FELIPE DA COSTA SOUZA

EICOSANOIDES COMO NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DE
GLIOBLASTOMA HUMANO

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun.

Versão corrigida. A versão original eletrônica, se encontra disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo

2017

RESUMO

Souza, FC. Eicosanoides como novos alvos terapêuticos no tratamento de glioblastoma humano. [Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O Glioblastoma (GBM) é um astrocitoma grau IV, representando o glioma de maior malignidade e o tumor cerebral primário mais frequente em humanos. A terapia indicada para o GBM é a ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, todas com baixíssima eficiência devido a agressividade e as características do GBM. Consequentemente, a sobrevida dos pacientes indicados aos tratamentos convencionais é pouco mais de um ano. A inflamação é, sabidamente, uma das características que participa de modo decisivo do desenvolvimento tumoral, incluindo do GBM, e as relações entre mediadores inflamatórios e câncer são alvos de pesquisa nos últimos anos. Diversos estudos apontam um papel da via dos eicosanoides na modulação de processos patológicos envolvidos na inflamação e no câncer. Os eicosanoides são mediadores lipídicos bioativos, envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, em especial os associados à resposta inflamatória. As principais vias de produção de eicosanoides (ciclooxigenases, lipoxigenases, e citocromo P450), assim como seus produtos, são frequentemente alterados em diversos tipos de tumor, associados ao crescimento e a progressão tumoral. Contudo, o perfil dessas vias é consideravelmente pouco compreendido em GBM. O objetivo deste estudo foi analisar in vitro o perfil e o papel das três vias de eicosanoides e seus produtos (eicosanoides ou não) nas linhagens de GBM (U251-MG, U87-MG, A172, T98G e U138-MG), modulando a atividade de enzimas chaves com drogas específicas para, então, analisar parâmetros de proliferação, migração e morte celular. Nossos resultados mostram, em todas as linhagens analisadas, um perfil heterogêneo das enzimas e receptores chaves das três vias. O perfil lipídico evidencia a produção de 13-HODE, produto de 15-lipoxigenase-1 em todas as linhagens, bem como ausência de leucotrienos e 5-HETE do eixo de 5-lipoxigenase. Os inibidores farmacológicos para 15-LOX e 12-LOX/15-LOX foram capazes de reduzir o crescimento, modular o ciclo celular e a migração celular das linhagens U251-MG, U87-MG e A172. O mesmo é visto com a inibição de mPGES-1. A inibição de 5-LOX por outro lado não afetou nenhum parâmetro nas mesmas linhagens. Todos os resultados apontam, portanto, para um papel do eixo de 15-LOX e COX no crescimento e na migração das células de GBM humano.

Palavras-Chaves: Câncer. Glioblastoma. GBM. Ciclooxigenases. Lipoxigenases. CYP450. 15-LOX-1. 13-HODE. Eicosanoides.

Abstract

Souza, FC. Eicosanoids as new therapeutic targets in the treatment of human glioblastoma [Ph.D Thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Glioblastoma (GBM) is a grade IV astrocytoma, the most malignant and the most frequent primary brain tumour in humans. Standard therapies for treating GBM are surgical resection, chemotherapy and radiotherapy, all with low efficiency due to GBM aggressiveness and characteristics. Therefore, patient survival after conventional treatments is about one year. Inflammation is one of the main characteristics that plays a decisive role in tumour development, including in GBM. The relationships between inflammatory mediators and cancer have been the subject of research in recent years. Several studies point to the eicosanoid pathways as modulators of pathological processes between inflammation and cancer. Eicosanoids are bioactive lipid mediators, involved in various physiological and pathological processes, especially those associated with the inflammatory response. The major eicosanoid pathways (cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochrome P450) as well as their products, are frequently altered in several tumours, associated with tumour growth and progression. However, the profile of these pathways is poorly understood in GBM. The objective of this study was to analyse, *in vitro*, the profile and role of eicosanoid pathways and their products (eicosanoids or not) in GBM cell lines (U251-MG, U87-MG, A172, T98G and U138-MG), modulating the key enzymes with inhibitors, analysing proliferation, migration and cell death. Our results show, in all analysed cell lines, a heterogeneous profile for the key enzymes and receptors of the three pathways. The lipid profile shows the production of 13-HODE, a product of 15-lipoxygenase-1, as well the absence of leukotrienes and 5-HETE of the 5-lipoxygenase axis. The pharmacological inhibitors for 15-LOX and 12-LOX / 15-LOX led to changes in cell cycle, reduced growth, reduced migration of U251-MG, U87-MG and A172 cell lines. The same was seen with the inhibition of mPGES-1. Inhibition of 5-LOX, on the other hand, did not affect any of these parameters in the same cell lines. All results, therefore, point to an important role of 15-LOX and COX pathways in the growth and migration of human GBM cells.

Keyword: Cancer. Glioblastoma. GBM. Cyclooxygenase. Lipoxygenases. CYP450. 15-LOX-1. 13-HODE. Eicosanoids.

1 INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença multigênica (multifatorial), caracterizada pelo acúmulo de alterações que conferem às células um conjunto de características e vantagens típicas a todos os tipos de célula tumoral. Hanahan e Weinberg (2000) agruparam as características frequentemente observadas na maioria dos tumores em seis principais grupos de características: (i) auto-suficiência em sinais de crescimento, (ii) ausência de resposta a sinais anti-proliferativos, evasão da apoptose, (iii) potencial de replicação ilimitado, (iv) angiogênese, (v) invasão tecidual e (vi) metástase. Em Hanahan e Weinberg (2011), esse conjunto de características é revisto para a proposição de quatro novos grupos de características: (i) desregulação do metabolismo energético celular, (ii) evasão do sistema imune, (iii) instabilidade genética e (iv) inflamação associada ao desenvolvimento do tumor. Tais características são governadas por uma grande gama de possíveis alterações genéticas, que desregulam os processos normais da célula e conferem as características de uma doença extremamente heterogênea, multifatorial, com grande complexidade etiológica (Olsen, Overvad, 1993).

Em consequência, câncer é um grande problema de saúde pública, e uma das maiores causas de mortalidade em todo mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), apenas em 2012 foram registrados 14 milhões de novos casos em todo o mundo (Ferlay et al. 2013).

1.1 Tumores do SNC

De acordo com o INCA, dentre todos os tumores humanos, os tumores de Sistema Nervoso possuem uma incidência média de 2-3%. Para o ano de 2016 no Brasil, estimam-se 5.440 casos novos de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) em homens e 4.830 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres (Figura 01).

Figura 01 – Estimativa de tumores para 2016 segundo INCA (Exceto tumores de pele-não melanoma).

Apesar da baixa incidência, a contabilização de tumores do sistema nervoso central vem crescendo anualmente. Embora esse aumento seja em grande parte atribuído aos avanços tecnológicos no diagnóstico por imagem e ao consequente aumento no número de tumores diagnosticados, o crescimento da incidência ainda reflete, em números, a importância epidemiológica dos tumores de SNC (Schwartzbaum et al., 2005)

A OMS, em sua classificação recente de 2016, divide os tumores que acometem o SNC em grandes grupos, de acordo com sua origem, características fenotípicas e histopatológicas: 1 – Tumores astrocíticos e oligodendrogliais; 2 – Tumores ependimais; 3 – Outros gliomas, incluindo glioma angiocêntrico e glioma cordoide do terceiro ventrículo; 4 – Tumores do plexo coroide; 5 – Tumores neuronais e neuronais-gliais mistos; 6 – Tumores da região pineal; 7 – Tumores embrionários, incluindo meduloblastomas; 8 – Tumores dos nervos cranianos e paraespinhais; 9 – Meningiomas; 10 – Tumores mesenquimais não-meningiais; 11 – Tumores melanocíticos; 12 – Linfomas; 13 – Tumores histiocíticos; 14 – Tumores de células germinativas; 15 – Tumores da região selar; 16 – Metastáticos (Louis et al., 2016).

Cada um desses grandes grupos possui subdivisões, classificadas em graus de malignidade que vão de I até IV. Até 2007, a classificação em grandes grupos e em graus de malignidade levava em consideração características histológicas e as células de origem, agrupando os tumores de acordo com a morfologia em grupos distintos, independentemente da similaridade ou distinção clínica entre eles (Louis et al., 2007). A classificação proposta em 2016 reorganizou os tumores de SNC para que, além da histologia, considerem-se parâmetros moleculares de diagnóstico e mutações/deleções comuns, formulando-se um novo agrupamento das subdivisões baseado em marcadores moleculares (Louis et al., 2016; Banan et al., 2017). A tabela 01 mostra os principais tumores originados no SNC, acompanhado do grau de malignidade.

Dentre todas as neoplasias que acometem o SNC, aproximadamente 30% são originárias de células da glia ou suas progenitoras (Adamson et al., 2011). Contudo, entre todas as neoplasias malignas do SNC, os tumores de células da glia correspondem a 80% (Schwartzbaum et al., 2006). Estes tumores são coletivamente denominados gliomas, e formam um grupo de características histológicas variadas, com múltiplos graus de malignidade e grande relevância clínica.

Classificação dos principais tumores de Sistema Nervoso Central - 2016			
Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos		Tumor glioneuronal formador de roseta	I
Astrocitoma difuso, IDH-mutante	II	Neurocitoma central	II
Astrocitoma Anaplásico, IDH-mutante	III	Neurocitoma extraventricular	II
Glioblastoma, IDH-selvagem	IV	Liponeurocitoma cerebelar	II
Glioblastoma, IDH-mutante	IV	Tumores da região pineal	
Glioma difuso da linha média, H3 k27M-mutante	IV	Pineocitoma	I
Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q deletado	II	Tumores do parênquima pineal de diferenciação intermediária	II ou III
Oligodendroglioma anaplásico, IDH-mutante e 1p/19q deletado	III	Pineoblastoma	IV
Outros tumores astrocíticos		Tumor papilar da região pineal	II ou III
Astrocitoma pilocítico	I	Tumor embrionário	
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I	Meduloblastoma (Todos os subtipos)	IV
Xantoastrocitoma pleomórfico	II	Tumores embrionários com rosetas em multicamadas, C19MC-alterado	IV
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III	Meduloepitelioma	IV
Tumores ependimais		Tumor embrionário do SNC, NOS	IV
Subependimoma	I	Tumor teratóide/rabdóide atípico	IV
Ependimoma mixopapilar	I	Tumor embrionário do SNC com características rabdóides	IV
Ependimoma, fusão RELN -positiva	II ou III	Tumores dos nervos cranianos e paraespinais	
Ependimoma anaplásico	III	Schwannoma	I
Outros Gliomas		Neurofibroma	I
Glioma angiocêntrico	I	Perineurioma	I
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	II	Tumor maligno de bainha de nervo periférico (TMBNP)	II, III ou IV
Tumores do plexo coroide		Meningiomas	
Papiloma do plexo coroide	I	Meningioma	I
Papiloma do plexo coroide atípico	II	Meningioma atípico	II
Carcinoma do plexo coroide	III	Meningioma anaplásico maligno	III
Tumores neuronais e neuronais-gliais mistos		Tumores mesenquimais não-meningiais	
Tumor neuroepitelial disembranchial	I	Tumor fibroso solitário / Hemangiopericitoma	I, II ou III
Gangliocitoma	I	Hemangioblastoma	I
Ganglioglioma	I	Tumores da região selar	
Ganglioglioma anaplásico	III	Craniofaringioma	I
Gangliocitoma displásico do cerebelo (Lhermitte-Duclos)	I	Tumor de células granulares	I
Astrocitoma e ganglioglioma desmoplásico infantil	I	Pituicitoma	I
Tumor glioneuronal papilar	I	Oncocitoma de células fusiformes	I

Tabela 01 – Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central com seu grau de malignidade de I a IV, com parâmetros moleculares. Adaptado e traduzido da classificação da OMS – 2016.

