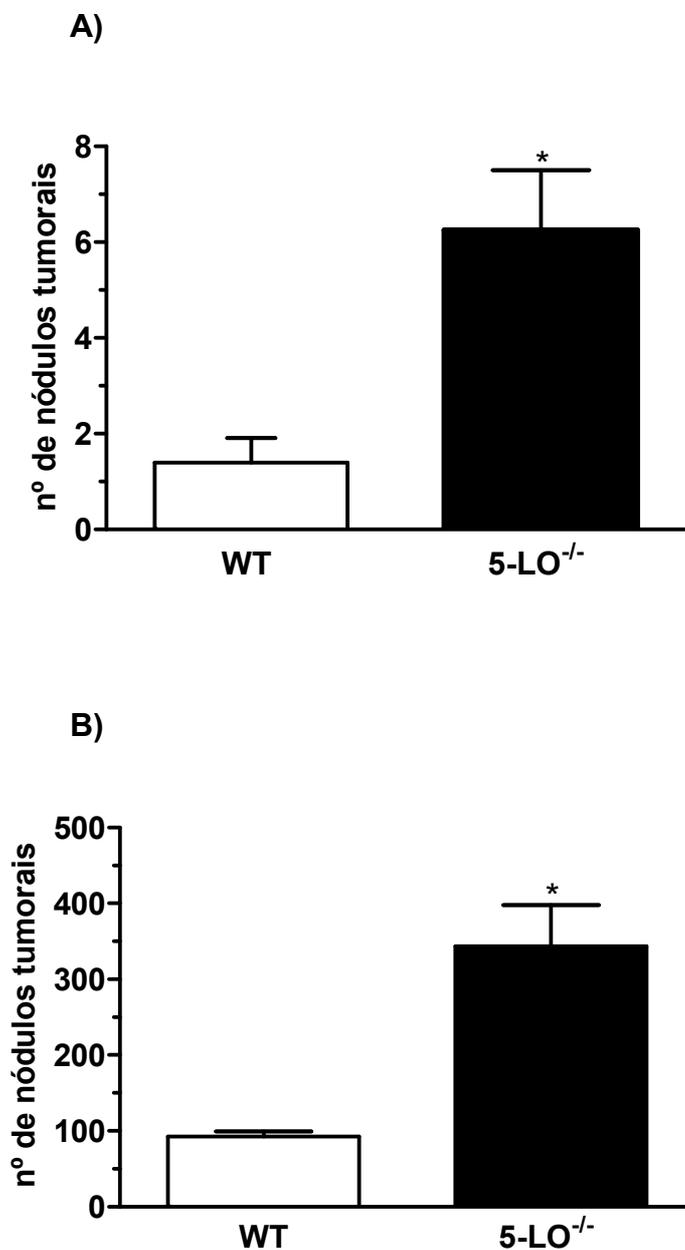
Com o objetivo de refletir sobre o quadro de metástase (com pior prognóstico) e avaliar a influência dos LTs nesse processo, injetamos i.v.  $3 \times 10^5$  células B16F10, e 2 semanas após deste inóculo os animais foram sacrificados para então avaliarmos o crescimento do melanoma nos pulmões dos animais.

A **figura 6** mostra que os animais WT possuem um número muito menor de nódulos tumorais do que os animais 5-LO<sup>-/-</sup>. Contudo, essa diferença não pôde ser quantificada, devido ao grande número de nódulos no pulmão do grupo 5-LO<sup>-/-</sup>.



**Figura 6. Foto representativa do crescimento tumoral nos animais.** Os animais de ambos os grupos receberam  $3 \times 10^5$  células B16F10 e 2 semanas depois seus pulmões foram coletados e fotografados.  $n=6$  animais por grupo.

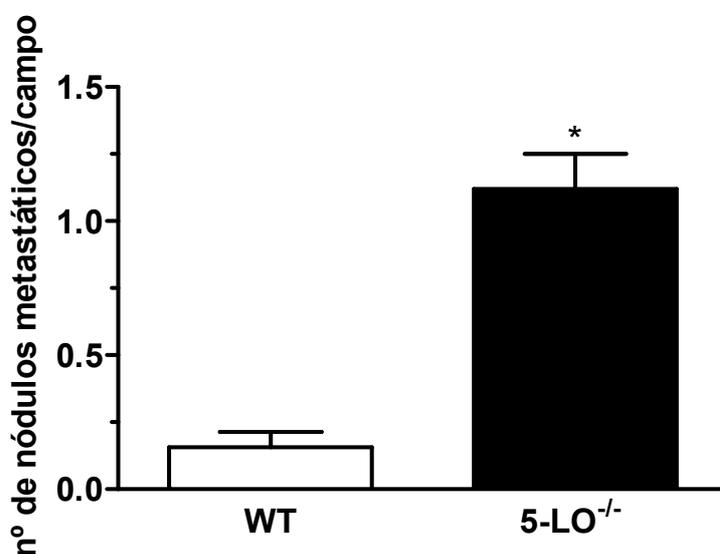
A fim de quantificar o número de nódulos tumorais no pulmão, reduzimos o número de células tumorais injetadas para  $1 \times 10^5$ , (**figura 7A**) e verificamos que o mesmo padrão de crescimento foi observado, sendo possível quantificar o número de nódulos. Com  $2 \times 10^5$  células, foi observado um crescimento mais pronunciado e confiável para contagem (**figura 7B**). Novamente os animais deficientes para a  $5\text{-LO}^{-/-}$  mostraram um crescimento tumoral maior, evidenciando que os LTs teriam um papel protetor contra o melanoma murino.



**Figura 7. Número de nódulos tumorais de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> desafiados com células B16F10.** Os animais foram inoculados com  $10^5$  (A) e  $2 \times 10^5$  (B) células B16F10 i.v. Duas semanas depois os animais foram sacrificados, os seus pulmões foram coletados e o número de nódulos quantificados. \* $P < 0,05$  em relação ao WT. (A) WT n=5, 5-LO<sup>-/-</sup> n=4 (B) WT n=5, 5-LO<sup>-/-</sup> n=5

## 5.2) Quantificação do número de nódulos metastáticos por análise histológica em animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> desafiados com B16F10.

Visto que diferenças significativas foram observadas quanto ao crescimento tumoral entre os dois grupos, resolvemos quantificar essa diferença através da contagem do número de nódulos metastáticos por campo histológico, verificamos que os animais 5-LO<sup>-/-</sup> possuíam uma quantidade de nódulos tumorais muito superior em comparação aos animais WT (**figura 8**).

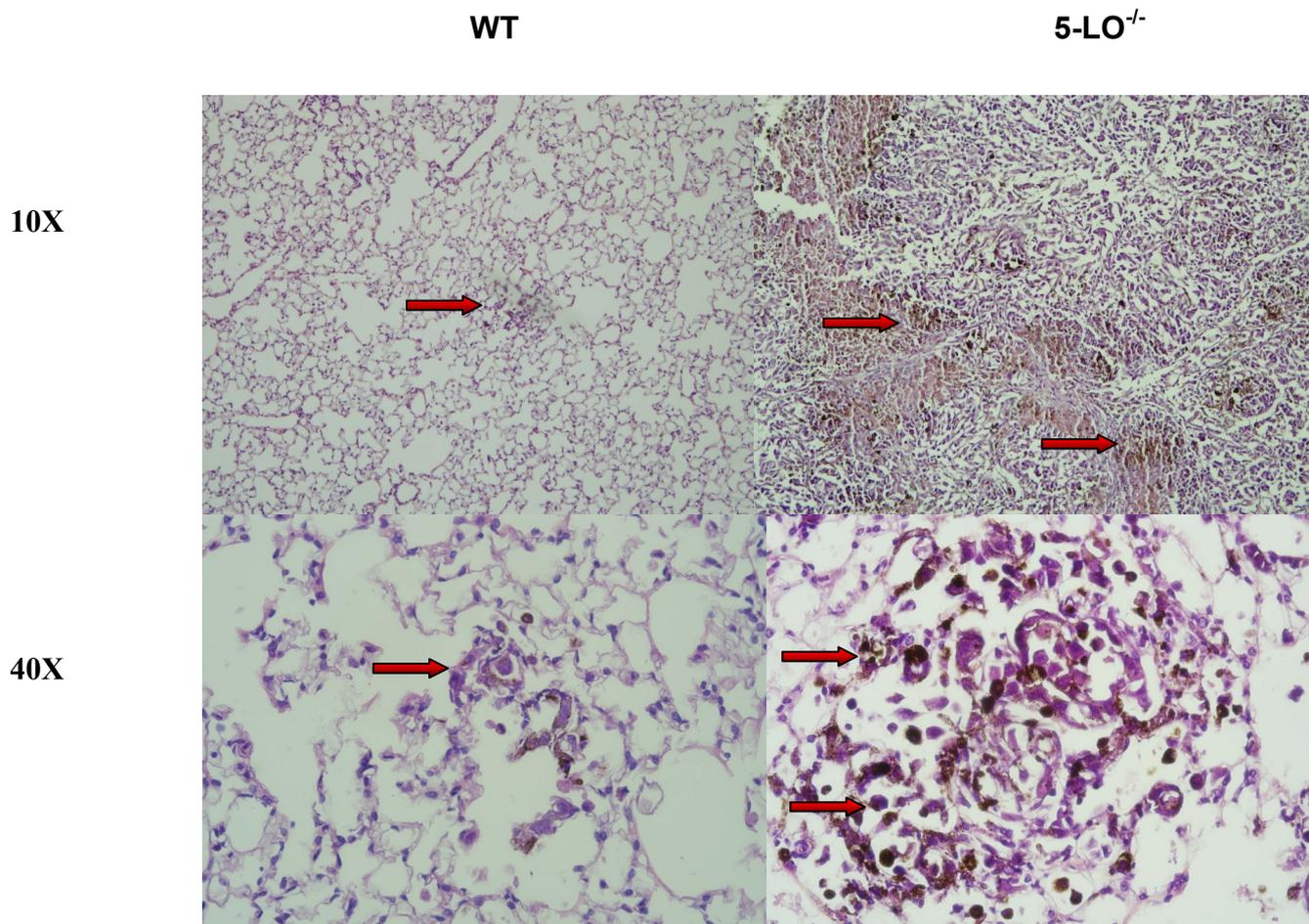


**Figura 8.** Número de nódulos metastáticos por campo em animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> injetados com  $2 \times 10^5$  células B16F10. Animais foram sacrificados duas semanas depois e, os pulmões foram coletados, analisados histologicamente, e as lâminas obtidas coradas com H&E. A quantificação de metástases por campo foi realizada.  $P < 0,05$  em relação ao WT.  $n = 3$  animais por grupo.

