UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Papel funcional dos leucotrienos na resposta imunológica ao
melanoma B16-F0 experimental em camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientado: Denise Sayuri Calheiros da Silveira

Orientador: Auro Nomizo

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silveira, Denise Sayuri Calheiros

Papel funcional dos leucotrienos na resposta imunológica
ao melanoma B16-F0 experimental em camundongos
Ribeirão Preto, 2012 p.89. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Nomizo, Auro

1.B16- F0. 2. Leucotrienos. 3.Imunorregulação.
4.Citocinas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da aluna: Denise Sayuri Calheiros da Silveira

Título do trabalho: Papel funcional dos leucotrienos na resposta imunológica ao melanoma B16-F0 experimental em camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr Auro Nomizo

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família:
Aos meus pais, José Calheiros e Keiko,
Ao meu irmão Diogo.*

*Eu poderia dedicar minha vida inteira a vocês, mas
mesmo assim, não o seria suficiente para agradecer
todo o amor, todo o carinho, toda a paciência, todo o
exemplo, toda a compreensão, todo o apoio que sempre
me deram.*

Eu os amo e ponto.

AGRADECIMENTOS

Durante esta árdua e penosa jornada, pude contar com a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Por esta razão, deixo aqui registrada a minha sincera gratidão, pois seria impossível a conclusão deste trabalho sem o envolvimento destas pessoas:

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo.

À Prof. Dra. Lúcia Helena Faccioli, generosa, profissional e ética. Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório, por me tratar como se fosse de casa e por permitir que eu cumprisse com o meu trabalho de forma digna.

À Prof. Dra. Fabiani Gai Frantz, que assim como a Dr. Lúcia, me permitiu o uso do laboratório para o término dos meus experimentos.

À Prof. Dra. Simone Kashima Haddad por disponibilizar o laboratório. Agradeço à Virginia M.D. Wagatsuma, pela paciência e disponibilidade para realizar e analisar meu experimento. E de forma muito especial, agradeço a Thatiane Maistro Malta, pela compreensão, pelas conversas, pela paciência e pela coragem em repetir e analisar meu experimento.

Ao Dr. Carlos Artério Sorgi, pois no momento em que mais precisei, estendeu sua mão e me tirou do buraco científico, me orientando, me acompanhando, discutindo idéias. Não sei como agradecer tanta generosidade.

À Fabiana Rossetto Moraes, por compartilhar de alguns momentos difíceis me dando força. Obrigada pela disponibilidade que sempre ofereceu (antes, durante e depois) para as realização dos experimentos, mesmo sendo eles matutinos ou noturnos.

As minhas queridas companheiras do laboratório: Adriana Secatto, Alyne Galvão, Ana Pagliaroni, Carol Fontanari, Ciça Rocha, Claudia Bitencourt, Elyara Soares, Gisele Locachevic, Milena Sobral, Patricia Assis, Priscila Tartari, e ao querido Guilherme Gelfuso, pela amizade, pelos momentos de alegria e descontração, pelo agradável convívio, pelo o apoio científico e emocional. Agradeço de forma especial à Karina Zocal, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando, dando conselhos, me defendendo e por sempre querer o meu bem. Cá, muito obrigada!

À Andreia Almeida, à Isabela Gobbo, ao Rafael Alexandre, ao Neto Pacífico e à Marina Fossa, por estarem comigo em quase todos os momentos de tensão, por terem agüentado meus inúmeros desabafos, por terem sido solidários. Muito obrigada mesmo. Só quem sabe pode dizer.

À Thalita Riul, que apesar dos poucos encontros, sempre me socorreu quando pedi ajuda.

À Andrea Casella, que sempre teve palavras acolhedoras nos meus desesperos. Por mais que estejamos um pouco distante, eu serei sempre grata.

Ao pessoal do biotério, em especial ao Reinaldo, que sempre foi prestativo e me ajudou quando precisei.

À seção da pós graduação da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Rib. Preto, principalmente ao Henrique Theodoro, pela solidariedade e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

Os meus agradecimentos especiais vão para estas pessoas muito mais que especiais, pois acredito que além de aprender a pipetar, a ler um paper, a pensar cientificamente ou realizar um difícil experimento, eu vim para Ribeirão para que estas pessoas pudessem ficar na minha vida.