Os gliomas são classificados por suas características histológicas, de acordo com as células de origem em astrocitoma (diferenciados de astrócitos), oligodendrogliomas (diferenciados de oligodendrócitos) e ependimomas (diferenciados de células ependimárias). Os astrocitomas correspondem a 60-70% de todos os gliomas, e a maior parte dos astrocitomas é classificada pela OMS no grupo dos tumores astrocíticos difusos (Ostrom et al., 2014; Perry, Wesseling, 2016).

Os gliomas difusos, sejam astrocíticos ou oligodendrogliais, caracterizam-se pelo crescimento difuso e altamente invasivo em relação ao parênquima do SNC, formando agregados de células neoplásicas ao redor de neurônios e vasos sanguíneos (Peiffer, Kleihues, 1999; Perry, Wesseling, 2016). Os astrocitomas difusos são classificados por sua malignidade como grau II (Astrocitoma difuso), grau III (Astrocitoma anaplásico) e, por fim, grau IV (Glioblastoma). Os tumores de grau I (Astrocitomas pilocíticos) são lesões com baixo potencial proliferativo e bordas delimitadas, sem potencial infiltrativo do parênquima adjacente, não sendo considerados como astrocitoma difuso (Loius et al., 2007; Louis et al., 2016).

1.2 Glioblastoma

Os astrocitomas difusos de grau IV recebem a denominação de glioblastoma, ou GBM. São os gliomas de maior malignidade, com incidência de aproximadamente 50% entre todos os astrocitomas, representando o tumor cerebral primário mais frequente em humanos. (Thakkar et al., 2014, Morgan et al., 2015). O GBM é caracterizado pelo crescimento difuso e infiltrativo, alta celularidade e capacidade mitótica, necrose, alta proliferação microvascular, com visualização radiológica semelhante às metástases no cérebro e com características de uma lesão inflamatórias (Barnard et al., 1987). Outra característica do glioblastoma é sua alta heterogeneidade histológica e citológica, que justifica seu nome original como glioblastoma “multiforme”. Esta heterogeneidade é também observada em suas características moleculares (Sottoriva et al., 2013; Patel et al., 2014). Embora o GBM ocorra predominantemente no cérebro, é possível, ademais, seu desenvolvimento no tronco encefálico, no cerebelo e na medula espinhal (Davis, 2016).

O GBM também pode ser classificado baseando-se em sua origem e progressão, em GBM primário ou GBM secundário. Os GBM primários, ou *de novo*, desenvolvem-se sem a existência de uma lesão precursora, não possuindo, portanto, um histórico de progressão a partir de lesões de baixo grau. A grande maioria (~90%) dos GBMs são primários, em pacientes na média dos 60 anos e com péssimo prognóstico (Ohgaki, Kleihues, 2007; Wilson et al., 2014). Os GBMs secundários, por sua vez, apresentam evidências de progressão a partir de lesões de menor grau, como o astrocitoma difuso ou o astrocitoma anaplásico, com um histórico clínico de até 10 anos. Correspondem a aproximadamente 5% do total de GBMs, com incidência maior em pacientes mais jovens (~45 anos) em comparação com o GBM primário (Ohgaki et al., 2004; Ohgaki et al., 2007).

Apesar das diferenças em sua origem e desenvolvimento, GBMs primários e secundários são histologicamente indistinguíveis. Diferenças moleculares, contudo, são bem descritas na literatura. Com o aumento dos dados e da compreensão sobre as alterações moleculares comuns em gliomas, com as informações do TCGA (Atlas Genômico do Câncer) foi possível definir subtipos moleculares de GBM e de gliomas de baixo grau nos últimos anos. Foram identificados 4 subgrupos de GBM: proneural, neural, clássico e mesenquimal (Verhaak et al., 2010).

As informações moleculares ajudaram a definir o agrupamento proposto pela OMS em 2016, baseado nas condições dos genes IDH 1 e IDH 2. GBMs secundários são, em sua maioria, do subtipo proneural, enquanto que os GBMs primários podem pertencer a qualquer um dos subtipos. Os tumores proneurais são caracterizados por possuírem mutação em um dos genes IDH, com mais frequência o IDH 1. Como consequência, de 70-80% dos GBMs secundários, gliomas de grau II e grau III, apresentam mutação em IDH1 e/ou IDH2. A caracterização molecular como GBM IDH-selvagem ou GBM IDH-mutado serve, portanto, como indicador de prognóstico do GBM (Figura 02) (Noushmehr et al., 2010; Verhaak et al., 2010; Louis et al., 2016; Ohba et al., 2016).

Figura 02 – Modelo das alterações moleculares na progressão do GBM pela via de novo (primária) e via progressiva (secundária), conforme proposto por Ohgaki et al. (2007) e adaptado com a inclusão do papel das mutações de IDH 1 e IDH2 no desenvolvimento do GBM conforme revisado por Cohen et al. (2013) e Ohba et al. (2016).

A terapia indicada após o diagnóstico do GBM é a ressecção cirúrgica, quimioterapia (temozolamida) e radioterapia. Devido a localização delicada e o grande poder de invasão do parênquima cerebral, a delimitação anatômica e remoção completa da massa tumoral são muito difíceis, acarretando em uma alta taxa de recidiva após a cirurgia. A eficiência de quimioterápicos e da radioterapia é sabidamente limitada no tratamento do GBM, graças à presença da barreira hematoencefálica e da heterogeneidade da massa tumoral. (Schneider et al., 2010; Vauleon E, 2010). Como consequência, uma vez confirmado o diagnóstico de GBM primário ou secundário, a sobrevida dos pacientes indicados aos tratamentos convencionais é pouco mais de um ano, geralmente com redução na qualidade de vida devido a intervenção cirúrgica e aos efeitos da quimio/radioterapia. (Schwartzbaum et al., 2006; Ostrom et al., 2014). Com um péssimo prognóstico e tratamento pouco eficaz, muitos esforços são direcionados para pesquisa de tratamentos mais eficientes,

visando a utilização de drogas que atinjam novos alvos moleculares e que constituam uma alternativa de tratamento ou um tratamento adjuvante à luta contra o câncer (Maher, 2001).

1.3 Eicosanoides

Os eicosanoides são moléculas bioativas de 20 carbonos, derivadas do metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa – *Polyunsaturated fatty acids*, PUFAs –, com papel de modular diversos processos fisiológicos e patológicos, em especial os associados à resposta inflamatória. Muitos eicosanoides são também associados à regulação de processos como proliferação celular, adesão e migração, angiogênese e permeabilidade vascular. Regulando estes processos, os eicosanoides desempenham um papel importante em várias doenças, incluindo na transformação e crescimento tumoral (Nathoo, 2004; Wang, Dubois, 2010). O PUFA predominantemente metabolizado pela via dos eicosanoides é o ácido araquidônico (AA, 20:4), mas outros, como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e o ácido dihomo-gama-linolênico (DHGLA, 20:3) servem de substrato para a síntese de diversas famílias de eicosanoides (Wang, Dubois, 2010). O EPA, após enlogação é convertido em ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5), que sofre alongação e desaturação para Ácido tetracosapentaenoico (TPA 24:6). O TPA então, sofre β -oxidação no peroxissomo para formar ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6). Os produtos de metabolismo do DHA são ácidos graxos oxigenados denominados docosanoides, diferenciados dos eicosanoides por possuírem 22 carbonos (Dennis et al., 2015).

A biossíntese de eicosanoides ocorre, resumidamente, em três etapas gerais (Figura 03): 1 – Formação de ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e outros a partir da subsequente dessaturação e alongamento dos PUFAs essenciais ácido α -linolênico (ALA, 18:3, Ω -3) e ácido linoleico (LA, 18:2, Ω -6). Os PUFAs são predominantemente mantidos na forma esterificada nos fosfolipídios de membranas, onde sua disponibilidade como substrato para síntese de eicosanoides é dramaticamente baixa; 2 – Liberação de PUFAs dos fosfolipídios da membrana plasmática com a quebra da ligação éster, pela ação hidrolítica das enzimas fosfolipases (majoritariamente

fosfolipase A2), disponibilizando AA e EPA livres não esterificados; 3 – Metabolização de PUFA livres em eicosanoides biologicamente ativos, pelas vias enzimáticas das ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e do citocromo p450 (CYP450). (Le Faouder et al., 2013; Li et al., 2013; Szeffel et al., 2015)

Por se tratarem de ácidos graxos essenciais, a obtenção de LA e ALA se dá exclusivamente através da dieta. De modo semelhante, AA, EPA e DHA são obtidos através da dieta ou como produtos do metabolismo de LA e ALA. A taxa de conversão de AA, DHA, e EPA a partir de seus precursores é relativamente lenta, e o LA e o ALA não utilizados desse modo são metabolizados na via de β -oxidação (Gibellini et al., 2010; Szeffel et al., 2015). A obtenção direta de AA, DHA e EPA (ou outros precursores que não LA e ALA) a partir da dieta também modula suas disponibilidades como substratos para síntese de eicosanoides (Wang et al., 2014).

Diversos estudos mostram que o aumento da ingestão de Ω -6 ou Ω -3 altera a disponibilidade de AA (Ω -6) ou EPA e DHA (Ω -3) para síntese de seus metabólitos. Modular a disponibilidade de EPA/DHA versus AA leva à consequente alteração no perfil de produção de eicosanoides. Os eicosanoides produtos do metabolismo de AA são majoritariamente associados a um efeito pró-inflamatório, enquanto os produtos de EPA/DHA são associados a resolução da inflamação (Capdevila, Falck, 2002).

Como já apontado previamente, o AA é o PUFA majoritariamente utilizado para a síntese de eicosanoides. Uma das justificativas para tal apontada na literatura é a composição da “dieta ocidental”, rica em ácidos graxos Ω -6. (Capdevila et al., 2002; Fisher et al., 2014). O aumento na ingestão de EPA e DHA é associado a modulação da resposta inflamatória e na prevenção de diversas doenças, entre elas, o câncer (Ferguson et al., 2007; Russo, 2009; Wang et al., 2010; Fischer et al., 2014;)

Figura 03 – Esquema simplificado da biossíntese de eicosanoides e docosanoides a partir da conversão de ácidos graxos essenciais, em três etapas (destacadas nos quadros no fundo do esquema). Linhas tracejadas representam enzimas e atividade enzimática. Os metabólitos intermediários produtos de enlogases e desaturases foram intencionalmente omitidos. Adaptado de Das (2004) e Szeffel et al., (2015)

1.3.1 Via das Lipoxigenases

As lipoxigenases compõem uma família de enzimas que catalisam a dioxigenação de PUFA's (majoritariamente o ácido araquidônico) como parte da síntese de eicosanoides. As enzimas chaves da via das lipoxigenases são: 5-Lipoxigenase, 12-Lipoxigenase, 15-Lipoxigenase-1 e 15-Lipoxigenase-2. Todas são classificadas e recebem seus nomes baseados na posição do carbono na cadeia do AA onde realizam a oxigenação e formação de um radical hidroperóxido. Deste modo, o metabolismo do AA pela ação de lipoxigenases resulta na formação de um ácido hidroperoxi-eicosatetraenóico (HpETE), com pouca atividade biológica conhecida na literatura. O principal papel conhecido dos HpETEs é, portanto, que sejam precursores para a síntese dos eicosanoides biologicamente ativos, com produtos distintos para cada eixo da via (5-LOX, 12-LOX ou 15-LOX1/2)

Figura 04 – Metabolismo do AA pela via das lipoxigenases. Síntese de leucotrienos, HETES e 13-HODE. Enzimas representadas com linha tracejada.