### **5.3) Análise histológica dos pulmões dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> desafiados com 2 x 10<sup>5</sup> células B16F10.**

Após verificarmos o crescimento tumoral, resolvemos avaliar o efeito deste crescimento tumoral na arquitetura pulmonar. A análise foi feita 2 semanas após a injeção das células. As diferenças nas lâminas são muito visíveis, evidenciando-se muito mais metástases tumorais nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> em comparação com os animais WT. Além disso, o tamanho dessas metástases é maior nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> em comparação com os animais WT (**figura 9**). A pleura dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> encontrava-se muito mais afetada por metástases tumorais do que a dos animais WT (dado não mostrado).

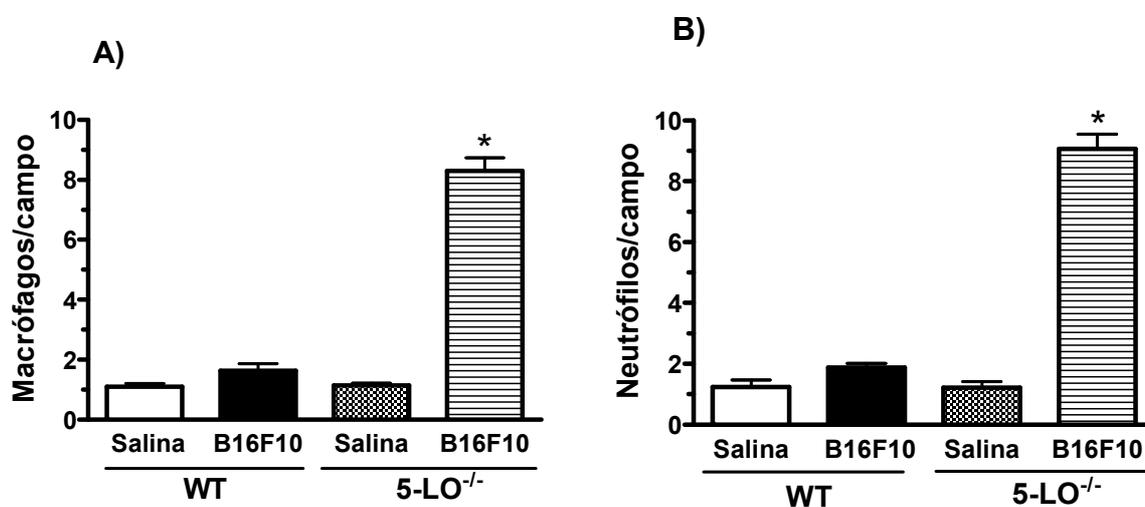
Também, percebemos a presença de um infiltrado leucocitário muito maior na região peribronquiolar e, o extremo comprometimento da estrutura alveolar nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> (**figura 9**).



**Figura 9. Análise histológica do pulmão dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>.** Os animais foram injetados i.v com  $2 \times 10^5$  células B16F10 e 2 semanas depois os animais foram sacrificados. Os pulmões foram coletados e analisados histologicamente e corados com H&E. Fotomicrografia representativa de um entre três animais no grupo. As setas indicam regiões de crescimento tumoral. Os campos possuíam  $26000 \mu\text{m}^2$ .

#### 5.4) Análise morfométrica dos pulmões dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>

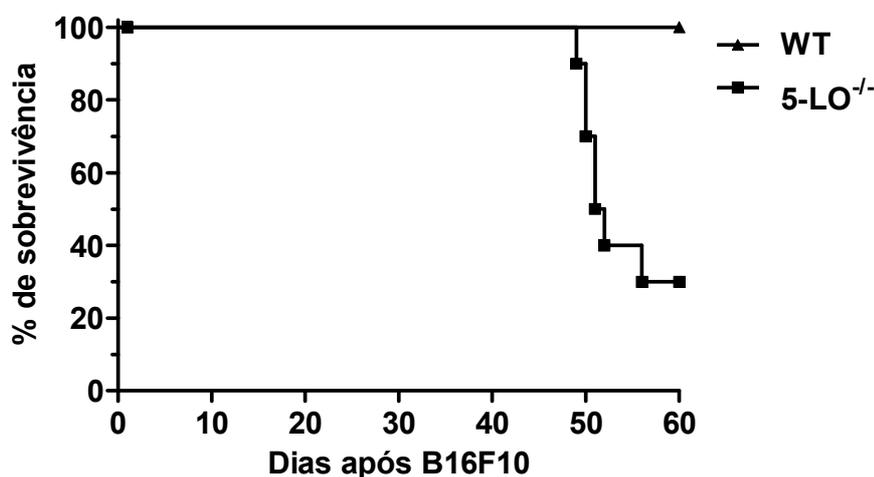
Com o objetivo de quantificar o infiltrado leucocitário nos pulmões dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> fizemos a análise morfométrica dos pulmões dos animais, quantificando tanto o número de macrófagos quanto neutrófilos. Observamos que ambas as populações celulares estavam em quantidades muito superiores nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> injetados com  $2 \times 10^5$  células B16F10, representando cerca de 4 vezes mais células (figura 10).



**Figura 10. Análise morfométrica de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>.** Lâminas histológicas provenientes de animais que receberam  $2 \times 10^5$  células B16F10 foram analisadas morfometricamente para a quantificação de macrófagos (A) e neutrófilos (B) \* $P < 0,05$  em relação ao WT com B16. WT Sal n=3; WT B16 n=3; 5-LO<sup>-/-</sup> Sal n= 3; 5-LO<sup>-/-</sup> B16 n=3

### 5.5) Curva de sobrevida dos camundongos WT e 5-LO<sup>-/-</sup> injetados com células B16F10

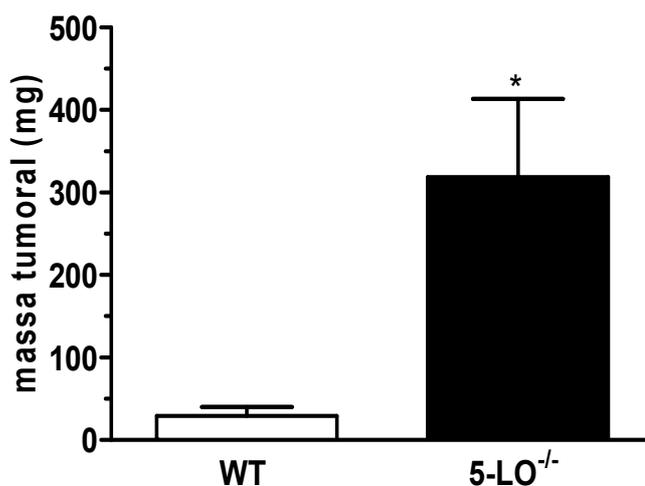
A partir da observação do crescimento tumoral pronunciado nos camundongos 5-LO<sup>-/-</sup>, padronizamos que nos experimentos subsequentes usaríamos  $2 \times 10^5$  células. Contudo, ao avaliarmos a sobrevida dos animais verificamos que essa quantidade de células não produzia diferença na mortalidade dos animais (dado não mostrado). Esse fato nos fez optar pela redução dessa quantidade para  $10^5$  células. Foi possível verificar que houve diferença significativa na mortalidade dos animais, pois no grupo WT houve 100% de sobrevivência, enquanto que, no grupo de animais 5-LO<sup>-/-</sup> somente 30% dos animais sobreviveram após 60 dias (**figura 11**). O ponto não retorno dos animais podia ser observado quando os mesmos apresentavam piloereção, letargia e insuficiência respiratória.



**Figura 11. Sobrevida dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> desafiados com células B16F10.** Animais de ambos os grupos receberam  $10^5$  células B16F10 i.v. e durante 60 dias os animais foram acompanhados e avaliados quanto a sobrevida. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo de animais WT. WT n=9; 5-LO<sup>-/-</sup> n=10

### 5.6) Avaliação do crescimento tumoral local nos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> injetados com B16F10.

Visto que o crescimento tumoral metastático foi muito mais pronunciado nos animais 5-LO<sup>-/-</sup>, resolvemos verificar se esse fato se repetiria no tecido cutâneo, foco original do melanoma, não ocorrendo os fenômenos de invasão e metástase. Assim, injetamos  $5 \times 10^5$  células B16F10 por via s.c. em camundongos WT e 5-LO<sup>-/-</sup> e observamos se o mesmo tipo de resposta seria encontrada (**figura 12**). A massa tumoral que cresceu s.c. nos revelou que os animais 5-LO<sup>-/-</sup> tiveram um crescimento tumoral muito mais pronunciado, comparado aos camundongos selvagens, confirmando a incapacidade dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> em controlar o crescimento tumoral e corroborando os resultados obtidos na avaliação do crescimento tumoral metastático.