À Paula Holanda, irmã por opção. Pá, obrigada por tudo. Pelas conversas, pelo carinho, pelo respeito, pela convivência. Seria muito mais difícil sem você. Te gosto. BEIJAS.

Ao Ciro Lino, amigo do fundinho aconchegante do meu coração. Cirinho, obrigada pelo carinho e por estar comigo. Gosto tanto que nem sei.

À Liliana Scatena, amiga para uma vida. Lilis, muito obrigada pelas conversas, pela solidariedade, pelos desabafos escutados. ADORO.

Ao Guilherme Leugi, amigo novo. Gui, sempre cavalheiro, sempre gentil, sempre ouvindo, sempre fofo. Muito obrigada. Ah! pela senha também. Você me salvou!

E por fim, além de dedicar, eu agradeço, pois é neles que direciono o meu amor incondicional:

Ao meu pai. Obrigada por dar o exemplo de dedicação, coragem, persistência, pelo seu amor, pelo seu apoio e por acreditar em mim.

À minha mãe. Obrigada por dar o exemplo de carinho e amor, pelos momentos de preocupação, pelas horas ao telefone tentando me pegar no colo, pelas palavras que me confortam.

Ao meu irmão. MUITÍSSIMO obrigada. De fato, sem você esta dissertação não seria impressa, obrigada pelo tonner. Nada, não seria impressa porque eu estaria muito mais perdida, além de perder o meu tempo chorando, fazendo comida, dando socos na parede, arrancando os cabelos, ficando louca rouca e de tanto xingar. Obrigada por me apoiar, por ter vindo para cá, por formatar toda a dissertação, por briga, por gritar, por sempre me trazer para a realidade, por ser meu amigo e por me entender.

MUITO OBRIGADA.

SILVEIRA, D.S.C. **Papel funcional dos leucotrienos na resposta imunológica ao melanoma B16-F0 experimental em camundongos.** 2012.XXXX f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

RESUMO

No presente trabalho investigamos a relevância dos mediadores lipídicos (Leucotrienos) gerados pela enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) na susceptibilidade ou resistência de camundongos ao Melanoma experimental com células tumorais B16-F0, utilizando como modelo camundongos produtores de leucotrienos (129_WT) e camundongos geneticamente deficientes "knockout" de 5-LO (129_5-LO KO). Primeiramente, verificamos que leucócitos peritoneais provenientes de animais WT implantados com melanoma B16-F0, apresentam aumento da expressão do gene para 5-LO (Alox5). Nossos resultados mostram que animais 5-LO KO, deficientes de 5-LO são mais eficientes no controle da progressão do tumor e apresentam significativo aumento na sobrevivência, quando comparados a animais WT, produtores de 5-LO. A nossa análise do perfil imunológico em células esplênicas indicam que a maior eficiência dos camundongos 5-LO KO no controle do crescimento de células tumorais B16-F0 estariam associados à presença numérica aumentada de neutrófilos (Gr-1⁺), células apresentadoras de antígeno (I-A^{b+}) majoritariamente CD19⁺CD80⁺ e esplenócitos capacitados para produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias/efetoras como a IL-6, TNF α , IFN- γ e baixos níveis de citocinas regulatórias como IL-10, 15 dias pós-implantação do tumor; a rápida geração da resposta imune polarizada para produção elevada de citocinas Th1 (IFN- γ), mas não, citocinas Th2 (IL-10) e presença de maiores números de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras, expressando o fenótipo CD44^{high} ou CD44^{high}CD62L^{low}. Ainda, verificamos que a deficiência genética da 5-LO ou a inibição da 5-LO pelo MK886 em células LAK, aumenta significativamente sua atividade citotóxica em células do melanoma B16-F0. Nossos resultados em conjunto, indicam que leucotrienos gerados pela enzima 5-LO, modulam negativamente a geração de resposta imune protetora em camundongos para o Melanoma B16-F0.

Palavras Chave: Melanoma B16-F0, Leucotrienos, Citocinas Th1/Th2, Células T efetoras, imunorregulação.