1.3.1.1 Cascata de 5-Lipoxigenase

O eixo mais caracterizado da via das lipoxigenases é o da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX). A cascata de 5-LOX começa com a inserção de oxigênio molecular e formação de um hidroperóxido no carbono 5 da cadeia do ácido araquidônico, resultando na molécula 5-HpETE (Ácido 5(S)-hidroperoxi-eicosatetraenóico) (Smith, Murphy, 2002). Essa atividade de 5-LOX é dependente da interação com a proteína de membrana FLAP (proteína ativadora de 5-lipoxigenase), sem a qual a interação do ácido araquidônico com a 5-LOX e a síntese de 5-HpETE não ocorre (Evans, 2008). Posteriormente, uma reação de desidratação da 5-HpETE, também catalisada pela 5-LOX, resulta na formação do leucotrieno A₄ (LTA₄), um leucotrieno sem atividade biológica que servirá como precursor dos leucotrienos biologicamente ativos. Sua conversão pela enzima LTA₄ hidrolase (LTA₄H) resulta na síntese de leucotrieno B₄ (LTB₄) enquanto a enzima LTC₄ sintase sintetiza leucotrieno C₄ (LTC₄). O LTC₄, por sua vez, é precursor dos outros membros da família de cisteinil-leucotrieno, LTD₄ e LTE₄. O composto 5-HpETE é também precursor de 5-HETE (Ácido 5-(S)-Hidroxi-6-trans,8,11,14-Cis-Eicosatetraenóico) (Wang, Dubois, 2010; Burnett et al., 2012).

A expressão de 5-LOX e a síntese de seus produtos são normalmente baixas ou ausentes em tecidos normais, sendo expressa em respostas a condições patológicas em células derivadas da medula óssea, como granulócitos, macrófagos, e linfócitos B. (Radmark, Samuelsson, 2007). Os leucotrienos sintetizados pela via possuem um papel importante no processo inflamatório associado a inúmeras doenças, tais como asma alérgica, dermatites, rinite, artrite, aterosclerose, isquemias e no choque séptico (Chari et al., 2001; Peters-Golden et al., 2006; Mathis et al., 2007; Back et al., 2009; Hallstrand et al., 2010).

A relevância do LTB₄ nessas patologias deve-se a seu papel como um dos mais potentes quimiotáticos conhecidos, atuando na adesão de neutrófilos às células endoteliais, aumentando sua migração para sítios de injúria, induzindo sua degranulação e modulando a produção de citocinas e moduladores da dor (Henderson et al., 1994). Todas estas atividades são

desencadeadas pela ligação de LTB₄ a seus receptores específicos acoplados à proteína G: BLT1 e BLT2 (Serhana et al., 2000). Os cisteinil leucotrienos LTC₄ e LTD₄ induzem vasoconstrição, secreção de muco e aumento de permeabilidade vascular ao interagir com seus receptores específicos, CYSLTR1 e CYSLTR2, nas membranas das células endoteliais e de músculo liso (Peters-Golden, Henderson, 2007).

Os mecanismos que controlam a ativação de 5-LOX foram mostrados pela primeira vez por Lepley et al. (1996), que identificaram a presença de 5-LOX fosforilada em neutrófilos ativados, correlacionando a atividade de 5-LOX à sua fosforilação.

A regulação da atividade enzimática de 5-LOX envolve sua interação com FLAP e a translocação de 5-LOX pelos compartimentos celulares. A presença de PUFA (particularmente AA) leva a fosforilação de 5-LOX nos resíduos Ser271, Ser663 e Ser523 pela atividade das quinases MAPKAP2 (Ser271), ERK2 (Ser663) e PKA (Ser523). Após esse estímulo, 5-LOX é translocada para o envelope nuclear. A proteína de membrana FLAP é encontrada no envelope nuclear, e apresenta afinidade por AA. Os mecanismos exatos que regulam a relação entre FLAP e 5-LOX ainda não são completamente compreendidos, mas, uma vez que 5-LOX é ativada e está presente no envelope nuclear, FLAP atua como apresentadora de substrato, disponibilizando o AA captado para a atividade de 5-LOX (Werz et al., 2000; Werz et al., 2002; Werz et al., 2002; Luo et al., 2004).

O outro eicosanoide produto dessa cascata, 5-HETE, apresenta efeitos semelhantes aos leucotrienos em neutrófilos e outros leucócitos, modulando adesão, migração, degranulação. Contudo, pouco se sabe sobre seus receptores específicos (Powell et al., 2015). Diversos trabalhos de Powell et al. detalham um outro papel de 5-HETE como substrato da enzima 5-HEDH (5-Hidrozieicosanoide desidrogenase), resultando na síntese do eicosanoide não clássico Ácido 5-oxo-eicosatetraenoico (5-oxoETE), com um efeito muito mais potente sobre neutrófilos em comparação a 5-HETE (Powell et al., 1992; Powell et al., 1993; Powell et al., 2015).

1.3.1.2 Cascata de 12-Lipoxigenase

Outra enzima responsável pelo metabolismo do AA na via das lipoxigenases é a 12-Lipoxigenase (12-LOX ou 12-lipoxigenase tipo plaquetário). A inserção do grupo hidroperóxido por 12-LOX ocorre no carbono 12 do AA, culminando na síntese de 12-HpETE (Ácido 12-Hidroxiperoxi-5,8,10,14-Eicosatetraenóico). De modo semelhante a 5-HpETE, o 12-HpETE apresenta pouca atividade biológica descrita na literatura, e o principal papel que lhe é atribuído é como precursor da síntese do eicosanoide 12-HETE após sofrer redução.

O nome 12-lipoxigenase tipo plaquetário deve-se à detecção da síntese de 12-HETE em plaquetas em meados da década de 70, e posteriormente caracterizado como um fator de retração endotelial secretado por macrófagos (Goetzl et al. 1980). A enzima 12-LOX é expressa em tipos celulares como músculo liso, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos e células plaquetárias.

Mesmo após décadas de pesquisas, os papéis de 12-LOX e 12-HETE não são tão descritos e estabelecidos quanto o da cascata de 5-LOX. (Porro et al., 2014). Entre os trabalhos na literatura, o papel fisiológico de 12-HETE é associado à permeabilização da circulação linfática, modulação das células do músculo liso e regulação da retração de células endoteliais, estimulando a contração ou o relaxamento de vasos (Miller et al., 2003; Coffey et al., 2004). Adicionalmente, por atuar na agregação plaquetária, 12-HETE por vezes demonstra tanto um papel pró-trombótico quanto antitrombótico (Aharony et al., 1982; Takenaga et al., 1986; Sekiya et al., 1991). Interessantemente, diversos trabalhos associam 12-HETE à modulação de outras vias de eicosanoides, influenciando na liberação de AA dos fosfolípidios de membrana indiretamente pela alteração dos níveis de Ca^{2+} e da atividade de PLA_2 (Aharony et al., 1982; Chang et al., 1985; Coulon et al., 2003).

Semelhantemente a outros HETEs, a atividade de 12-HETE é desencadeada pelo seu reconhecimento por receptores específicos na membrana plasmática. A caracterização de receptores envolvidos na detecção de 12-HETE é consideravelmente reduzida comparada à caracterização dos

receptores de leucotrienos. Contudo, recentemente um receptor específico acoplado à proteína G foi identificado – GPR31 – agora denominado 12-HETE Receptor (12-HETER) (Guo et al., 2011). O reconhecimento de 12-HETE por seu receptor leva à ativação da Proteína quinase C (PKC), ativando o eixo de sinalização PKC ERK 1/2 e modulando a proliferação celular (Szekeres et al., 2000).

A função de 12-HETE como modulador da permeabilidade vascular revela um consequente impacto de sua função em patologias, incluindo o câncer. A liberação de 12-HETE leva à redução da atividade das proteínas de adesão E-caderina e induz a migração de células endoteliais dos vasos linfáticos, culminando na permeabilização dos vasos linfáticos (Vonach et al., 2011). O mesmo processo é responsável pelo aumento da permeabilidade da barreira vascular em células endoteliais (Rigby et al., 2015). De fato, 12-HETE atua como um potente indutor e um fator fundamental para a migração de neutrófilos através da barreira endotelial, papel que exerce modulando vias de sinalização de RHOA e a expressão de moléculas de adesão (Wculek, Malanchi, 2015; Nguyen et al., 2016).

Esse papel na permeabilização vascular é associado como responsável por facilitar a transmigração de células tumorais pela parede de vasos e facilitar o processo de metástase, relacionando 12-HETE ao processo de metástase em diversos tumores humanos, como mama, cólon e pulmão (Uchide et al., 2007; Klampfl et al., 2012, Senfter et al., 2015). A secreção de 12-HETE é, portanto, associada a um pior prognóstico, e correlacionada à metástase em linfonodos e em órgãos distantes (Kerjaschki et al., 2011)

1.3.1.3 Cascata de 15-Lipoxigenase-1 e 15-Lipoxigenase-2

As 15-lipoxigenases compõem uma subfamília dentro das lipoxigenases, composta por duas enzimas distintas, com propriedades particulares quando comparadas às outras lipoxigenases.

A 15-Lipoxigenase-1 (15-LOX-1, 15-Lipoxigenase tipo 1, também chamada de 15-LOX tipo-reticulócito), inicialmente identificada em reticulócitos de coelho, tem sido caracterizada na literatura em relação às suas propriedades enzimáticas e diferentes afinidades por substratos (KUHN et al., 2002). É principalmente expressa em eosinófilos, reticulócitos e no epitélio do trato respiratório. Seu nome, como em todas as lipoxigenases, deve-se a inserção de oxigênio molecular para formação de um radical hidroperóxido no carbono 15 do AA, sintetizando de 15-HpETE (ácido 15(S)-hidroperoxi-eicosatetraenóico) que posteriormente será reduzido para 15-HETE (ácido 15(S)-hidrozxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenóico. Além de 15-HETE, a 15-LOX-1 apresenta capacidade de inserir oxigênio molecular no carbono 12 do AA, sintetizando 12-HpETE e 12-HETE. (Smith, Murphy, 2002; Haeggström, Funk, 2011).

Apesar da capacidade de metabolizar AA, o principal substrato da 15-LOX-1 é o ácido linoleico (LA). A inserção do radical hidroperóxido no carbono 13 do LA resulta na formação de 13-HpODE, posteriormente reduzido para 13-HODE (Ácido 13-hidroxi-octadecadienóico). A inserção no carbono 9 leva a síntese de 9-HpODE e 9-HODE. Ambos os HODEs são ácidos graxos monohidroxidos de 18 carbonos, não classificados como eicosanoide (Conrad, 1999). O principal produto do metabolismo de PUFA sintetizado por 15-LOX-1 é o 13-HODE, sendo 9-HODE, 15-HETE (e mais ainda o 12-HETE), menos significativos. Além dessas atividades, a 15-LOX-1 está envolvida na síntese de mediadores envolvidos na resolução da inflamação, com potente efeito anti-inflamatório: lipoxinas (a partir do AA), resolvinas da série E (a partir do metabolismo de EPA) e 17-HDHA (ácido 17-hidroxi-docosahexaenoico) precursor das resolvinas da série D (a partir do metabolismo de DHA) (Brash et al., 1997; Serhan et al., 2005; Serhan et al., 2007; Comba et al., 2011).