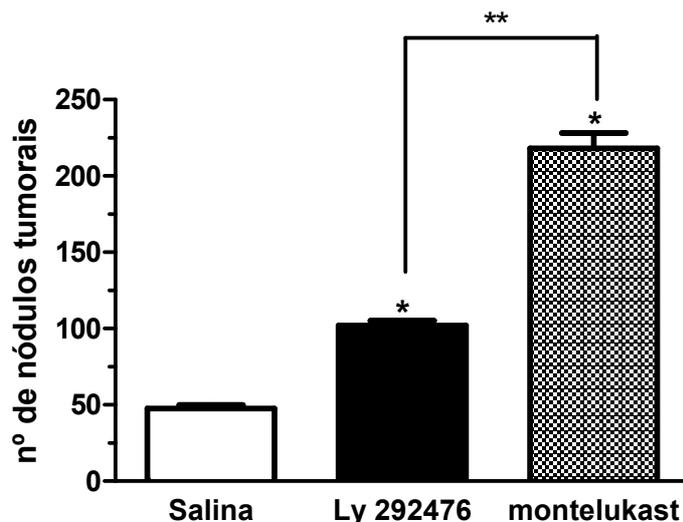


**Figura 12. Massa dos tumores após administração s.c. de B16F10 em animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup>.** Animais receberam  $5 \times 10^5$  células B16F10 s.c. e 30 dias depois os tumores foram removidos cirurgicamente e pesados em balança analítica. \* $P < 0,05$  em relação ao WT. WT n=10; 5-LO<sup>-/-</sup> n=7

## 5.7) Inibição farmacológica

Todos os resultados mostrados evidenciam que os LTs são importantes mediadores na proteção contra o melanoma murino, no entanto, como em nossos experimentos utilizamos animais deficientes para a enzima 5-LO não era possível saber qual classe de LT (se o LTB<sub>4</sub> ou os Cys-LTs) era responsável por esta proteção. Com o intuito de esclarecer essa questão, os animais WT foram tratados com antagonista do receptor Cys-LT<sub>1</sub> (montelukast) i.p. e do BLT<sub>1</sub> (Ly 292476) s.c. nas doses de 1 mg/kg e 1,5 mg/kg, respectivamente. Além do grupo controle que somente recebeu salina como tratamento, todos os animais foram injetados com  $2 \times 10^5$  células B16F10, procedendo todas as análises 2 semanas após a injeção.

O primeiro parâmetro analisado foi a quantificação de nódulos tumorais nos pulmões. Os animais tratados com salina possuíam em média 50 nódulos tumorais, enquanto que os animais tratados com o inibidor Ly 292476 apresentavam, aproximadamente, o dobro de nódulos. Por sua vez os animais tratados com montelukast apresentavam o quádruplo de nódulos tumorais em relação ao controle. Os dados mostraram que ambas as classes de LTs contribuem para a proteção contra o melanoma, embora os Cys-LTs pareçam exercer um papel mais importante neste processo de proteção, como mostra a **figura 13**.

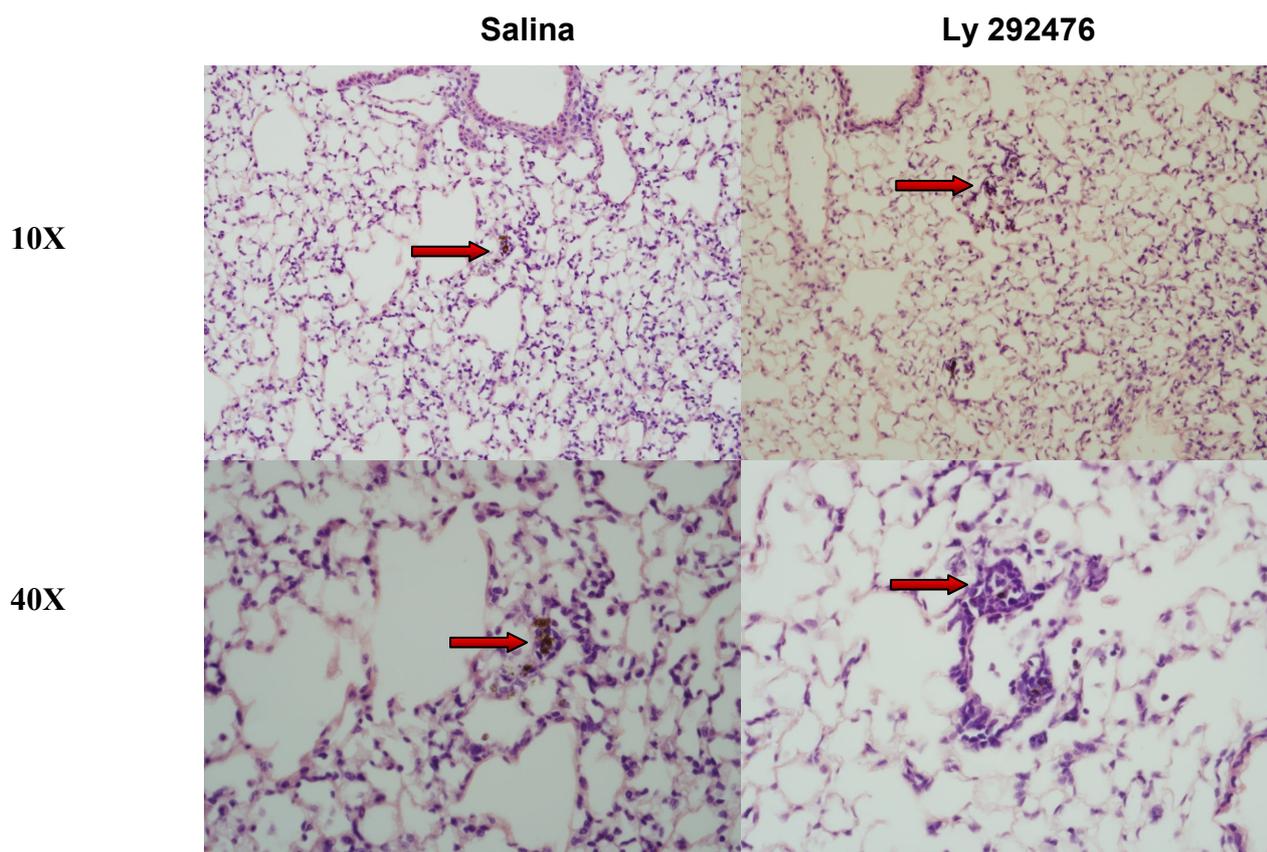


**Figura 13. Número de nódulos tumorais em animais tratados com Ly 292476, Montelukast e salina.** O Montelukast foi injetado i.p. na dose de 1mg/kg e o Ly 292476 foi injetado subcutaneamente (s.c.) na dose de 1,5 mg/kg. Ambas as drogas foram injetadas 30 minutos antes de se injetar as células e, o tratamento perdurou 14 dias. Todos os grupos receberam  $2 \times 10^5$  células B16F10 i.v. e 2 semanas depois os pulmões foram coletados e quantificados. \*  $P < 0,05$  em relação ao Salina. \*\*  $P < 0,05$  em relação ao Ly 292476. Salina n= 6; Ly 292476 n= 6; montelukast n = 5

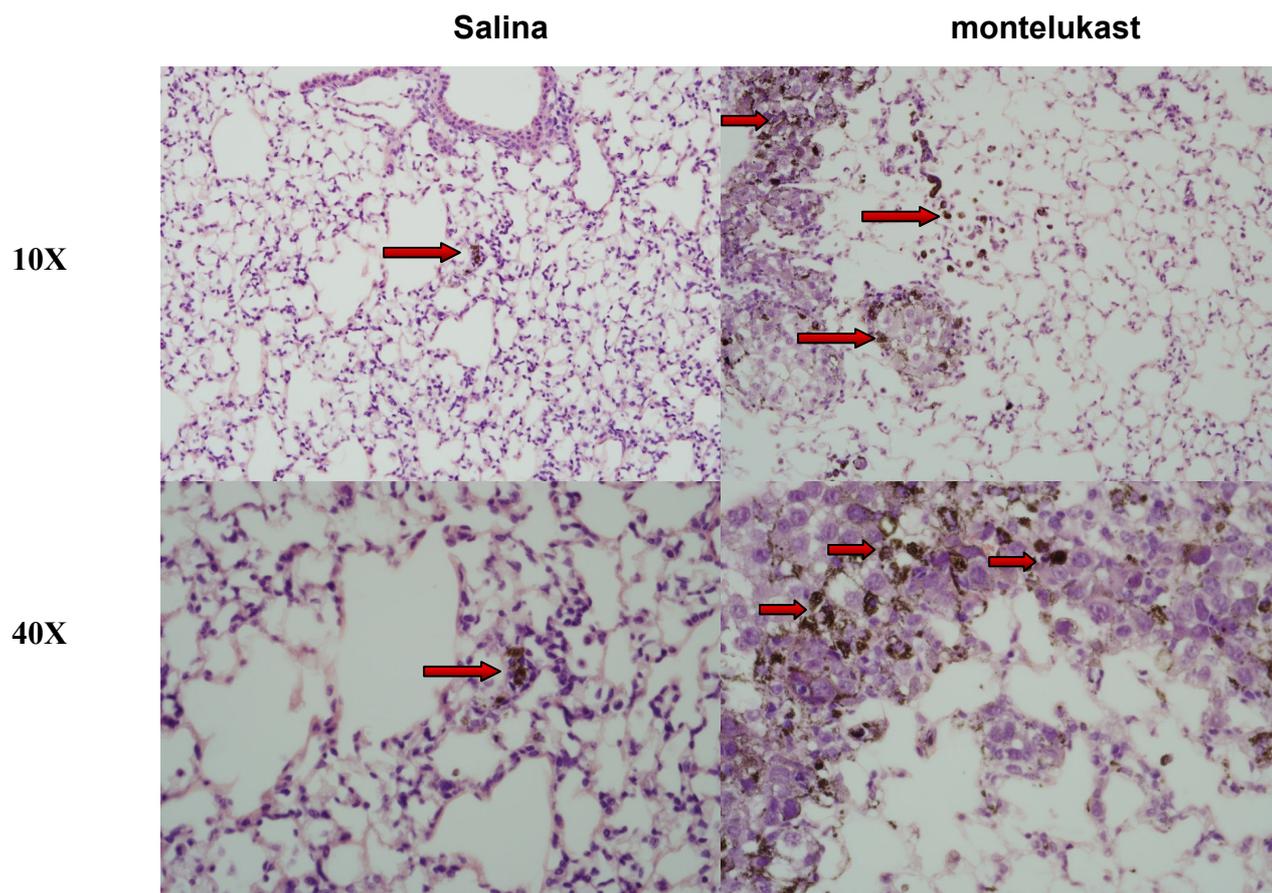
Em seguida, a análise histológica revelou que os animais tratados com Ly 292476 (figura 15) possuíam mais metástases tumorais do que os animais tratados com salina. Entretanto, os animais tratados com montelukast possuíam a maior quantidade de metástases tumorais dentre todos os grupos, além de um maior comprometimento da pleura com tais metástases (**figura 15**).