ABSTRACT

In the present work we examine the contribution of 5-lipoxygenase-derived lipid mediators during experimental melanoma (B16-F0) in 5-LO gene knockout (KO) mice and wild-type (WT) mice. The 5-LO KO mice presented delayed tumor growth, lesser tumor volume and delayed mortality. The greater resistance of 5-LO KO mice correlated with the following: High splenic Gr-1⁺ leukocytes counts, High and dominant presence of splenic IAb⁺CD19⁺CD80⁺ antigen-presenting cells counts and capacity of spleen cell to produce high levels of IL-6, TNF- α , IFN- γ and lower levels of IL-10 early after tumor cells implantation; rapid T-cell polarization to secrete high quantities of Th1 type cytokine IFN- γ and low quantities of Th2 type cytokine IL-10; rapid generation and greater numbers of CD4⁺ and CD8⁺ activated T cells expressing CD45RB or CD44 markers; and also CD4⁺ and CD8⁺ CD44^{high} or CD44^{high}CD62L^{low} effector T cells. Herein, IL-2 induced splenic LAK cells from 5-LO KO mice, compared with splenic LAK cells from WT mice, were more efficient at killing B16-F0 melanoma cells. The increased B16-F0 melanoma cells killing activity were also found by treatment of splenic LAK cells from WT mice with a 5-LO activity inhibitor, MK886. Our findings suggest that 5-LO deficiency altered antigen-presenting cells profile, IFN- γ and IL-10 production during skin cancer disease favoring the generation of protective immune responses and also provide evidence that 5-LO-derived LTs negatively affect the host survival during experimental B16-F0 melanoma.

Key words: B16-F0 melanoma, Leukotrienes, Th1/Th2 Cytokines, effector T cells.

RESUME

En este trabajo se investiga la relevancia de mediadores lipídicos (los leucotrienos) generado por La enzima 5-Lipoxigenasa (5-LO) en La susceptibilidad o La resistencia de los ratones con melanoma experimental B16-F0, las células tumorales, utilizando ratones como modelo de producción de leucotrienos (129_WT) y ratones genéticamente deficientes “knockout” de La 5-LO (129_5-LO KO). En primer lugar, encontramos que los leucocitos peritoneales de animales WT implantados con melanoma B16-F0, muestran una mayor expresión del gen de La 5-LO (ALOX5). Nuestros resultados muestran que animales 5-LO KO, son más eficaces en El control de La progresión del tumor y aumenta significativamente La supervivencia en comparación con los animales WT,. Nuestro análisis del perfil inmunológico en las células del bazo indica que La eficiencia de ratones 5-LO KO para controlar el crecimiento de las células tumorales B16-F0 se asociaron con una mayor presencia numérica de los neutrófilos (Gr^{+}), células presentadoras de antígenos ($I-Ab^{+}$) en su mayoría $CD80^{+}$ y $CD19^{+}$ esplenocitos capaces de producir altos niveles de citoquinas como La pro-inflamatorias/efectoras IL-6, $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$ y los bajos niveles de citoquinas reguladoras, tales como IL-10, 15 días después de La implantación del tumor, La rápida generación de La respuesta inmune polarizada a La elevada producción de citoquinas Th1 ($IFN-\gamma$), pero no, las citocinas Th2 (IL-10) y la presencia de un mayor número de linfocitos efector T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$, fenotipo expresar $CD44^{high}$ ou $CD44^{high}CD62L^{low}$. Sin embargo, hemos encontrado que la deficiencia genética de la 5-Lo inhibición o 5-LO en las células LAK por MK886, aumenta significativamente su actividad citotóxica en células de melanoma B16-F0. Nuestros resultados indican que junto los leucotrienos generados por la enzima 5-LO, modulan negativamente la gestión de respuesta inmune protectora en ratones con melanoma B16-F0.