A 15-LOX-2 por outro lado realiza a formação de 15-HETE a partir do AA como seu substrato principal, interagindo muito pouco com o ácido linoleico (Brash, 1997).

A atividade da cascata de 15-LOX pode ser estimulada por interleucinas pró ou anti-inflamatórias, correlacionando ambas 15-LOX1 e 15-LOX-2 à regulação de muitos processos patológicos associados à inflamações crônicas, como asma, aterosclerose, falha do miocárdio, resistência à insulina em adipócitos e câncer (Wittwer, Hersberger, 2007; Andersson et al., 2008; Chakrabarti et al., 2009).

Devido à possíveis relações entre 15-LOX-1 e seus múltiplos substratos, e a variabilidade de seus produtos, a atividade de 15-LOX-1 é descrita e estudada em diversos processos patológicos. Consistente com sua preferência por metabolizar LA em HODEs, além do metabolismo de EPA e DHA, muitos estudos correlacionam a atividade de 15-LOX-1 a um efeito protetor em modelos de doenças inflamatórias. A deleção de 15-LOX-1 é descrita como causa da exacerbação do quadro inflamatório em aterosclerose, encefalomielite alérgica, neovascularização inflamatória, asma e osteoartrite (Serhan et al., 2003; Emerson et al., 2004; Merched et al., 2008; Habouri et al., 2017;).

O efeito fisiológico de 15-HETE na literatura tem sido descrito como um potente indutor da angiogênese. Zhang et al. (2005) constataram que a migração e formação de tubos de células endoteliais *in vitro*, assim como a angiogênese *in vivo* após estímulo com 15-HETE é dependente da ativação da via PI3K-AKT-mTOR, revelando indícios de quais mecanismos estão envolvidos nos efeitos de 15-HETE. Contudo, os mecanismos envolvidos nessa resposta pró-angiogênese não estão completamente elucidados.

Wang et al., 2016 demonstraram o papel funcional da cascata de 15-LOX e da produção 15-HETE como indutor da angiogênese em camundongos pós acidente vascular encefálico, atuando diretamente sobre a migração e proliferação de células endoteliais. Esses dados confirmaram resultados de trabalhos anteriores disponíveis na literatura, mostrando altos níveis de 15-HETE induzidos pela hipóxia pós isquemia no tecido nervoso (Hayashi et al.,

2003; Jiang et al., 2005; Slevin et al., 2006). Outros trabalhos mostram 15-HETE também relacionado a angiogênese em tecido adiposo e no estroma pulmonar como resposta à hipóxia (Cao et al., 2007; Zhu et al., 2010; Ma et al., 2011; Liu et al., 2012)

1.3.2 Via das Ciclooxygenases

As ciclooxigenases (COX) ou prostaglandina-endoperóxido sintase (PTGS-1) ou prostaglandina G/H sintetase são uma família de enzimas com papel chave na via das ciclooxigenases, responsáveis por converter o AA em eicosanoides da classe dos prostanóides: prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) (Wang, Dubois, 2010).

A família das ciclooxigenases é formada por três enzimas distintas: ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2) e ciclooxigenase-3 (COX-3), que juntas compõem a via mais caracterizada de eicosanoides.

A primeira menção a prostaglandinas na literatura foi por von Euler 1936, que identificou no fluido seminal humano substâncias “ácidas lipossolúveis com capacidade de induzir contração em células de músculo liso, regulando a pressão arterial. O nome prostaglandina deve-se à sua identificação no fluido seminal, e refere-se à interpretação destes compostos lipídicos como substâncias originários da próstata. Quarenta anos depois, a enzima COX-1 foi isolada em 1976 por Hemler e Lands a partir da vesícula seminal de ovelhas.

COX-1 é uma isoforma constitutivamente expressa na maioria dos tecidos corporais, responsável pela produção de prostaglandinas para regulação de funções fisiológicas no sistema reprodutor, no sistema nervoso, no vaso constrição, dilatação e agregação plaquetária (regulando a homeostasia do sistema cardiocirculatório e renal) e atuando na proteção da mucosa gastrointestinal (Harris et al., 1994; Botting et al., 2005).

A COX-2 é considerada a isoforma induzível da via de COX, induzida por estímulos pró-inflamatórios. Sua expressão é encontrada baixa na maior parte dos tecidos, e o aumento de sua atividade é correlacionado ao pico dos níveis de prostanoides em quadros inflamatórios (Botting et al., 2005). A COX-3 é uma isoforma recentemente identificada e menos caracterizada que suas

contrapartes, expressa pelo splicing alternativo do gene de COX-1. Sua atividade é pouco implicada às funções fisiológicas atribuídas a COX-1 ou a COX-2 (Botting et al., 2003; Wang et al., 2006; Wang et al., 2010).

As enzimas COX apresentam duas atividades enzimáticas distintas, complementares para a síntese de prostanoídes. Primeiro, sua atividade como oxigenase metaboliza o AA para formar PGG₂ (prostaglandina G₂), que é rapidamente convertida para PGH₂ pela adição de um radical hidróperóxido, também por ação de COX. (Smith et al., 2002)

A PGH₂ é um composto instável, e uma vez sintetizada serve de precursor para a síntese de diferentes prostaglandinas pela ação de sintases de prostaglandina específicas.

Figura 05 – Metabolismo do AA pela via das ciclooxigenases. Diferentes sintases de prostaglandina e a síntese de sua prostaglandina específica. Enzimas representadas com linha tracejada.

1.3.2.1 mPGES-1 e Prostaglandina E2

Pela atividade das sintases específicas, o metabolismo de AA pela via de COX resulta na síntese de prostaglandinas, eicosanoides com 20 carbonos, formando uma cadeia linear e um anel de 5 carbonos. Uma vez sintetizadas, prostaglandinas como PGE₂, PGF₂α, PGD₂ e PGI₂ são então secretadas para o meio extracelular por proteínas de membrana da família das proteínas de resistência à múltiplas drogas (MDRs) (Reid et al., 2003). No meio extracelular realizam seu papel de sinalização por via autócrina ou parácrina, através do seu reconhecimento por receptores acoplados à proteína G específicos na membrana plasmática, responsáveis pela sinalização dos efeitos biológicos das prostaglandinas. Cada prostaglandina tem seu conjunto de receptores específicos de membrana (Narumiya et al., 2001; Smith et al., 2002)

Dentre as prostaglandinas, PGE₂ é o produto mais abundante do metabolismo do AA por ciclooxigenases. Durante as fases iniciais da resposta inflamatória, PGE₂ atua como vasodilatador, facilitando a chegada de neutrófilos, outros leucócitos, macrófagos e mastócitos aos sítios de injúria e infecção. Como facilitador da migração de células do sistema imunológico, PGE₂ é também associado à resposta imune humoral. Outro efeito de PGE₂ é estimular nervos sensoriais, aumentando a sensibilidade à dor. (Wallace et al., 2001; Kojuma et al., 2008; Hara et al., 2010). O papel de PGE₂ é associado na literatura ao quadro inflamatório de diversas patologias, como artrite reumatoide, osteoartrite, resposta alérgica, inflamação pós injúria tecidual e câncer (McCoy et al., 2002; Wendell et al., 2014; Peinhaupt et al., 2017).

A etapa final da via de COX, responsável pela síntese é PGE₂, é a conversão de PGH pelas sintases de prostaglandina E₂ (PGES). Três isoformas de PGES são conhecidas. Uma citosólica, denominada cPGES, constitutivamente expressa na maior parte dos tecidos e associada principalmente ao papel de COX-1 em suas funções fisiológicas. As outras duas são encontradas na fração microssomal, recebendo os nomes de mPGES-1 e mPGES-2. Semelhante a cPGES, a mPGES-2 é constitutiva, presente na maior parte dos tecidos, associada a atividade constitutiva de COX-1 (Murakami et al., 2003). A mPGES-1, por outro lado, tem expressão

induzida por citocinas e fatores de crescimento, associada a atividade induzível e específica de COX-2 em resposta a estímulo em diversos quadros patológicos (Murakami et al., 2003; Gudis et al., 2005. Gudis et al., 2007).

Dada a relevância clínica da via de COX, o uso de drogas capazes de interferir na produção de PGE₂ é uma estratégia recorrente no tratamento da inflamação. Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) compõem uma classe de fármacos amplamente comercializados, que interferem com a atividade de COX-1 e/ou COX-2, reduzindo quadros inflamatórios, febre e dor principalmente pela redução dos níveis de PGE₂ (Bally et al., 2017). Contudo, o uso prolongado da maioria dos AINEs apresenta efeitos colaterais em decorrência da inibição de ambas COX-1 e COX-2, interferindo em suas funções fisiológicas na manutenção da homeostase tecidual. Os efeitos colaterais incluem úlceras e sangramento gastrointestinal, hipertensão e edema renal (Johnson et al., 1994; Traversa et al., 1995).

Bally et al. (2017), em uma recente meta análise computacional com 446 763 indivíduos concluiu que o uso contínuo de AINEs por tempo prolongado, particularmente em idosos, está correlacionado ao aumento do risco de infarto do miocárdio.

Os efeitos deletérios do uso prolongado de AINEs são associados a inibição de COX-1, constitutivamente expressa nos tecidos mais afetados (Smith et al., 2001). Os efeitos anti-inflamatórios que justificam o uso de AINES são associados à inibição da COX-2 induzida nos locais de injúria. O desenvolvimento e uso de inibidores específicos para COX-2, como o AINE celocoxib, mostrou-se capaz de induzir o efeito anti-inflamatório dos AINES inespecíficos, mas com uma redução nos efeitos colaterais. (Marnett et al., 1999; Patrono et al., 2001). Outra estratégia para contornar os efeitos deletérios da inibição de COX, é o uso de inibidores específicos para PGESs, em particular mPGES-1 dada a sua associação com COX-2. O uso de inibidores de mPGES-1 leva à redução nos níveis de PGE₂ sem comprometer a síntese de outros produtos da via de COX e com ainda menos efeitos colaterais quando comparado com o uso de inibidores de COX-2 (Wang et al., 2008)

1.3.3 Via do Citocromo P450

As enzimas do Citocromo P450 compõem uma grande família, com um grande número de isoformas já descritas, divididas em dois grupos distintos: Ω -hidroxilases e epoxigenases.

As Ω -hidroxilases metabolizam o AA para produção de HETEs. As principais famílias de Ω -hidroxilases são a CYP4A e a CYP4F, sendo a CYP4A responsável pela maior parte da produção de 20-HETE (ácido 20-Hidroxi-5,8,11,14-eicosatetraenóico), que, por sua vez, é o principal produto das Ω -hidroxilases (Yu et al., 2011). Entre as funções de 20-HETE pode-se destacar a ação no estímulo da proliferação de células epiteliais, células mesangiais, fibroblasto, músculo liso da parede dos vasos, além de importante mediador do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Um dos efeitos mais bem descritos de 20-HETE é seu papel como vasoconstritor, inibindo canais de potássio sensíveis a cálcio, regulando a pressão arterial e induzindo quadros de hipertensão em modelo animal (Rahman et al., 1997; Stec et al., 1997; Powell et al., 1998)

Estudos recentes relatam a ação de 20-HETE no crescimento celular e desenvolvimento de tumores. Isso aponta para um possível efeito promotor de tumores por parte de CYP4A e/ou CYP4F (Alexanian et al., 2012).