Em relação ao infiltrado leucocitário (macrófagos e neutrófilos), os animais tratados com Ly 292476 possuíam a maior quantidade de leucócitos, em relação aos demais grupos. Entre os animais tratados com montelukast e salina não houve diferença (**figuras 14 e 15**).

A estrutura alveolar dos animais tratados com montelukast era a mais comprometida dentre todos os grupos, havendo poucas diferenças entre os grupos tratados com salina e Ly 292476 (**figuras 14 e 15**).

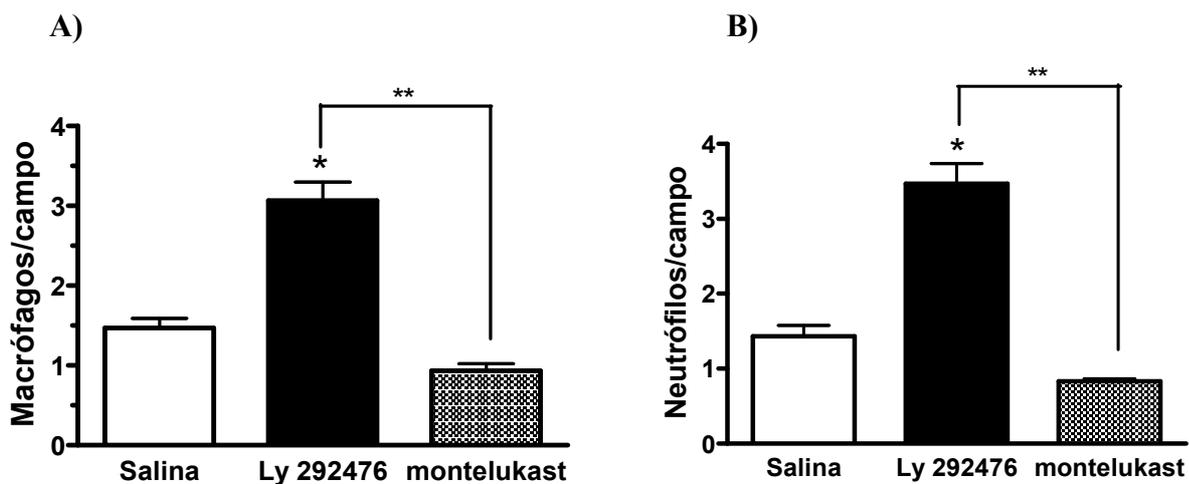


**Figura 14. Análise histológica do pulmão dos animais tratados com Salina e Ly 292476.** Os animais foram tratados, 30 minutos antes de se inocular as células B16F10, subcutaneamente (s.c.) com o inibidor Ly 292476 na dose de 1,5 mg/kg e o tratamento perdurou 14 dias. As células B16F10 foram inoculadas i.v na quantidade de  $2 \times 10^5$  e 2 semanas depois os pulmões foram coletados, corados com H&E e analisados histologicamente. Fotomicrografia representativa de um entre três animais no grupo. As setas indicam regiões de crescimento tumoral. Os campos possuíam  $26000 \mu\text{m}^2$ .



**Figura 15. Análise histológica do pulmão dos animais tratados com Salina e com montelukast.** Os animais foram tratados, 30 minutos antes de se inocular as células B16F10, intraperitonealmente (i.p.) com o inibidor montelukast na dose de 1 mg/kg e o tratamento perdurou 14 dias. Os animais foram injetados i.v com  $2 \times 10^5$  células B16F10 e 2 semanas depois os pulmões foram coletados, corados com H&E e analisados histologicamente. Fotomicrografia representativa de um entre três animais no grupo. As setas indicam regiões de crescimento tumoral. Os campos possuíam  $26000 \mu\text{m}^2$ .

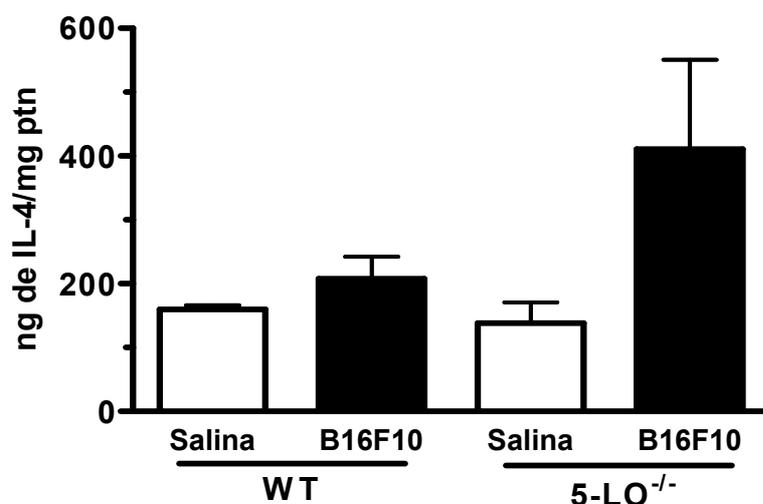
A fim de quantificar o infiltrado leucocitário, a análise morfométrica dos pulmões dos animais foi realizada, podendo-se verificar que os animais tratados com Ly 292476 apresentaram quantidades muito superiores de macrófagos e neutrófilos, tanto em relação ao controle (cerca de duas vezes mais) quanto em relação aos animais tratados com montelukast (cerca de três vezes mais) conforme pode ser observado na **figura 16**.



**Figura 16. Análise morfométrica de lâminas histológicas provenientes de animais WT tratados com salina, montelukast e Ly292476.** Ambas as drogas foram inoculadas 30 minutos antes da administração das células B16F10 e nos 14 dias seguintes. O Ly 292476 foi inoculado subcutaneamente (s.c.) na dose de 1,5 mg/kg e o Montelukast foi inoculado intraperitonealmente (i.p.) na dose de 1mg/kg. Os animais receberam  $2 \times 10^5$  células B16F10 e tratados com Ly292476, Montelukast e salina foram analisadas morfometricamente para a quantificação de macrófagos (A) e neutrófilos (B). \* $P < 0,05$ . em relação ao Salina. \*\* $P < 0,05$  em relação ao Montelukast. 3 animais por grupo.

## 5.8) Quantificação de IL-4

A dosagem da citocina IL-4 é importante por ser uma clássica citocina de padrão de resposta Th2. Assim, a sua quantificação sugere que tipo de resposta está acontecendo no microambiente tumoral. Verificamos que os animais 5-LO<sup>-/-</sup> possuem quantidades de IL-4 muito superiores quando comparados com os WT (**figura 17**).



**Figura 17. Quantificação da citocina IL-4 em animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> desafiados com B16F10 ou salina.** Animais de ambos os grupos receberam  $2 \times 10^5$  células B16F10 e 2 semanas depois os animais foram sacrificados e o lóbulo esquerdo do pulmão foi removido, homogeneizado e procedeu-se a quantificação da citocina IL-4 foi feita por meio de ELISA. WT Sal n=3; WT B16 n= 4; 5-LO<sup>-/-</sup> Sal n = 3; 5-LO<sup>-/-</sup> B16 n= 4

## 6) Discussão

A descrição da relação entre inflamação e câncer não é nova, pois em 1863 Virchow observou o surgimento de tumores em sítios de inflamação crônica e a presença de células inflamatórias em amostras de biópsias de tumores. Entretanto, essa conexão ficou abandonada por muito tempo até que demonstrou-se a redução do risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, como por exemplo, de cólon e de mama, e a diminuição da mortalidade induzida por estes tumores com o uso de anti-inflamatórios não esteroidais. Observou-se também que células inflamatórias, citocinas e quimiocinas estão presentes no microambiente tumoral de todos os tipos de câncer em modelos animais e em humanos. Além disso, foi mostrado que doenças de fundo inflamatório aumentam o risco de desenvolvimento de câncer. Estima-se que infecções e processos inflamatórios crônicos estejam associados com 15-20% de todas as mortes de câncer no mundo inteiro (BALKWILL E MANTOVANI 2001). Esses dados fizeram com que essa correlação fosse resgatada (MANTOVANI *et al.*, 2008).

Visto a importância dessa relação entre inflamação e câncer resolvemos avaliar a participação dos mediadores lipídicos neste processo, mais especificamente dos LTs. Para tal, utilizamos em nossos experimentos animais 5-LO<sup>-/-</sup>.

Como modelo experimental para induzir o processo tumoral utilizamos a linhagem de melanoma murino B16F10, por representar um modelo bem estabelecido de metástase, usado desde a década de 1970. Além disso, a presença de melanoma nos pulmões representa o quadro grave, que na clínica médica tem grande impacto na sobrevida dos pacientes acometidos pela doença.

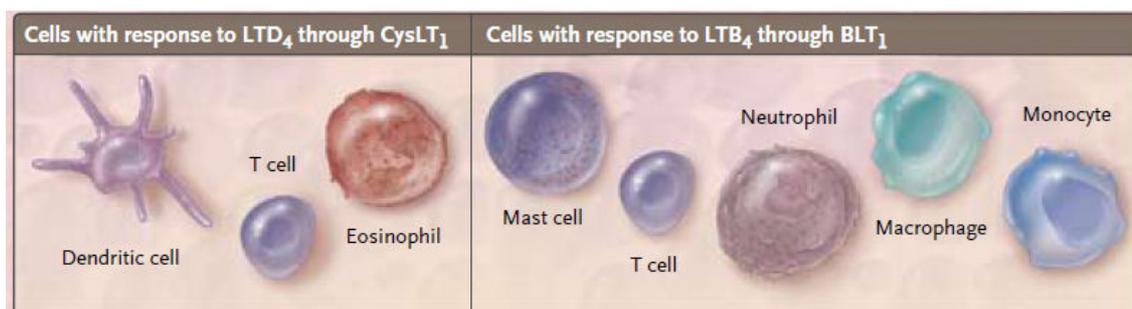
O primeiro parâmetro avaliado foi o número de nódulos tumorais nos pulmões dos animais, e pode-se perceber que, independente da quantidade de células tumorais injetadas, os animais 5-LO<sup>-/-</sup> sempre apresentaram mais nódulos tumorais nos pulmões quando comparados com os animais WT. Esse dado indica que os LTs exercem um papel importante no combate à proliferação das células tumorais injetadas. Esse fato foi confirmado pelo ensaio de sobrevida dos animais que receberam as células B16F10, onde apenas 30% dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> sobreviveram, enquanto que todos os animais WT sobreviveram.