As epoxigenases são representadas principalmente pela CYP2C e CYP2J, responsáveis por metabolizar o AA para produção de ácido epoxieicosatetraenóico (EETs), que podem ainda ser metabolizado para ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs). (Panigrahy et al., 2010). Os principais EETs produtos do metabolismo por epoxigenases são 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; e 14,15-EET. As enzimas epoxigenases são encontradas expressas em células diversas como endoteliais, células de músculo liso associado a vasos, astrócitos e cardiomiócitos. Os efeitos EETs são amplamente descritos em células endoteliais e na musculatura lisa, atuando no sistema vascular regulando a pressão e o fluxo arterial de modo semelhante a 20-HETE. No entanto, EETs atuam como potentes vasodilatadores, influenciando na contração de células de musculo liso também ao modular a atividade de canais de K⁺ sensíveis a Ca⁺. Adicionalmente, EETs são mediadores da resposta

proliferativa induzida por EGF, influenciando na proliferação de células endoteliais e atuando como fatores angiogênicos pela ativação da via de PKC e vias de MAPK. (Chen et al., 1999; Xu et al., 2011)

Figura 06 – Metabolismo do AA pela via do CYP450. Enzimas representadas com linha tracejada.

1.4 Eicosanoides e câncer

Conforme revisado por Hanahan e Weinberg (2011), a inflamação associada ao desenvolvimento do câncer é considerada uma das vantagens adquiridas pela célula tumoral, conferindo vantagem proliferativa e de sobrevivência. A inflamação participa de modo decisivo de diferentes etapas do desenvolvimento tumoral: no início, na promoção, na invasão e na metástase (Coussens et al., 2002). As relações entre mediadores envolvidos na resposta inflamatória do câncer são alvos de pesquisa nos últimos anos, caracterizando o perfil de vias de sinalização envolvidas com a inflamação, a partir da célula tumoral ou das células não cancerosas no estroma tumoral.

O metabolismo de PUFA's, majoritariamente do AA, tem um papel crucial como mediadores da resposta inflamatória. O uso prolongado de inibidores de COX, como AINEs, está relacionado com a redução no desenvolvimento de tumores, incluindo gastrointestinal, mama, cólon, próstata e pulmão (Harris et al., 2009; Wang, Dubois, 2010; Cao Y. Et al., 2016).

Entre os prostanoídes, PGE₂ é a prostaglandina mais abundante, associada ao pior prognóstico da doença. A via de COX é a mais estudada dentre as vias de eicosanoídes, e a expressão elevada de COX-1, e principalmente COX-2, é observada em diversos tumores humanos como pulmão, ovário, pâncreas, mama, próstata e esôfago (Rigas et al., 1993; Wang et al., 2004; Hambek et al., 2007). As enzimas PGESs, (particularmente mPGES1) são encontradas alteradas em diversos tumores humanos, e o uso de inibidores específicos para mPGES-1 é uma estratégia para redução dos níveis de PGE₂, sem os efeitos colaterais do uso prolongado de AINEs (Rådmark, Samuelsson, 2010).

Recentemente, Gomes e Colquhoun (2012) em um trabalho realizado com a linhagem de GBM humano T98-G, confirmaram a relevância da via de COX em glioblastoma. A inibição da atividade de COX com o anti-inflamatório Ibuprofeno (um AINE) levou a uma redução na proliferação celular, redução da migração e aumento da indução de apoptose. Estes efeitos foram revertidos pela adição de exógena de PGE₂, indicando que os resultados observados são decorrentes da alteração dos níveis de PGE₂.

De modo semelhante a via de COX, as lipoxigenases também são implicadas ao desenvolvimento de tumores, de acordo com a literatura.

A expressão da 5-LOX e 12-LOX tipo plaquetário, e a síntese de seus produtos é normalmente baixa ou ausente em tecidos normais, sendo expressa apenas em condições patológicas. Ambos são encontrados constitutivamente ativos em diversos tipos de tumor, como colo, próstata, mama e pulmão. (Gao et al., 1995, Nie et al., 1998; Jiang et al., 2003; Chen et al., 2004). Como consequência da superexpressão de 5-LOX, a superprodução de LTB₄, assim como dos cisteinil-leucotrieno LTC₄, LTD₄ e LTE₄, é encontrada em diversos tipos de tumor, fato que se correlaciona à superexpressão de seus receptores (CYSLTR1 e CYSLTR2) também em células tumorais (Hennig et al., 2002; Ohd et al., 2003; Capra, 2004; Matsuyama et al., 2007).

A produção de 12-HETE, tanto pela atividade de 12-LOX quanto de 15-LOX-1, é encontrada em tumores, estimulando a migração e a invasão (Kerjaschki et al., 2011). A expressão de 12-LOX propriamente dita é

encontrada elevada em diversos tipos de tumor, como colo, próstata, mama e pulmão, sendo associada ao aumento da proliferação e da progressão tumoral e a um pior prognóstico. (Gao et al., 1995, Nie et al., 1998; Jiang et al., 2003).

O papel da cascata de 15-LOX em câncer é alvo de discussão na literatura. 15-LOX-1 apresenta expressão reduzida ou ausente em diversos tumores humanos. A redução nos níveis de 13-HODE em decorrência da baixa atividade de 15-LOX-1 é associada com pior prognóstico, colaborando com a progressão tumoral em tumores de pulmão, colorretal e mama. Alguns trabalhos na literatura, contudo, apresentam dados contrários em outros tipos de tumores humanos, atribuindo a 13-HODE um papel pró-tumoral. (Nixon et al., 2004; Jiang et al., 2006; Hennig et al., 2007; Yuan et al., 2010).

De todas as vias de eicosanoides, a via do CYP450 é a menos descrita e caracterizada em câncer. Os HETEs e EETS derivados do metabolismo do AA, em particular por seu papel na proliferação celular e como indutores da angiogênese apresentam potencial tumorigênico e metastático. O uso de inibidores farmacológicos de CYP2J2 apresenta potencial anti-tumoral *in vivo* e *in vitro*, pela redução na produção de EETs pela célula tumoral (Chen et al., 2009). Guo et al. (2008), induziram a expressão de CYP4A1 na linhagem de GBM humano, U251-MG, mostrando um aumento na proliferação celular e aumento da produção de 20-HETE. O tratamento exógeno com 20-HETE na concentração de 10 μ M da mesma linhagem levou ao mesmo resultado.

Parte da dificuldade de se obter informações sobre a via do CYP450 em tumores é a grande quantidade de enzimas que formam as famílias Ω -hidroxilases e epoxigenases, dificultando a comparação entre dados da expressão de múltiplas isoformas. Contudo, diversos trabalhos mostram o aumento na expressão de enzimas de ambas as famílias em pacientes com tumores de mama, colorretal e osteosarcoma, definindo um perfil claro de associação entre a ativação da via do CYP450 e um pior prognóstico (Dhaini et al., 2003; Kumarakulasingham et al., 2005; Downie et al., 2005; Murray et al., 2010).

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho mostram, através do uso de inibidores de lipoxigenases e mPGES-1, e da confirmação do perfil lipídico obtido por LC-ESI/MSMS, a importância da biossíntese de eicosanoides na migração, proliferação e morte das linhagens de GBM humano U251-MG, U87-MG e A172.

- i) A quantificação de mRNAs por PCR em tempo real, nas linhagens U251-MG, U87-MG, U138-MG, T98G e A172, revela perfis heterogêneos dos principais componentes envolvidos na biossíntese e sinalização por eicosanoides: 5-LOX; 12-LOX; 15-LOX-1; 15-LOX-2; FLAP; LTA4H; LTC4S; CYP4A11, BLT1; BLT2; CYSLTR1; CYSLTR2, PPAR alfa; PPAR Beta/delta; PPAR gama.
- ii) O perfil heterogêneo na produção de RvD₂, RvD₁, LXA₄, RvE₁, LTD₄, LTE₄, LTB₄, 15-HEPE, 8-HEPE, 12-HEPE, 9-HEPE, 5-HEPE, 13-HODE, 9-HODE, 15-HETE, 17-HDHA, 11-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 9-HETE, 5-HETE) nas linhagens U251-MG, U87-MG, U138-MG, T98G e A172, revelado por LC-ESI/MSMS, complementa os dados obtidos por PCR em tempo real, apontando quais as vias de biossíntese são potencialmente relevantes nas diferentes linhagens de GBM humano.
- iii) A ausência de efeito significativo com a inibição farmacológica do eixo de 5-LOX nas linhagens U251-MG, U87-MG e A172, em conjunto com os perfis por PCR em tempo real e LC-ESI/MSMS, mostram que, *in vitro*, nas condições analisadas, a biossíntese e sinalização autócrina de leucotrienos e 5-HETE não é relevante para o comportamento das linhagens de GBM humano.
- iv) Os inibidores farmacológicos do eixo de 15-LOX (Luteolin e NDGA) levaram à uma redução no número de células e uma redução na migração celular nas linhagens U251-MG, U87-MG e A172. Os resultados por citometria de fluxo apontam para alterações nas fases do ciclo celular, parada do ciclo celular em G2/M, e ausência de morte celular por apoptose.

- v) Conclui-se que o metabolismo de LA e o eixo de 15-LOX desempenham um papel importante nas células de GBM *in vitro*, com base nos resultados dos tratamentos de Luteolin e NDGA, bem como nos elevados níveis de 13-HODE em todas as linhagens de GBM analisadas. A presença de 13-HODE aponta para a atividade de 15-LOX-1 nesse contexto.
- vi) Os inibidores farmacológicos de mPGES-1 (CAY10678 e CAY10526), levaram a uma redução no número de células e uma redução na migração celular após os tratamentos nas linhagens U251-MG, U87-MG e A172. Nas linhagens U87-MG e A172, os tratamentos levaram a um aumento da apoptose. Esses dados apontam para a relevância de PGE₂, concluindo-se que a inibição farmacológica de mPGES-1 foi capaz de reduzir o crescimento e a migração celular, além de induzir a morte celular nas linhagens analisadas.

Com base nos resultados conclui-se, portanto, que o eixo das 15-lipoxigenases (notavelmente 15-LOX-1) é de particular interesse em células de GBM humano. Os níveis elevados de 13-HODE e os resultados obtidos com inibidores farmacológicos de 15-LOXs, destacam o eixo como um potencial alvo terapêutico, bem como um interessante alvo de estudos. De modo geral, a atividade autócrina do eixo de 5-LOX não é relevante, *in vitro*, nas células de GBM humano. Contudo, com base no perfil de mRNA dos receptores de leucotrienos, juntamente com os dados na literatura sobre 5-LOX no microambiente tumoral, sugere-se aqui que a sinalização parácrina do eixo de 5-LOX apresenta-se como um potencial alvo para estudos futuros em GBM humano. Por fim, os tratamentos com os inibidores de mPGES-1 mostram que a modulação da via de PGE₂ *downstream* a COX é capaz de afetar a proliferação, migração e morte celular em células tumorais de GBM humano.

REFERÊNCIAS*

Aharony D, Smith JB, Silver MJ. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Oct 8;718(2):193-200.