Dados da literatura sugerem que os LTs (LTB<sub>4</sub> e Cys-LTs) favorecem o crescimento de tumores através de variados mecanismos, como por exemplo, a inibição

da apoptose (IHARA *et al.*, 2007) e a ativação de MAPK (TONG *et al.*, 2005), e que células tumorais expressam maiores quantidades da enzima 5-LO quando comparadas com células não transformadas (RUNARSSON *et al.*, 2005). Vale ressaltar que esses estudos foram realizados *in vitro* ou em biópsias de pacientes avaliando o papel dos LTs na carcinogênese. Em nosso estudo, injetamos células já transformadas tumorais e verificamos um papel protetor dos produtos da 5-LO na indução de metástases pulmonares.

Nosso grupo defende a hipótese que a ausência de LTs impede ou diminui a chegada de células capazes de modular negativamente o crescimento do tumor, pois já foi demonstrado que o LTB<sub>4</sub> exerce efeitos diretos em células CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e CD<sub>4</sub><sup>+</sup> através do receptor BLT<sub>1</sub>, induzindo a migração destas células para locais de inflamação (GOODARZI *et al.*, 2003; TAGER *et al.*, 2003). Além de exercer esses efeitos diretos, em células T, foi demonstrado que esse mediador pode exercer efeitos indiretos em células dendríticas, promovendo o aumento da expressão do receptor CCR7 nas mesmas. Este receptor é responsável pela migração dessas células para os órgãos linfóides, onde as células dendríticas exercem suas funções de apresentadoras de antígeno (PRETE *et al.*, 2007).

Além das células acima mencionadas, a **figura 19** ilustra outras células que expressam os receptores BLT<sub>1</sub> e Cys-LT<sub>1</sub>.



**Figura 18.** Representação esquemática das células que respondem ao LTD<sub>4</sub> através do receptor Cys-LT<sub>1</sub> e das células que respondem ao LTB<sub>4</sub> através do receptor BLT<sub>1</sub> (PETERS-GOLDEN AND HENDERSON, 2007).

A análise histológica realizada foi de vital importância porque mostrou que as observações feitas macroscopicamente podiam ser confirmadas microscopicamente, somando detalhes como a estrutura alveolar, infiltrado leucocitário e visualização da pleura, que antes não eram evidenciados. Quando analisamos o infiltrado leucocitário (macrófagos e neutrófilos) observamos que os animais 5-LO<sup>-/-</sup> possuíam maiores

quantidades destes tipos celulares em relação ao WT. A nossa hipótese para explicar tal observação é que a população de células recrutadas deve ser de macrófagos e neutrófilos associados ao tumor, ao invés de células ativadas pela via clássica (M1 e N1). Isso justificaria o fato dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> apresentarem um crescimento tumoral mais exacerbado, pois uma quantidade maior dessas células no microambiente tumoral favoreceria a evolução da doença. O inverso também parece ser verdadeiro, o ambiente tumoral induz o recrutamento de macrófagos associados ao tumor, por isso um grande aumento nos animais deficientes (os quais apresentam grande quantidade de nódulos comparados aos animais selvagens). Tais hipóteses necessitam de futuros experimentos para sua validação.

Quando os monócitos (que se diferenciam em macrófagos posteriormente) alcançam a massa tumoral, encontram um microambiente que é pobre em IFN $\gamma$  e em componentes bacterianos, mas ricos em grandes quantidades de IL-4 ou IL-13, fazendo com que ocorra uma polarização destas células para macrófagos associados a tumores (TAM) os quais possuem fenótipo M2 (MANTOVANI *et al.*, 2004). Esses TAM são responsáveis por produzirem enzimas que modulam a angiogênese em tumores como, por exemplo, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-12. Além disso, os TAM são responsáveis por favorecer o processo de invasão e metástase (DENARDO *et al.*, 2008).

Em relação à população de neutrófilos observada, foi descrito recentemente, que assim como os macrófagos, os neutrófilos também possuem subpopulações, destacando-se a população N1 e a N2 (neutrófilos associados a tumores). Os neutrófilos N1 são mais citotóxicos frente à células tumorais e com um perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias mais elevado do que os N2 (FRIDLENDER *et al.*, 2009).

É possível que em nosso estudo, a população N2 seja preponderante, contudo, maiores estudos são necessários para confirmar tal hipótese. Fridlender *et al.*, ao caracterizar essas duas populações, demonstrou a necessidade de se bloquear o receptor de TGF- $\beta$  para que a população N1 aumente. O TGF- $\beta$  se trata de uma citocina muito expressa em tumores e capaz de bloquear as respostas imunes contra os mesmos.

Visto a importância dos LTs na proteção frente o desenvolvimento do melanoma murino, o próximo passo foi determinar qual classe de LTs seria a responsável por esta proteção, pois o animal 5-LO<sup>-/-</sup> não sintetiza nenhuma das classes de LTs (LTB<sub>4</sub> e Cys-LTs). Resolvemos lançar mão da inibição farmacológica através do uso de antagonistas dos receptores BLT<sub>1</sub> (Ly292476) e CysLT<sub>1</sub> (montelukast) em animais WT.

Os dados mostram que ambas as classes de LTs exercem efeito protetor frente ao melanoma, sugerindo que pode haver sinergismo entre ambas no combate a essa doença, contudo, quando utilizamos o montelukast o crescimento tumoral foi mais pronunciado. Vale ressaltar que o efeito no infiltrado celular obtido com o tratamento com montelukast ou com Ly 292476 foi quantitativamente menor do que aquele observado nos animais deficientes.

Além disso, ao verificarmos o infiltrado leucocitário de macrófagos e neutrófilos no grupo que foi tratado com o fármaco montelukast, parece não haver correlação entre o desenvolvimento tumoral e o infiltrado leucocitário. A explicação para tal observação pode advir do próprio montelukast, pois recentemente foi mostrado que esse antagonista é capaz de inibir a expressão de IL-8 (citocina associada ao recrutamento de neutrófilos), induzida pelo TNF- $\alpha$ , através da inibição de uma histona que apresenta atividade de acetiltransferase (TAHAN *et al.*, 2008). Essa histona é uma proteína co-ativadora da transcrição de genes inflamatórios como, por exemplo, o NF- $\kappa$ B p65 e AP-1, e a ativação dessa proteína leva a um aumento na expressão destes genes. Esses menores níveis de IL-8 podem ser os responsáveis pela falência na migração dos neutrófilos observadas em nossos experimentos (TAHAN *et al.*, 2008). Verificou-se também que o montelukast inibe diretamente o NF- $\kappa$ B, reduzindo a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1, sendo a última um importante quimioatraente de monócitos (MAEBA *et al.*, 2005). Em relação ao antagonista Ly 292476, embora se verifique um infiltrado leucocitário mais pronunciado, o mesmo ainda é muito inferior ao encontrado nos animais 5-LO<sup>-/-</sup>. Entretanto, a literatura carece de informações que relacionem esse fármaco com a inibição de fatores de transcrição, produção de citocinas e quimiocinas.

Quando avaliamos o crescimento local do melanoma (injeção s.c.) foi possível observar que independente da via utilizada, o mesmo parâmetro de crescimento observado no pulmão também foi identificado no tecido subcutâneo, mostrando que tanto de forma local como de forma sistêmica os LTs são importantes na defesa contra o desenvolvimento do melanoma. Embora o crescimento local do melanoma pudesse gerar uma série de resultados, o nosso objetivo sempre foi avaliar o quadro de metástase.

Já foi demonstrado que na ausência da enzima 5-LO, a produção de IL-10 é aumentada e uma resposta imunológica de padrão Th2 é preponderante (DiMeo *et al.*, 2007) razão essa que nos levou a avaliar a produção de IL-4 no interstício pulmonar, sendo possível verificar que os animais 5-LO<sup>-/-</sup> injetados com B16F10 possuíam cerca

de 400 ng de IL-4/mg de proteína enquanto que os animais WT injetados possuíam a metade deste valor. Esse resultado corrobora os dados da quantificação de nódulos e sobrevida do nosso estudo. A relação dessa citocina no desenvolvimento tumoral já foi bem estudada, estando sempre associada com um pior prognóstico da doença.

Foi demonstrado que várias células tumorais expressam o receptor de IL-4, dentre elas: sarcoma murino (PURI *et al.*, 1991), células humanas de carcinoma renal (OBIRI *et al.*, 1993), câncer de pulmão humano (KAWAKAMI *et al.*, 2002a), sarcoma de Kaposi humano associado a AIDS (HUSAIN *et al.*, 1999), câncer ovariano (KIOI *et al.*, 2005), linfoma de Hodgkin (KAWAKAMI *et al.*, 2005), carcinoma de mama (LELAND *et al.*, 2000), câncer de cabeça e pescoço (STROME *et al.*, 2002) e tumores pancreáticos (KAWAKAMI *et al.*, 2002b).

Em modelo de melanoma murino um estudo utilizou as células B16F10 e as células B16F1 e demonstrou-se que no baço de camundongos injetados com B16F10, foi gerada uma população de linfócitos Th2 produtoras de altas quantidades de IL-4 e IL-10 quando ativadas com anti-CD3. Essas células Th2 foram transferidas adotivamente para camundongos injetados com células B16F1, promovendo o aumento do número de nódulos tumorais igualando-se ao número de nódulos observados nos camundongos injetados somente com B16F10 (KOBAYASHI *et al.*, 1998). Um resultado semelhante foi observado quando os camundongos que receberam a linhagem B16F1 foram tratados com IL-4r, igualando o número de nódulos tumorais aos dos animais que receberam a linhagem B16F10 (KOBAYASHI *et al.*, 1998).

Esse trabalho mostrou-se importante na caracterização do papel dos leucotrienos frente ao melanoma murino, que até então era desconhecido. Contudo, maiores estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa proteção.

## 7) Conclusão

Esse trabalho nos permite concluir que ambas as classes de LTs, LTB<sub>4</sub> e Cys-LTs, são de fundamental importância na proteção contra a proliferação do melanoma murino. Uma resposta imunológica do tipo Th2 pode estar relacionada pelas quantidades da citocina IL-4 encontradas. Entretanto, maiores estudos serão necessários para que tal afirmação se confirme.

## 8) Perspectivas futuras

Em relação ao tratamento farmacológico, várias possibilidades ocorrem, dentre elas:

- a) associar ambos os fármacos e observar se o crescimento tumoral se igualaria aos dos animais 5-LO<sup>-/-</sup>;
- b) o uso de outros antagonistas ou de animais deficientes para os receptores de LTs;
- c) Avaliar a diferença entre as linhagens de camundongos, pois a ausência da 5-LO pode acarretar diferenças bioquímicas e fisiológicas ainda não elucidadas.

Como solução para a possível interferência do Montelukast no infiltrado leucocitário, uma possibilidade seria utilizar outro antagonista e verificar se esses efeitos são mantidos.

Uma forma de comprovar nossas observações realizadas até aqui seria através da utilização de diferentes linhagens de células tumorais nos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> e verificar se os mesmos parâmetros se repetiriam.

Como forma de elucidar qual tipo de resposta imunológica está ocorrendo (Th1, Th2 ou Th17) se faz necessário dosar citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-13 e IL-17.

Determinar as classes de macrófagos e neutrófilos presentes nos tecidos pulmonares de animais WT vs 5-LO<sup>-/-</sup>.

Verificar o efeito de LTB<sub>4</sub> e Cys-LTs na viabilidade das células B16F10.

## 9) Referências Bibliográficas

- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K & Walter, P. **Molecular biology of the cell**. 1063, 2008
- Armstrong, B. **Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends**. In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, eds. Textbook of Melanoma. London: Martin Dunitz. 90: 65-80, 2004
- Avis, I. M.; Jett, M.; Boyle, T.; Vos, M. D.; Moody, T.; Treston, A. M.; Martinez, A; & Mulshine, J. L. **Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling**. *J Clin Invest* 97:806-813, 1996
- Bachi, A; Kim, F; Nonogaki, S; Carneiro, C; Lopes, J; Jasiulionis, M; & Correa, M. **Leukotriene B<sub>4</sub> creates a favorable microenvironment for murine melanoma growth**. *Mol Canc Res* 7:1417-1424, 2009.
- Balch C; Buzaid A; Soong S; Atkins M; Cascinelli N; Coit D; Fleming I; Gershenwald J; Houghton A; Kirkwood J; McMasters K; Mihm M; Morton D; Reintgen D; Ross M; Sober A & Thompson J. **Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma**. *J Clin Oncol* 19 16: 3635–3648, 2001
- Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.J.; Puledran, B. & Palucka, K. **Immunobiology of dendritic cells**. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811, 2000
- Balkwill, F. & Mantovani, A. **Inflammation and cancer: back to Virchow?** *Lancet* 357:539-545, 2001
- Bennett, D. C. **How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events?** *Pigment Cell Melanoma Res* 21:27-38, 2008
- Bingle, L.; Lewis, C. E.; Corke, K. P.; Reed, M. W. & Brown, N. J. **Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo**. *Br J Cancer* 94:101-107, 2006
- Bozza, P. T.; Magalhaes, K. G. & Weller, P. F. **Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation**. *Biochim Biophys Acta* 1791:540-551, 2009
- Braig, M. & Schmitt, C. A. **Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development**. *Cancer Res* 66:2881-2884, 2006
- Brigati, C.; Noonan, D.M.; Albini, A. & Bannelli, R. **Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?** *Clin. Exp. Metastasis.* 19: 247-258, 2002
- Brock, T. G. **Regulating leukotriene synthesis: the role of nuclear 5-lipoxygenase**. *J Cell Biochem* 96:1203-1211, 2005
- Burke, F.; Relf, M.; Negus, R. & Balkwill, F. **A cytokine profile of normal and malignant ovary**. *Cytokine* 8:578-585, 1996
- Chen, X. S.; Sheller, J. R.; Johnson, E. N. & Funk, C. D. **Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene**. *Nature* 372:179-182, 1994
- Cordeiro, B.P.V.; Pereira, C.F.; Noronha, C.P.; Ramos, D.N.; Cabral, E.S.C.; Ferreira, J.M.O.; Oliveira, J.F.P.; Santos, M.O.; Costa, M.C.E.; Rebelo, M.S. & Reis, R.S. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. 36, 2009.
- Costa MF; de Souza-Martins R; de Souza MC; Benjamim CF; Piva B; Diaz BL; Peters-Golden M; Henriques MG; Canetti C & Penido C. **Leukotriene B<sub>4</sub> mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli**. *J Leukoc Biol* 87: 323-332, 2009.

- Deepak, P.; Kumar, S. & Acharya, A. **Interleukin-13-induced type II polarization of inflammatory macrophages is mediated through suppression of nuclear factor-kappaB and preservation of IkappaBalpha in a T cell lymphoma.** *Clin Exp Immunol* 149:378-386, 2007
- Demierre, M. F.; Sabel, M. S.; Margolin, K. A.; Daud, A. I. & Sondak, V. K. **State of the science 60th anniversary review: 60 Years of advances in cutaneous melanoma epidemiology, diagnosis, and treatment, as reported in the journal Cancer.** *Cancer* 113:1728-1743; 2008
- DeNardo, D. G.; Johansson, M. & Coussens, L. M. **Immune cells as mediators of solid tumor metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 27:11-18, 2008
- Dewald, B. & Baggiolini, M. **Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB4.** *Biochem Biophys Res Commun* 128:297-304, 1985
- DiMeo, D.; Tian, J.; Zhang, J.; Narushima, S & Berg, D. **Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase.** *Immunol* 123: 250-262, 2007
- Fang, L.; Lonsdorf, A.S. & Hwang, S.T. **Immunotherapy for advanced melanoma.** *J. Invest. Dermatol.* 128:2596-2605, 2008
- Fernandez, N.; Renedo, M.; Alonso, S. & Crespo, M. S. **Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the FcgammaR and the complement receptor 3 pathways.** *J Biol Chem* 278:52179-52187, 2003
- Fidler, I. J. **Selection of successive tumour lines for metastasis.** *Nat New Biol* 242:148-149, 1973
- Fidler, I. J. & Nicolson, G. L. **Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines.** *J Natl Cancer Inst* 57:1199-1202, 1976
- Fierro, I.M. & C.N. Serhan, **Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins.** *Braz J Med Biol Res.* 34: 555-566, 2001
- Fife, K. & Thompson, J.F. **Lymph-node metastases in patients with melanoma: what is the optimum management?** *Lancet. Oncol.* 2: 614-621, 2001
- Flamand, L.; Borgeat, P.; Lalonde, R. & Gosselin, J. **Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans.** *J Infect Dis* 189:2001-2009, 2004
- Friedman, R.J.; Rigel, D.S. & Kopf, A.W. **Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self examination of the skin.** *CA. Cancer. J. Clin.* 35: 130-151, 1985
- Fridlender, Z. G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Worthen, G. S. & Albelda, S. M. **Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN.** *Cancer Cell* 16:183-194, 2009
- Gaiotti, D.; Chung, J.; Iglesias, M.; Nees, M.; Baker, P. D.; Evans, C. H. & Woodworth, C. D. **Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway.** *Mol Carcinog* 27:97-109, 2000.
- Giavazzi, R.; Garofalo, A.; Bani, M. R.; Abbate, M.; Ghezzi, P.; Boraschi, D.; Mantovani, A. & Dejana, E. **Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice.** *Cancer Res* 50:4771-4775, 1990
- Gillmor, S. A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E. & Browner, M. F. **The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity.** *Nat Struct Biol* 4:1003-1009, 1997

- Goldman, G.; Welbourn, R.; Kobzik, L.; Valeri, C. R.; Shepro, D. & Hechtman, H. B. **Lavage with leukotriene B4 induces lung generation of tumor necrosis factor-alpha that in turn mediates neutrophil diapedesis.** *Surgery* 113:297-303, 1993
- Golumbek, P. T.; Lazenby, A. J.; Levitsky, H. I.; Jaffee, L. M.; Karasuyama, H.; Baker, M. & Pardoll, D. M. **Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4.** *Science* 254:713-716, 1991
- Goodarzi, K., Goodarzi, M., Tager, M.A., Luster, A.D., Andrian, U.H. **Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues.** *Nat. Immunol.* 4: 965-973, 2003
- Ghiringhelli, F.; Puig, P.E.; Roux, S.; Parcellier, A.; Schmitt, E.; Solary, E.; Kroemer, G.; Chauffert, B., & Zitvogel, L. **Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell proliferation.** *J. Exp. Med.* 202: 919-929, 2005
- Greenberg, S. & Grinstein, S. **Phagocytosis and innate immunity.** *Curr Opin Immunol* 14:136-145, 2002
- Hammarberg, T.; Provost, P.; Persson, B. & Radmark, O. **The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity.** *J Biol Chem* 275:38787-38793, 2000
- Harle, D.; Radmark, O.; Samuelsson, B. & Steinhilber, D. **Transcriptional and posttranscriptional regulation of 5-lipoxygenase mRNA expression in the human monocytic cell line Mono Mac 6 by transforming growth factor-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3.** *Adv Exp Med Biol* 469:105-111, 1999
- Harris, S.G.; Padilla, J.; Kourmas, L.; Ray, D. & Phipps, R.P. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trends Immunol.* 23: 144-150, 2002
- Hebert, M. J.; Takano, T.; Holthofer, H. & Brady, H. R. **Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids.** *J Immunol* 157:3105-3115, 1996
- Hiratsuka, S.; Nakamura, K.; Iwai, S.; Murakami, M.; Itoh, T.; Kijima, H.; Shipley, J. M.; Senior, R. M. & Shibuya, M. **MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis.** *Cancer Cell* 2:289-300, 2002.
- Hopkins, H.; Stull, T.; Von Essen, S. G.; Robbins, R. A. & Rennard, S. I. **Neutrophil chemotactic factors in bacterial pneumonia.** *Chest* 95:1021-1027, 1989
- Huang, M; Stolina, M; Sharma, S; Mao, J.T; Zhu, L; Miller, PW; Wollman, J; Herschman, H & Dubinett S.M. **Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production.** *Cancer Res.*58:1208-1216, 1998
- Huang, L.; Zhao, A.; Wong, F.; Ayala, J. M.; Struthers, M.; Ujjainwalla, F.; Wright, S. D.; Springer, M. S.; Evans, J. & Cui, J. **Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1783-1788, 2004
- Husain, S. R.; Kreitman, R. J.; Pastan, I. & Puri, R. K. **Interleukin-4 receptor-directed cytotoxin therapy of AIDS-associated Kaposi's sarcoma tumors in xenograft model.** *Nat Med* 5:817-822, 1999
- Ihara, A.; Wada, K.; Yoneda, M.; Fujisawa, N.; Takahashi, H. & Nakajima, A. **Blockade of leukotriene B<sub>4</sub> signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer.** *J. Pharmacol. Sci.* 103: 24-32, 2007
- Kai, H.; Kitadai, Y.; Kodama, M.; Cho, S.; Kuroda, T.; Ito, M.; Tanaka, S.; Ohmoto, Y. & Chayama, K. **Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma.** *Anticancer Res* 25:709-713, 2005