Aharony D, Smith JB, Silver MJ. Regulation of arachidonate-induced platelet aggregation by the lipoxygenase product, 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Oct 8;718(2):193-200.

Avis IM, Jett M, Boyle T, Vos MD, Moody T, Treston AM, Martínez A, Mulshine JL. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. *J Clin Invest*. 1996 Feb 1;97(3):806-13.

Back M. Leukotriene signaling in atherosclerosis and ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23:41-48.

Bally M, Dendukuri N, Rich B, Nadeau L, Helin-Salmivaara A, Garbe E, Brophy JM. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. *BMJ*. 2017 May 9;357:j1909. doi: 10.1136/bmj.j1909.

Banan R, Hartmann C. The new WHO 2016 classification of brain tumors-what neurosurgeons need to know. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017 Mar;159(3):403-418. doi: 10.1007/s00701-016-3062-3. Epub 2017 Jan 17.

Barnard RO, Geddes JF. The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer*. 1987 Oct 1;60(7):1519-31.

Baryawno N, Sveinbjornsson B, Eksborg S, et al. Tumor-growth-promoting cyclooxygenase-2 prostaglandin E2 pathway provides medulloblastoma therapeutic targets. *Neuro Oncol*. 2008; 10(5):661–674.

Botting R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res*. 2003 Jun 15;110(5-6):269-72.

Botting RM. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). *J Ther Bio*. 2005;31:208–219

Brash A R, Boeglin W E, Chang M S. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997, 94(12), 6148–6152.

Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6148-52.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Burnett BP, Levy RM. 5-Lipoxygenase metabolic contributions to NSAID-induced organ toxicity. *Adv Ther.* 2012 Feb;29(2):79-98. doi: 10.1007/s12325-011-0100-7. Epub 2012 Feb 7.

Cao Y, Nishihara R, Wu K, Wang M, Ogino S, Willett WC, Spiegelman D, Fuchs CS, Giovannucci EL, Chan AT. The Population Impact of Long-term Use of Aspirin and Risk of Cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Jun 1; 2(6): 762–769.

Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2362-8.

Capdevila JH, Falck JR. Biochemical and molecular properties of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68-69:325-44.

Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res.* 2004 Jul;50(1):1-11.

Chakrabarti SK, Cole BK, Wen Y, Keller SR, Nadler JL. 12/15-lipoxygenase products induce inflammation and impair insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring).* 2009 Sep;17(9):1657-63. doi: 10.1038/oby.2009.192. Epub 2009 Jun 11.

Chang J, Blazek E, Kreft AF, Lewis AJ. Inhibition of platelet and neutrophil phospholipase A2 by hydroxyeicosatetraenoic acids (HETES). A novel pharmacological mechanism for regulating free fatty acid release. *Biochem Pharmacol.* 1985 May 1;34(9):1571-5.

Chang J, Jiang L, Wang Y, Yao B1, Yang S, Zhang B, Zhang MZ. 12/15 Lipoxygenase regulation of colorectal tumorigenesis is determined by the relative tumor levels of its metabolite 12-HETE and 13-HODE in animal models. *Oncotarget.* 2015 Feb 20;6(5):2879-88.

Chari S, Clark-Loeser L, Shupack J, Washenik K. A role for leukotriene antagonists in atopic dermatitis? *Am J Clin Dermatol.* 2001;2:1-6.

Che XH, Chen CL, Ye XL, Weng GB, Guo XZ, Yu WY, Tao J, Chen YC1, Chen X. Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. *Oncol Rep.* 2016 Mar;35(3):1680-8.

Chen C, Li G, Liao W, Wu J, Liu L, Ma D, Zhou J, Elbekai RH, Edin ML, Zeldin DC, Wang DW. Selective inhibitors of CYP2J2 related to terfenadine exhibit strong activity against human cancers in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Jun;329(3):908-18. doi: 10.1124/jpet.109.152017. Epub 2009 Mar 16.

Chen JK, Wang DW, Falck JR, Capdevila J, Harris RC. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):4764-9.

Cheng WY, Chiao MT, Liang YJ, Yang YC, Shen CC, Yang CY. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through

downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Mol Biol Rep.* 2013 Sep;40(9):5315-26.

Coffey MJ, Jarvis GE, Gibbins JM, Coles B, Barrett NE, Wylie OR, O'Donnell VB. Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circ Res.* 2004 Jun 25;94(12):1598-605. Epub 2004 May 13.

Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013 May;13(5):345. doi: 10.1007/s11910-013-0345-4.

Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME, Pasqualini ME. Basic Aspects of Tumor Cell Fatty Acid-Regulated Signaling and Transcription Factors. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Dec; 30(3-4): 325–342.

Coulon L, Calzada C, Moulin P, Véricel E, Lagarde M. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 cascade in hydroperoxide-stressed platelets. *Free Radic Biol Med.* 2003 Sep 15;35(6):616-25.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016 Oct 1; 20(5): S2–S8.

Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015 Aug;15(8):511-23. doi: 10.1038/nri3859. Epub 2015 Jul 3.

Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, Johnson TD, Biermann JS, Leu K, Hollenberg PF, Baker LH. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2003 Jul 1;21(13):2481-5.

Downie D, McFadyen MC, Rooney PH, Cruickshank ME, Parkin DE, Miller ID, Telfer C, Melvin WT, Murray GI. Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 15;11(20):7369-75.

Ellis HP, Kurian KM. Biological Rationale for the Use of PPAR γ Agonists in Glioblastoma. *Oncol.* 2014; 4: 52.

Emerson MR, LeVine SM. Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15- lipoxygenase or 5-lipoxygenase. *Brain Res* 2004;1021:140e5.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Fact sheet: World Health Organization. February 2017

Ferguson LR, Philpott M. Cancer prevention by dietary bioactive components that target the immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7(5):459–64. [PubMed: 17691905]

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11

Fiorucci S, Meli R, Bucci M, Cirino G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol*. 2001 Dec 1;62(11):1433-8.

Fischer R, Konkel A, Mehling H, Blossey K, Gapelyuk A, Wessel N, von Schacky C, Dechend R, Muller DN, Rothe M, Luft FC, Weylandt K, Schunck WH. Dietary omega-3 fatty acids modulate the eicosanoid profile in man primarily via the CYP-epoxygenase pathway. *J Lipid Res*. 2014 Jun;55(6):1150-64. doi: 10.1194/jlr.M047357. Epub 2014 Mar 16.

Fukui M, Kang KS, Okada K, Zhu BT. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. *J Cell Biochem*. 2013 Jan;114(1):192-203. doi: 10.1002/jcb.24354.

Gao P, Zhai F, Guan L, Zheng J. Nordihydroguaiaretic acid inhibits growth of cervical cancer SiHa cells by up-regulating p21. *Oncol Lett*. 2011 Jan;2(1):123-128. Epub 2010 Nov 10.

Gao X, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology*. 1995 Aug;46(2):227-37.

Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010 Jun;62(6):414-28. doi: 10.1002/iub.337.

Goetzl EJ, Brash AR, Tauber AI, Oates JA, Hubbard WC. Modulation of human neutrophil function by monohydroxy-eicosatetraenoic acids. *Immunology*. 1980 Apr;39(4):491-501.

Gomes RN, Colquhoun A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids Health Dis*. 2012; 11: 171.

Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, et al. Clinical significance of prostaglandin E synthase expression in gastric cancer tissue. *Hum Pathol*. 2007; 38(12):1826–1835. [PubMed: 17868774]

Gudis K, Tatsuguchi A, Wada K, Futagami S, Nagata K, Hiratsuka T, Shinji Y, Miyake K, Tsukui T, Fukuda Y, Sakamoto C. Microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1, mPGES-2 and cytosolic PGES expression in human gastritis and gastric ulcer tissue. *Lab Invest*. 2005 Feb;85(2):225-36.

Guo AM, Sheng J, Scicli GM, Arbab AS, Lehman NL, Edwards PA, Falck JR, Roman RJ, Scicli AG. Expression of CYP4A1 in U251 human glioma cell

induces hyperproliferative phenotype in vitro and rapidly growing tumors in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Oct;327(1):10-9. doi: 10.1124/jpet.108.140889. Epub 2008 Jun 30.

Guo Y, Zhang W, Giroux C, Cai Y, Ekambaram P, Dilly AK, Hsu A, Zhou S, Maddipati KR, Liu J, Joshi S, Tucker SC, Lee MJ, Honn KV. Identification of the orphan G protein-coupled receptor GPR31 as a receptor for 12-(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J Biol Chem*. 2011 Sep 30;286(39):33832-40. doi: 10.1074/jbc.M110.216564. Epub 2011 Jun 28.

Habouri L, El Mansouri FE, Ouhaddi Y, Lussier B, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Benderdour M, Fahmi H. Deletion of 12/15-lipoxygenase accelerates the development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 Jul 8. pii: S1063-4584(17)31061-0. doi: 10.1016/j.joca.2017.07.001. [Epub ahead of print]

Haeggström JZ, Funk CD. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev*. 2011 Oct 12;111(10):5866-98. doi: 10.1021/cr200246d. Epub 2011 Sep 22.

Hallstrand TS, Henderson WR. An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10:60-66.

Hambek M, Baghi M, Wagenblast J, Schmitt J, Baumann H, Knecht R. Inverse correlation between serum PGE2 and T classification in head and neck cancer. *Head Neck*. 2007 Mar;29(3):244-8.

Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, et al. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie*. 2010; 92(6):651–9.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*. 1994 Dec;94(6):2504-10.

Harris RE. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* 2009;17:55–67.

Hasan S, Satake M, Dawson DW, et al. Expression analysis of the prostaglandin E2 production pathway in human pancreatic cancers. *Pancreas*. 2008; 37(2):121–127. [PubMed: 18665070]

Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):166-80.

Hemler M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem*. 1976 Sep 25;251(18):5575-9.

Henderson WR. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*. 1994;121:684-697.

Hennig R, Kehl T, Noor S, Ding XZ, Rao SM, Bergmann F, et al. TE. 15-lipoxygenase-1 production is lost in pancreatic cancer and overexpression of the gene inhibits tumor cell growth. *Neoplasia* 2007; 9:917-926.

Hernández-Damián J, Andérica-Romero AC, Pedraza-Chaverri J. Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2014 Oct;347(10):685-97. doi:

Horizoe T, Nagakura N, Chiba K, Shiota H, Shinoda M, Kobayashi N, Numata H, Okamoto Y, Kobayashi S. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with potent anti-inflammatory activity in an arachidonic acid-induced ear inflammation model. *Inflamm Res* 1998;47:375–83.

Horizoe T, Nagakura N, Chiba K, Shiota H, Shinoda M, Numata H, Kobayashi S, Abe C. Effect of ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, on indices of early articular lesion in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *Inflamm Res* 1999;48:432–6.

Hosoi T, Koguchi Y, Sugikawa E, Chikada A, Ogawa K, Tsuda N, Suto N, Tsunoda S, Taniguchi T, Ohnuki T. Identification of a novel human eicosanoid receptor coupled to G(i/o). *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):31459-65. Epub 2002 Jun 13.

Hsi LC, Wilson LC and Eling TE. Opposing Effects of 15-Lipoxygenase-1 and -2 Metabolites on MAPK Signaling in Prostate. Alteration in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *The Journal of Biological Chemistry*. 2002 Oct 25;277(43)

Hu Y, Sun H, O'Flaherty JT, Edwards IJ. 15-Lipoxygenase-1-mediated metabolism of docosahexaenoic acid is required for syndecan-1 signaling and apoptosis in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013 Jan;34(1):176-82.