- Kanaoka, Y. & Boyce, J. A. **Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses.** *J Immunol* 173:1503-1510, 2004
- Katerinaki, E.; Evans, G. S.; Lorigan, P. C. & MacNeil, S. **TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes.** *Br J Cancer* 89:1123-1129, 2003
- Kawakami, K.; Kawakami, M.; Husain, S. R. & Puri, R. K.. **Targeting interleukin-4 receptors for effective pancreatic cancer therapy.** *Cancer Res* 62:3575-3580, 2002b
- Kawakami, M.; Kawakami, K.; Kioi, M.; Leland, P. & Puri, R. K. **Hodgkin lymphoma therapy with interleukin-4 receptor-directed cytotoxin in an infiltrating animal model.** *Blood* 105:3707-3713, 2005
- Kawakami, M.; Kawakami, K.; Stepensky, V. A.; Maki, R. A.; Robin, H.; Muller, W.; Husain, S. R. & Puri, R. K. **Interleukin 4 receptor on human lung cancer: a molecular target for cytotoxin therapy.** *Clin Cancer Res* 8:3503-3511, 2002a
- Kienzle, N.; Buttigieg, K.; Groves, P.; Kawula, T. & Kelso, A. **A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression.** *J Immunol* 168:1672-1681, 2002
- Kienzle, N.; Olver, S.; Buttigieg, K.; Groves, P.; Janas, M. L.; Baz, A. & Kelso, A.. **Progressive differentiation and commitment of CD8+ T cells to a poorly cytolytic CD8low phenotype in the presence of IL-4.** *J Immunol* 174:2021-2029, 2005
- Kioi, M.; Takahashi, S.; Kawakami, M.; Kawakami, K.; Kreitman, R. J. & Puri, R. K. **Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced ovarian cancer therapy.** *Cancer Res* 65:8388-8396, 2005
- Kobayashi, M.; Kobayashi, H.; Pollard, R. B. & Suzuki, F. **A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma.** *J Immunol* 160:5869-5873, 1998
- Koong, A. C.; Denko, N. C.; Hudson, K. M.; Schindler, C.; Swiersz, L.; Koch, C.; Evans, S.; Ibrahim, H.; Le, Q. T.; Terris, D. J. & Giaccia, A. J. **Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype.** *Cancer Res* 60:883-887, 2000
- Kollias, G.; Douni, E.; Kassiotis, G. & Kontoyiannis, D. **On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease.** *Immunol Rev* 169:175-194, 1999
- Kortylewski, M.; Kujawski, M.; Wang, T.; Wei, S; Zhang S.; Pilon-Thomas, S.; Niu, G.; Kay,H.; Mule, J. & Kerr, W.G. **Inhibiting STAT3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity.** *Nat. Med.* 11: 1314-1321, 2005
- Kortylewski, M. & Yu, H. **Role of STAT3 in suppressing anti-tumor immunity.** *Curr. Opin. Immunol.* 20: 228-233, 2008
- Kuhns, D. B.; Nelson, E. L.; Alvord, W. G. & Gallin, J. I. **Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or leukotriene B(4).** *J Immunol* 167:2869-2878, 2001
- Larfars, G.; Lantoine, F.; Devynck, M. A.; Palmblad, J. & Gyllenhammar, H. **Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B4, C4, and D4 in human polymorphonuclear leukocytes.** *Blood* 93:1399-1405, 1999
- Larré, S.; Tran, N.; Fan, C.; Hamadeh, H.; Champigneulle, R.S.; Cussenot, O.; Mangin, P. & Olivier, J.L. **PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> tissue levels in benign and cancerous prostates.** *Prostaglandins and other Lipid Mediators.* 87: 14-19, 2008

- Lee, E.; Robertson, T.; Smith, J. & Kilfeather, S. **Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals.** *Am J Respir Crit Care Med* 161:1881-1886, 2000
- Leek, R. D.; Lewis, C. E.; Whitehouse, R.; Greenall, M.; Clarke, J. & Harris, A. L. **Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma.** *Cancer Res* 56:4625-4629, 1996
- Leitch, J.; Fraser, k., Lane, C.; Putzu, K.; Adema, G.J.; Zhang, Q.J.; Jeffries, W.A.; Bramson, J.L. & Wan, Y. (2004). **CTL dependent and independent antitumor immunity is determined by the tumor not the vaccine.** *J. Immunol.* 172: 5200-5205, 2004
- Lejeune, F. J.; Ruegg, C. & Lienard, D. **Clinical applications of TNF-alpha in cancer.** *Curr Opin Immunol* 10:573-580, 1998
- Leland, P.; Taguchi, J.; Husain, S. R.; Kreitman, R. J.; Pastan, I. & Puri, R. K. **Human breast carcinoma cells express type II IL-4 receptors and are sensitive to antitumor activity of a chimeric IL-4-Pseudomonas exotoxin fusion protein in vitro and in vivo.** *Mol Med* 6:165-178, 2000
- .Lin, E.Y. & Pollard, J.W. **Tumor associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer.** *Cancer. Res.* 67: 5064-5066, 2007
- Lin, W. W. & Karin, M. (2007). **A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.** *J Clin Invest* 117:1175-1183.
- Linos, E.; Swetter, S.M.; Cockburn, M.G.; Colditz, G.A. & Clarke, C.A. **Increasing Burden of Melanoma in the United States.** *J Invest Dermatol* doi: 10.1038/jid.2008.423, 2009
- Locksley, R. M.; Fankhauser, J. & Henderson, W. R. **Alteration of leukotriene release by macrophages ingesting Toxoplasma gondii.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6922-6926, 1985.
- Luo, M.; Jones, S. M.; Flamand, N.; Aronoff, D. M.; Peters-Golden, M. & Brock, T. G. **Phosphorylation by protein kinase a inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase.** *J Biol Chem* 280:40609-40616, 2005
- Luo, M.; Jones, S. M.; Phare, S. M.; Coffey, M. J.; Peters-Golden, M. & Brock, T. G. **Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523.** *J Biol Chem* 279:41512-41520, 2004
- Luo, M.; Pang, C. W.; Gerken, A. E. & Brock, T. G. **Multiple nuclear localization sequences allow modulation of 5-lipoxygenase nuclear import.** *Traffic* 5:847-854, 2004a
- Lynch, K. R.; O'Neill, G. P.; Liu, Q.; Im, D. S.; Sawyer, N.; Metters, K. M.; Coulombe, N.; Abramovitz, M.; Figueroa, D. J.; Zeng, Z.; Connolly, B. M.; Bai, C.; Austin, C. P.; Chateauneuf, A.; Stocco, R.; Greig, G. M.; Kargman, S.; Hooks, S. B.; Hosfield, E.; Williams, D. L., Jr.; Ford-Hutchinson, A. W.; Caskey, C. T. & Evans, J. F. **Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor.** *Nature* 399:789-793, 1999
- Maeba, S.; Ichiyama, T.; Ueno, Y.; Makata, H.; Matsubara, T. & Furukawa, S. **Effect of montelukast on nuclear factor kappaB activation and proinflammatory molecules.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 94:670-674, 2005
- Mancuso, P.; Standiford, T. J.; Marshall, T. & Peters-Golden, M. **5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of Klebsiella pneumoniae.** *Infect Immun* 66:5140-5146, 1998
- Mancuso, P.; Nana-Sinkam, P. & Peters-Golden, M. **Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of Klebsiella pneumoniae.** *Infect Immun* 69:2011-2016, 2001

- Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A. & Balkwill, F. **Cancer-related inflammation.** *Nature* 454:436-444, 2008
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A. & Locati, M. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends Immunol* 25:677-686, 2004
- Marini, A.; Mirmohammadsadegh, A.; Nambiar, S.; Gustrau, A.; Ruzicka, T. & Hengge, U. R. **Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma.** *J Invest Dermatol* 126:422-431, 2006
- Markovic, S. N.; Erickson, L. A.; Rao, R. D.; Weenig, R. H.; Pockaj, B. A.; Bardia, A.; Vachon, C. M.; Schild, S. E.; McWilliams, R. R.; Hand, J. L.; Laman, S. D.; Kottschade, L. A.; Maples, W. J.; Pittelkow, M. R.; Pulido, J. S.; Cameron, J. D. & Creagan, E. T. **Malignant melanoma in the 21st century, part 2: staging, prognosis, and treatment.** *Mayo Clin Proc* 82:490-513, 2007
- Melief, C.J.M. **Cancer immunotherapy by dendritic cells.** *Immunity*. 29: 372-383, 2008
- Mellor, E. A.; Austen, K. F. & Boyce, J. A. **Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists.** *J Exp Med* 195:583-592, 2002
- Meysken, F.L.Jr.; Farmer, P.J. & Anton-Culver, H. **Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk.** *Clin. Cancer. Res.* 10: 2581-2583, 2004
- Mezhybovska, M.; Wikstrom, K.; Ohd, J. F. & Sjolander, A. **Pro-inflammatory mediator leukotriene D4 induces transcriptional activity of potentially oncogenic genes.** *Biochem Soc Trans* 33:698-700, 2005
- Naylor, M. S.; Stamp, G. W.; Foulkes, W. D.; Eccles, D. & Balkwill, F. R. **Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression.** *J Clin Invest* 91:2194-2206, 1993
- Nevala, W. K.; Vachon, C. M.; Leontovich, A. A.; Scott, C. G.; Thompson, M. A. & Markovic, S. N. **Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma.** *Clin Cancer Res* 15:1931-1939, 2009
- Obiri, N. I.; Hillman, G. G.; Haas, G. P.; Sud, S. & Puri, R. K. **Expression of high affinity interleukin-4 receptors on human renal cell carcinoma cells and inhibition of tumor cell growth in vitro by interleukin-4.** *J Clin Invest* 91:88-93, 1993
- Ohd, J. F.; Nielsen, C. K.; Campbell, J.; Landberg, G.; Lofberg, H. & Sjolander, A. **Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas.** *Gastroenterology* 124:57-70, 2003
- Parameswaran, K.; Liang, H.; Fanat, A.; Watson, R.; Snider, D. P. & O'Byrne, P. M. **Role for cysteinyl leukotrienes in allergen-induced change in circulating dendritic cell number in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 114:73-79, 2004
- Pai, R.; Szabo, I.L.; Soreghan, B.A.; Atay, S.; Kawanaka, H. & Tarnawski, A.S. **PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 923-928, 2001
- Peters-Golden, M.; Canetti, C.; Mancuso, P. & Coffey, M.J. **Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses.** *J. Immunol.* 173: 589-594, 2005
- Plante, H.; Picard, S.; Mancini, J. & Borgeat, P. **5-Lipoxygenase-activating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis.** *Biochem J* 393:211-218, 2006

- Prete, A.D.; Shao, W.H.; Mitola, S.; Santoro, G.; Sozzani, S. & Haribabu, B. **Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function.** *Blood*. 109: 626-631, 2007
- Puri, R. K.; Ogata, M.; Leland, P.; Feldman, G. M.; FitzGerald, D. & Pastan, I. **Expression of high-affinity interleukin 4 receptors on murine sarcoma cells and receptor-mediated cytotoxicity of tumor cells to chimeric protein between interleukin 4 and Pseudomonas exotoxin.** *Cancer Res* 51:3011-3017, 1991
- Radmark, O.; Werz, O.; Steinhilber, D. & Samuelsson, B. **5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity.** *Trends Biochem Sci* 32:332-341, 2007
- Rioux, N. & Castonguay, A. **Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents.** *Carcinogenesis* 19:1393-1400, 1998
- Robbiani, D. F.; Finch, R. A.; Jager, D.; Muller, W. A.; Sartorelli, A. C. & Randolph, G. J. **The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes.** *Cell* 103:757-768, 2000
- Rodolfo, M.; Zilocchi, C.; Accornero, P.; Cappetti, B.; Arioli, I. & Colombo, M. P. **IL-4-transduced tumor cell vaccine induces immunoregulatory type 2 CD8 T lymphocytes that cure lung metastases upon adoptive transfer.** *J Immunol* 163:1923-1928, 1999
- Romano, M.; Catalano, A.; Nutini, M.; D'Urbano, E.; Crescenzi, C.; Claria, J.; Libner, R.; Davi, G. & Procopio, A. **5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor.** *FASEB J* 15:2326-2336, 2001
- Runarsson, G.; Liu, A.; Mahshid, Y.; Feltenmark, S.; Pettersson, A.; Klein, E.; Bjorkholm, M. & Claesson, H. E. **Leukotriene B4 plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells.** *Blood* 105:1274-1279, 2005
- Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. **Cellular and molecular biology of human melanoma.** *Cancer. Biol. Ther.* 1: 14-17, 2002
- Schneider, M. R.; Hoeflich, A.; Fischer, J. R.; Wolf, E.; Sordat, B. & Lahm, H. **Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells.** *Cancer Lett* 151:31-38, 2000
- Schoppman, S. **Tumor associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis.** *Am. J. Pathol.* 161: 947-956, 2002
- Sekulic, A.; Haluska, P., Jr.; Miller, A. J.; Genebriera De Lamo, J.; Ejadi, S.; Pulido, J. S.; Salomao, D. R.; Thorland, E. C.; Vile, R. G.; Swanson, D. L.; Pockaj, B. A.; Laman, S. D.; Pittelkow, M. R. & Markovic, S. N. **Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape.** *Mayo Clin Proc* 83:825-846, 2008
- Serhan, C. N.; Radin, A.; Smolen, J. E.; Korchak, H.; Samuelsson, B. & Weissmann, G. **Leukotriene B4 is a complete secretagogue in human neutrophils: a kinetic analysis.** *Biochem Biophys Res Commun* 107:1006-1012, 1982
- Solinas, G.; Germano, G.; Mantovani, A. & Allavena, P. **Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation.** *J Leukocyte Biology.* 86: 1065-1073, 2009
- Soria, G. & Baruch, B. **The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer.** *Cancer. Lett.* 267: 271-285, 2008
- Steinhilber, D. **5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited.** *Curr Med Chem* 6:71-85, 1999

- Stevens, G.N. **Radiation therapy in locally advanced melanoma.** Teextbook of melanoma. London: Martin Dunitz. 90: 395-403, 2004
- Stolina, M; Sharma, S; Lin, Y; Dohadwala, M; Gardner, B; Luo, J; Zhu, L; Kronenberg, M; Miller, P.W; Portanova, J; Lee, J.C & Dubinett, S.M. **Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis** *J Immunol.* 164:361-370,2000
- Stoppacciaro, A.; Paglia, P.; Lombardi, L.; Parmiani, G.; Baroni, C. & Colombo, M. P. **Genetic modification of a carcinoma with the IL-4 gene increases the influx of dendritic cells relative to other cytokines.** *Eur J Immunol* 27:2375-2382, 1997
- Strome, S. E.; Kawakami, K.; Alejandro, D.; Voss, S.; Kasperbauer, J. L.; Salomao, D.; Chen, L.; Maki, R. A. & Puri, R. K. **Interleukin 4 receptor-directed cytotoxic therapy for human head and neck squamous cell carcinoma in animal models.** *Clin Cancer Res* 8:281-286, 2002
- Swann, J.B.. **Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 652-656, 2008
- Tager, A.M.; Bromley, S.K.; Medoff, B.D.; Islam, S.A.; Bercury, S.D.; Friedrich, E.B.; Carafone, A.D.; Gerszten, R.E. & Luster, A.D. **Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment.** *Nat. Immunol.* 4: 982-990, 2003
- Tager, A. M. and Luster, A. D. **BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:123-134, 2003
- Tahan, F.; Jazrawi, E.; Moodley, T.; Rovati, G. E. & Adcock, I. M. **Montelukast inhibits tumour necrosis factor-alpha-mediated interleukin-8 expression through inhibition of nuclear factor-kappaB p65-associated histone acetyltransferase activity.** *Clin Exp Allergy* 38:805-811, 2008
- Thompson, J.F.; Scoyler, R.A. & Kefford, R.F. **Cutaneous melanoma.** *Lancet.* 365: 687-701, 2005
- Tong,W.G.; Ding, X.Z.; Talamonti, M.S.; Bell, R.H. & Adrian, T.E. **LTB<sub>4</sub> stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways.** *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 335: 949-956, 2005
- Tsuji, M. & DuBois, R.N. **Alterations in celular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2.** *Cell.* 83: 493-501, 1995
- Tsung, K.; Dolan, J.P.; Tsung, Y.L. & Norton, J.A. **Macrophages as effector cells in interleukin 12 induced T cell dependent tumor rejection.** *Cancer. Res.* 62: 5069-5075, 2002
- Volovitz, B.; Welliver, R. C.; De Castro, G.; Krystofik, D. A. & Ogra, P. L. **The release of leukotrienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial virus: role in obstructive airway disease.** *Pediatr Res* 24:504-507, 1988
- Wang, T.; Niu,G.; Kortylewski, M.; Burdelya, L.; Shain, K.; Zhang, S.; Bhattacharya, R.; Gabrilovich, D.; Heller, R. & Coppola, D. **Regulation of the innate and adaptative immune responses by STAT3 signaling in tumor cells.** *Nat. Med.* 10: 48-54, 2004
- Wang, D & DuBois, R. **Eicosanoids and cancer.** *Nat Rev Canc* 10:181-193, 2010.
- Werz, O. **5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1:23-44, 2002
- Werz, O.; Burkert, E.; Samuelsson, B.; Radmark, O. & Steinhilber, D. **Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes.** *Blood* 99:1044-1052, 2002
- Werz, O.; Klemm, J.; Radmark, O. & Samuelsson, B. **p38 MAP kinase mediates stress-induced leukotriene synthesis in a human B-lymphocyte cell line.** *J Leukoc Biol* 70:830-838, 2001

Wikstrom, K.; Juhas, M. & Sjolander, A. **The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage.** *Biochem J* 371:115-124, 2003

Wolf, J. E.; Massof, S. E. & Peters, S. P. **Alterations in murine macrophage arachidonic acid metabolism following ingestion of nonviable *Histoplasma capsulatum*.** *Infect Immun* 60:2559-2564, 1992

Zarini, S.; Gijon, M. A.; Folco, G. & Murphy, R. C. **Effect of arachidonic acid reacylation on leukotriene biosynthesis in human neutrophils stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.** *J Biol Chem* 281:10134-10142, 2006

Zhang, W. P.; Hu, H.; Zhang, L.; Ding, W.; Yao, H. T.; Chen, K. D.; Sheng, W. W.; Chen, Z. & Wei, E. Q. **Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 in human traumatic brain injury and brain tumors.** *Neurosci Lett* 363:247-251, 2004