Huang HF, Shu P, Murphy TF, Aisner S, Fitzhugh VA, Jordan ML. Significance of divergent expression of prostaglandin EP4 and EP3 receptors in human prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2013 Apr;11(4):427-39.

Ishii K, Zaitzu M, Yonemitsu N, Kan Y, Hamasaki Y, Matsuo M. 5-lipoxygenase pathway promotes cell proliferation in human glioma cell lines. *Clin Neuropathol*. 2009 Nov-Dec;28(6):445-52.

Jameson JB, Kantz A, Schultz L, Kalyanaraman C, Jacobson MP, Maloney DJ, Jadhav A, Simeonov A, Holman TR. A high throughput screen identifies potent and selective inhibitors to human epithelial 15-lipoxygenase-2. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104094.

Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, Zhang L, Ewing JR, Wang L, Zhang R, Li L, Lu M, Meng H, Arbab AS, Hu J, Li QJ, Pourabdollah Nejad D S, Athiraman H, Chopp M. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage*. 2005 Nov 15;28(3):698-707. Epub 2005 Aug 19.

Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Oct;69(4):275-81.

Jiang WG, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE. Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-lox)-1 and 15-lox-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74:235- 245.

Johnson AG, Nguyen TV, Day RO. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann Intern Med*. 1994;121:289-300.

Kelavkar UP, Cohen C, Kamitani H, Eling TE, Badr KF Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis*. 2000 Oct;21(10):1777-87.

Kerjaschki D, Bago-Horvath Z, Rudas M, Sexl V, Schneckenleithner C, Wolbank S, Bartel G, Krieger S, Kalt R, Hantusch B, et al. Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mammary carcinoma xenografts in mouse. *J Clin Invest*. 2011 May;121(5):2000-12. doi: 10.1172/JCI44751. Epub 2011 Apr 11.

Klampfl T, Bogner E, Bednar W, Mager L, Massudom D, Kalny I, Heinzle C, Berger W, Stättner S, Karner J, Klimpfinger M, Fürstenberger G, Krieg P, Marian B. Up-regulation of 12(S)-lipoxygenase induces a migratory phenotype in colorectal cancer cells. *Exp Cell Res*. 2012 Apr 1;318(6):768-78.

Kojima F, Kapoor M, Yang L, Fleishaker EL, Ward MR, et al. Defective generation of a humoral immune response is associated with a reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice. *Journal of immunology*. 2008; 180(12): 8361–8.

Kucharzewska P, Christianson HC, Belting M. Global Profiling of Metabolic Adaptation to Hypoxic Stress in Human Glioblastoma Cells. *PLoS One*. 2015; 10(1)

Kumarakulasingham M, Rooney PH, Dundas SR, Telfer C, Melvin WT, Curran S, Murray GI. Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin Cancer Res*. 2005 May 15;11(10):3758-65.

Lands WE. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J*. 1992 May;6(8):2530-6.

Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta JP, Rousset P, Chêne G, Guigné C, Tercé F, Vanner S, Vergnolle N, Bertrand-Michel J, Dubourdeau M, Cenac N. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013 Aug 1;932:123-33. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.06.014. Epub 2013 Jun 15.

Lepley RA, Muskardin DT, Fitzpatrick FA. Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase. *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6179-84.

Li X, Fan S, Pan X, Xiaokaiti Y, Duan J, Shi Y, Pan Y, Tie L, Wang X, Li Y, Li X. Nordihydroguaiaretic acid impairs prostate cancer cell migration and tumor metastasis by suppressing neuropilin 1. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):86225-86238. doi: 10.18632/oncotarget.13368.

Li Y, Zhao H, Wang Y, Zheng H, Yu W, Chai H, Zhang J, Falck JR, Guo AM, Yue J, Peng R, Yang J. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Oct 1;272(1):37-48. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.031. Epub 2013 Jun 5.

Lim JY, Oh JH, Jung JR, Kim SM, Ryu CH, Kim HT, Jeun SS. MK886-induced apoptosis depends on the 5-LO expression level in human malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 2010 May;97(3):339-46.

Lim SC, Cho H, Lee TB, et al. Impacts of cytosolic phospholipase A2, 15-prostaglandin dehydrogenase, and cyclooxygenase-2 expressions on tumor progression in colorectal cancer. *Yonsei Med J*. 2010; 51(5):692–699. [PubMed: 20635443]

Liu J, Mazzone PJ, Cata JP, Kurz A, Bauer M, Mascha EJ, Sessler DI. Serum free fatty acid biomarkers of lung cancer. *Chest*. 2014 Sep;146(3):670-679. doi: 10.1378/chest.13-2568.

Liu Y, Wang H, Zhu Y, Chen L, Qu Y, Zhu Y. The protective effect of nordihydroguaiaretic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by the JNK pathway. *Brain Res*. 2012 Mar 22;1445:73-81. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.031. Epub 2012 Jan 24.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1. Epub 2016 May 9.

Lu D, Han C, Wu T. Microsomal prostaglandin E synthase-1 promotes hepatocarcinogenesis through activation of a novel EGR1/ β -catenin signaling axis. *Oncogene*. 2012 Feb 16;31(7):842-57. doi: 10.1038/onc.2011.287.

Lu X, Han J, Xu X, Xu J, Liu L, Huang Y, Yang Y, Qiu H. PGE2 Promotes the Migration of Mesenchymal Stem Cells through the Activation of FAK and ERK1/2 Pathway. *Stem Cells Int.* 2017:8178643.

Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):823-37. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024.

Luo M, Jones SM, Phare SM, Coffey MJ, Peters-Golden M, Brock TG. Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem.* 2004 Oct 1;279(40):41512-20. Epub 2004 Jul 26.

Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

Ma C, Li Y, Ma J, Liu Y, Li Q, Niu S, Shen Z, Zhang L, Pan Z, Zhu D. Key role of 15-lipoxygenase/15-hydroxyeicosatetraenoic acid in pulmonary vascular remodeling and vascular angiogenesis associated with hypoxic pulmonary hypertension. *Hypertension.* 2011 Oct;58(4):679-88.

Mabalarajan U1, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Leishangthem GD, Singh S, Dinda AK, Biswal S, Agrawal A, Ghosh B. 12/15-lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma. *Sci Rep.* 2013;3:1540. doi: 10.1038/srep01540.

Mal M, Koh PK, Cheah PY, Chan EC. Ultra-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry targeted profiling of arachidonic acid and eicosanoids in human colorectal cancer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011 Mar 30;25(6):755-64.

Marnett, L.J. and Kalgutkar, A.S. (1999) Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharm. Sci.* 20, 465-469.

Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 2004 Oct 12;20(15):2471-2. Epub 2004 Apr 8.

Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, Fezza F, Maccarrone M, Parolaro D. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem.* 2008 Feb;104(4):1091-100.

Mathis S, Jala VR, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2007;7:12-17.

Matsuyama M, Hayama T, Funao K, Kawahito Y, Sano H, Takemoto Y, Nakatani T, Yoshimura R. Overexpression of cysteinyl LT1 receptor in prostate cancer and CysLT1R antagonist inhibits prostate cancer cell growth through apoptosis. *Oncol Rep.* 2007 Jul;18(1):99-104.

Mattila S, Tuominen H, Koivukangas J, Stenback F. The terminal prostaglandin synthases mPGES-1, mPGES-2, and cPGES are all overexpressed in human gliomas. *Neuropathology.* 2009; 29(2):156–165.

McCoy et al., 2002; Wendell et al., 2014; Peinhaupt et al., 2017

McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(5):651-8.

Mehrotra S, Morimiya A, Agarwal B, Konger R, Badve S. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in breast cancer: a potential target for therapy. *J Pathol.* 2006; 208(3):356–363.

Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB J* 2008;22:3595e606.

Miller AW, Katakam PV, Lee HC, Tulbert CD, Busija DW, Weintraub NL. Arachidonic acid-induced vasodilation of rat small mesenteric arteries is lipoxygenase-dependent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan;304(1):139-44.

Morgan LL. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2015 Apr;17(4):623-4. doi: 10.1093/neuonc/nou358. Epub 2015 Jan 20.

Moreau A, Chen QH, Praveen Rao PN, Knaus EE. Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-3-(4-methanesulfonylphenyl)-2-(aryl)acrylic acids as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Bioorg Med Chem.* 2006 Dec 1;14(23):7716-27. Epub 2006 Aug 22.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem.* 2003 Sep ;278(39):37937-47.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275:32783–32792.

Murray GI, Patimalla S, Stewart KN, Miller ID, Heys SD. Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):202-11. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03606.x.

Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):25-30.

Nathoo N, Barnett GH, Golubic M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol.* 2004 Jan;57(1):6-13.

Nguyen CH, Stadler S2, Brenner S, Huttary N, Krieger S, Jäger W, Dolznig H, Krupitza G. Cancer cell-derived 12(S)-HETE signals via 12-HETE receptor, RHO, ROCK and MLC2 to induce lymph endothelial barrier breaching.

Br J Cancer. 2016 Jul 26;115(3):364-70. doi: 10.1038/bjc.2016.201. Epub 2016 Jun 30.

Nie D, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 1998 Sep 15;58(18):4047-51.

Nixon JB, Kim KS, Lamb PW, Bottone FG, Eling TE. 15-lipoxygenase-1 has anti-tumorigenic effects in colorectal cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70:7-15.

Nonaka K, Fujioka H, Takii Y, et al. mPGES-1 expression in non-cancerous liver tissue impacts on postoperative recurrence of HCC. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(38):4846–4853. [PubMed: 20939114]

Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010; 17(5):510–22. [PubMed:20399149]

O'Callaghan G, Houston A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *Br J Pharmacol.* 2015 Nov;172(22):5239-50.

Ohba S, Hirose Y. Biological Significance of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 in Gliomagenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016;56(4):170-9. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0322. Epub 2016 Mar 10.

Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Löfberg H, Sjölander A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 2003 Jan;124(1):57-70.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004; 64(19):6892–9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.

Olsen J, Overvad K. The concept of multifactorial etiology of cancer. *Pharmacol Toxicol.* 1993;72 Suppl 1:33-8.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P2, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014 Oct;16 Suppl 4:iv1-63. doi: 10.1093/neuonc/nou223.

Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suvà ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 2014 Jun 20;344(6190):1396-401.

Patrono, C., Patrignani, E and García Rodríguez, L.A. (2001) Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J. Clin. Invest.* 108:7-13.

Peiffer J, Kleihues P. Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol.* 1999 Apr;9(2):241-5.

Peinhaupt M, Sturm EM, Heinemann A. Prostaglandins and Their Receptors in Eosinophil Function and As Therapeutic Targets. *Front Med (Lausanne)*. 2017 Jul 19;4:104. doi: 10.3389/fmed.2017.00104. eCollection 2017.

Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:71-95.

Peters-Golden M, Gleason MM, Togias A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:689-703.

Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007;357:1841-1854.

Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2721-7.

Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):503-24.

Pilkington SM, Rhodes LE, Al-Aasswad NM, Massey KA, Nicolaou A. Impact of EPA ingestion on COX- and LOX-mediated eicosanoid synthesis in skin with and without a pro-inflammatory UVR challenge--report of a randomised controlled study in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2014

Poczobutt JM, Nguyen TT, Hanson D, Li H2, Sippel TR, Weiser-Evans MC, Gijon M, Murphy RC, Nemenoff RA. Deletion of 5-Lipoxygenase in the Tumor Microenvironment Promotes Lung Cancer Progression and Metastasis through Regulating T Cell Recruitment. *J Immunol.* 2016 Jan 15;196(2):891-901. doi: 10.4049/jimmunol.1501648. Epub 2015 Dec 11.

Porro B, Songia P, Squellerio I, Tremoli E, Cavalca V. Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014 Aug 1;964:26-40. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.03.015. Epub 2014 Mar 15.

Powell PK, Wolf I, Jin R, Lasker JM. Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Jun;285(3):1327-36.

Powell WS, Gravel S, MacLeod RJ, Mills E, Hashefi M. Stimulation of human neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by a mechanism independent of the leukotriene B₄ receptor. *J Biol Chem.* 1993 May 5;268(13):9280-6.

Powell WS, Gravelle F, Gravel S. Metabolism of 5(S)-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid and other 5(S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19233-41.

Powell WS, Rokach J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1851(4):340-55. doi: 10.1016/j.bbali.2014.10.008. Epub 2014 Oct 29.

Rahman M, Wright JT Jr, Douglas JG. The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *Am J Hypertens*. 1997 Mar;10(3):356-65.

Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5;100(16):9244-9. Epub 2003 Jun 30.

Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med*. 1993 Nov;122(5):518-23.

Rigby DA, Ferguson DJ, Johnson LA, Jackson DG. Neutrophils rapidly transit inflamed lymphatic vessel endothelium via integrin-dependent proteolysis and lipoxin-induced junctional retraction. *J Leukoc Biol*. 2015 Dec;98(6):897-912. doi: 10.1189/jlb.1H10415-149R. Epub 2015 Jul 27.

Rossi A, Cuzzocrea S, Sautebin L. Involvement of leukotriene pathway in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury and septic and non-septic shock. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7:185-197.

Rovito D, Giordano C, Plastina P, Barone I, De Amicis F, Mauro L, Rizza P, Lanzino M, Catalano S, Bonofiglio D, Andò S. Omega-3 DHA- and EPA-dopamine conjugates induce PPAR γ -dependent breast cancer cell death through autophagy and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov;1850(11):2185-95.

Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77(6):937–46. [PubMed:19022225]

Sadeghian H, Jabbari A. 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26(1):65-88. doi: 10.1517/13543776.2016.1113259. Epub 2015 Nov 11.

Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Nov;107(45):799-807; quiz 808. doi: 10.3238/arztebl.2010.0799. Epub 2010 Nov 12.

Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Sep;2(9):494-503; quiz 1 p following 516.

Sekiya F, Takagi J, Usui T, Kawajiri K, Kobayashi Y, Sato F, Saito Y. 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid plays a central role in the regulation of platelet activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Aug 30;179(1):345-51.

Serhan CN, Jain A, Marleau S, Clish C, Kantarci A, Behbehani B, et al. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous antiinflammatory lipid mediators. *J Immunol* 2003;171:6856e65.

Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Sep-Oct;73(3-4):141-62.

Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:101-37.

Serhana CN, Prescottb SM. The Scent of a Phagocyte: Advances on Leukotriene B4 Receptors *J Exp Med*. 2000 Aug 7; 192(3): f5–f8.

Setty BN, Werner MH, Hannun YA, Stuart MJ. 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated potentiation of thrombin-induced platelet functions occurs via enhanced production of phosphoinositide-derived second messengers--sn-1,2-diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate. *Blood*. 1992 Dec 1;80(11):2765-73.

Shi Y, Hon M, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2613-8. Epub 2002 Feb 26.

Shureiqi I, Chen D, Lee JJ, Yang P, Newman RA, Brenner DE, Lotan R, Fischer SM, Lippman SM. 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Jul 19;92(14):1136-42.

Shureiqi I, Jiang W, Zuo X, Wu Y, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Morris JS, Fan HZ, Fischer SM, Lippman SM. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 19;100(17):9968-73 Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 2004;4:641–8.

Shureiqi I1, Chen D, Day RS, Zuo X, Hochman FL, Ross WA, Cole RA, Moy O, Morris JS, Xiao L, Newman RA, Yang P, Lippman SM. Profiling lipoxygenase metabolism in specific steps of colorectal tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Jul;3(7):829-38.

Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J. Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Sep;111(3):171-83.

Smith W.L., Murphy R.C. The eicosanoids. Cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxigenase pathways. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier Science B.V. 2002; (4)331-362.

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 5;110(10):4009-14. doi: 10.1073/pnas.1219747110. Epub 2013 Feb 14.

Spindler SA, Sarkar FH, Sakr WA, Blackburn ML, Bull AW, LaGattuta M, Reddy RG: Production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) by prostate tumors and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Oct 29;239(3):775-81.

Stec DE, Mattson DL, Roman RJ. Inhibition of renal outer medullary 20-HETE production produces hypertension in Lewis rats. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):315-9.

Szefel J, Kruszewski WJ, Sobczak E. Factors influencing the eicosanoids synthesis in vivo. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:690692. doi: 10.1155/2015/690692. Epub 2015 Mar 11.

Szekeres CK, Trikha M, Nie D, Honn KV. Eicosanoid 12(S)-HETE activates phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 28;275(2):690-5.

Takenaga M, Hirai A, Terano T, Tamura Y, Kitagawa H, Yoshida S. Comparison of the in vitro effect of eicosapentaenoic acid (EPA)-derived lipoxygenase metabolites on human platelet function with those of arachidonic acid. *Thromb Res*. 1986 Feb 1;41(3):373-84.

Takii Y, Abiru S, Fujioka H, et al. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2007; 27(7):989–996.

Tavakoli YM, Karami TF. Apoptosis Induced by 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid in the Breast Cancer Cell Lines, MCF-7 and MDA-MB-231. *Iran J Basic Med Sci*. 2013 Apr;16(4):653-9.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, Villano JL. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2014; 23:1985–1996. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Traversa G, Walker AM, Ippolito FM, et al. Gastroduodenal toxicity of different nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology*. Jan 1995;6(1):49-54.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17(1):98–110.

Von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol.* 1936 Nov 6; 88(2): 213–234. PMID: PMC1395258

Von Rahden BH, Stein HJ, Hartl SA, et al. Expression of prostaglandin E synthase in Barrett's cancer. *Dis Esophagus.* 2008; 21(4):304–308.

Vonach C1, Viola K, Giessrigl B, Huttary N, Raab I, Kalt R, Krieger S, Vo TP, Madlener S, Bauer S, Marian B, Hämmerle M, Kretschy N, Teichmann M, Hantusch B, Stary S, Unger C, Seelinger M, Eger A, Mader R, Jäger W, Schmidt W, Grusch M, Dolznig H, Mikulits W, Krupitza G. NF- κ B mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells. *Br J Cancer.* 2011 Jul 12;105(2):263-71. doi: 10.1038/bjc.2011.194. Epub 2011 May 31.

Wallace JL. Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America.* 2001; 30(4):971–80.

Wang D, Dubois RN. Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol.* 2004 Feb;31(1 Suppl 3):64-73.

Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(3):181-193.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut.* 2006; 55(1):115–22.

Wang D, Liu Y, Chen L, Li P, Qu Y, Zhu Y, Zhu Y. Key role of 15-LO/15-HETE in angiogenesis and functional recovery in later stages of post-stroke mice. *Sci Rep.* 2017 Apr 24;7:46698. doi: 10.1038/srep46698.

Wang F, Bhat K, Doucette M, Zhou S, Gu Y, Law B, Liu X, Wong ET, Kang JX, Hsieh TC, Qian SY, Wu E. Docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cells to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med.* 2011 Aug;11(6):503-11.

Wang M, Song WL, Cheng Y, Fitzgerald GA. Microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibition in cardiovascular inflammatory disease. *Journal of internal medicine.* 2008; 263(5):500–5. [PubMed: 18410593]

Wang W, Zhu J, Lyu F, Panigrahy D, Ferrara KW, Hammock B, Zhang G. ω -3 polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2014 Oct;113-115:13-20. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2014.07.002. Epub 2014 Jul 11.

Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature.* 2015 Dec 17;528(7582):413-7. doi: 10.1038/nature16140. Epub 2015 Dec 9.

Wendell SG, Baffi C, Holguin F. Fatty acids, inflammation, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 May;133(5):1255-64. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1087. Epub 2014 Mar 7.

Werz O, Bürkert E, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, Rådmark O, Steinhilber D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J*. 2002 Sep;16(11):1441-3. Epub 2002 Jul 1.

Werz O, Klemm J, Samuelsson B, Rådmark O. 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5261-6.

Werz O, Szellas D, Steinhilber D, Rådmark O. Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):14793-800. Epub 2002 Feb 13.

Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int*. 2014 May 8;5:64. doi: 10.4103/2152-7806.132138. eCollection 2014.

Wong BC, Wang WP, Cho CH, Fan XM, Lin MC, Kung HF, Lam SK. 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2001 Sep;22(9):1349-54.

Wu J, Xia HH, Tu SP, Fan DM, Lin MC, Kung HF, Lam SK, Wong BC. 15-Lipoxygenase-1 mediates cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis*. 2003 Feb;24(2):243-7.

Xu X, Zhang XA, Wang DW. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Jul 18;63(8):597-609. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.006. Epub 2011 Apr 6.

Yin Y, Sui C, Meng F, Ma P, Jiang Y. The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. *Lipids Health Dis*. 2017 May 3;16(1):87.

Youngren JF1, Gable K, Penaranda C, Maddux BA, Zavodovskaya M, Lobo M, Campbell M, Kerner J, Goldfine ID. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu receptors and suppresses growth in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2005 Nov;94(1):37-46.

Yu W, Chen L, Yang YQ, Falck JR, Guo AM, Li Y, Yang J. Cytochrome P450 ω -hydroxylase promotes angiogenesis and metastasis by upregulation of VEGF and MMP-9 in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Sep;68(3):619-29.

Yuan H, Li MY, Ma LT, Hsin MK, Mok TS, Underwood MJ, Chen GG. 15-lipoxygenases and its metabolites 15(s)-hete and 13(s)-hode in the development of non-small cell lung cancer. *Thorax* 2010; 65:321-326.

Zavodovskaya M, Campbell MJ, Maddux BA, Shiry L, Allan G, Hodges L, Kushner P, Kerner JA, Youngren JF, Goldfine ID. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA), an inhibitor of the HER2 and IGF-1 receptor tyrosine kinases, blocks

the growth of HER2-overexpressing human breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2008 Feb 1;103(2):624-35.

Zhang B, Cao H, Rao GN. 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid induces angiogenesis via activation of PI3K-Akt-mTOR-S6K1 signaling. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7283-91.

Zhang LJ, Chen B, Zhang JJ, Li J, Yang Q1 Zhong QS, Zhan S, Liu H, Cai C. Serum polyunsaturated fatty acid metabolites as useful tool for screening potential biomarker of colorectal cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2017 May;120:25-31.

Zhu Y, Chen L, Liu W, Wang W, Zhu D, Zhu Y. Hypoxia-induced 15-HETE enhances the constriction of internal carotid arteries by down-regulating potassium channels. *J Neurol Sci.* 2010 Aug 15;295(1-2):92-6. doi: 10.1016/j.jns.2010.04.015. Epub 2010 May 20.

Zuo X, Wu Y, Morris JS, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Fischer SM, Lippman SM, Shureiqi I. Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR-beta/delta suppression of PPAR-gamma activity. *Oncogene.* 2006 Feb 23;25(8):1225-41.