Palabras clave: Melanoma B16-F0, leucotrienos, citocinas Th1/Th2, las células efectoras, inmunorregulación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eicosanoides bioativos derivados da família Omega-6.....	5
Figura 2.	Formação dos mediadores lipídicos a partir dos fosfolipídeos de membrana.....	7
Figura 3.	Níveis de expressão do gene Alox5/5-LOX em leucócitos da cavidade peritoneal obtidos de camundongos implantados com Melanoma B16-F0.....	19
Figura 4.	Perfil da progressão do volume tumoral em camundongos WT e 5-LO KO implantados com célula tumorais B16-F0.....	20
Figura 5.	Porcentagem de sobrevivência dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com célula tumorais B16-F0.....	21
Figura 6.	Perfil fenotípico das diferentes populações de leucócitos esplênicos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do melanoma B16-F0.....	23
Figura 7.	Perfil fenotípico das células apresentadoras de antígeno presentes no baço dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do melanoma B16-F0.....	25
Figura 8.	Perfil fenotípico das diferentes populações de linfócitos esplênicos de camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do melanoma B16-F0.....	27
Figura 9.	Níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO 15 dias após a implantação de células tumorais B16-F0.....	29
Figura10.	Níveis de citocinas Th1/Th2/Th17 em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células tumorais B16-F0.....	31
Figura11.	Perfil fenotípico das populações de linfócitos T esplênicos ativados, presentes em camundongos WT ou 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0.....	33
Figura 12.	Perfil fenotípico das populações de linfócitos T esplênicos efetores, presentes em camundongos WT ou 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0.....	35

Figura13.	Atividade de células LAK derivadas de esplenócitos provenientes de animais WT ou 5-LO KO cultivadas na presença de IL-2.....	37
Figura 14	Efeito do tratamento com MK886 na geração e atividade efetora das células LAK derivadas de esplenócitos.....	39

LISTA DE ABREVIATURA

5-LO	5-lipoxigenase
APCs	<i>Antigens Presenting Cell</i> (Células Apresentadoras de Antígenos)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância entre grupos)
CD_	<i>Cluster of differentiation_</i>
COX	Ciclooxigenase
CTLs	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i> (células T citotóxicas)
CyLTs	Cyteinyl Leukotrienes (cisteinil Leucotrienos)
DEPC	dietil pirocarbato
F4/80	Marcador de superfície celular para Macrófagos
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (seleção celular ativada por fluorescência)
FITC	<i>Fluorescein isotiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
FLAP	<i>Five-lipoxigenase-activating protein</i>
GR-1	Marcador de superfície celular Ly-6G
HETEs	Hidroieicosanóides
IFN- γ	Interferon gamma
IL-	Interleucina-
KO	<i>knock-out</i> (animais destituídos de algum gene)
LOX	lipoxigenase
LT_	Leucotrieno_
LTs	Leucotrienos
LX_	Lipoxina_
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MK886	Inibidor de FLAP
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico mensageiro)
NK1.1	Antígeno expresso na superfície de células NK e NKT
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T

PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i> (fator ativador de plaqueta)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina-fosfato tamponada)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia de DNA Polimerase)
PE	<i>r-phicoeritrin</i> (ficoeritrina)
PG ₂	Prostaglandina ₂
PGs	Prostaglandinas
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura celular)
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SPF	<i>Species Pathogen Free</i> (espécies livres de patógenos)
Th ₁	T <i>helper</i> ₁
TGF- β	<i>Transforming growth factor- beta</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TX	Tromboxano
WT	<i>wild type</i> (selvagem)

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Resume.....	ix
1. Introdução	1
2. Objetivo.....	13
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 ANIMAIS:	16
3.2 LINHAGENS CELULARES/TUMORAIS	16
3.3 MEIO DE CULTIVO CELULAR	16
3.4 IMPLANTAÇÃO DO TUMOR (MELANOMA B16-F0)	16
3.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL E MORTALIDADE	17
3.6 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL DOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMAIS IMPLANTADOS COM MELANOMA	17
3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MRNA PARA 5-LO EM CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL	18
3.7.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	18
3.7.2 OBTENÇÃO DE cDNA PELA TÉCNICA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	18
3.7.3 ANÁLISE DOS GENES EXPRESSOS EM CÉLULAS DA CAVIDADE PERITONEAL	19
3.7.3.1 TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL	19
3.7.3.2 CÁLCULO DA EXPRESSÃO RELATIVA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	20
3.8 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS/ESPLENÓCITOS:	20
3.9 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURA DE ESPLENÓCITOS	20
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO SISTEMA MULTIPLEX/CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) EM CITÔMETRO DE FLUXO (CBA):	21
3.10.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PADRÃO/CONTROLE DE CITOCINAS	21
3.10.2 PROCEDIMENTO DO ENSAIO	21
3.11 ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO DOS ESPLENÓCITOS	22
3.12 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURA RICO EM RIL-2	23
3.13 ENSAIOS DE INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CÉLULAS LAK	23
3.13.1 INDUÇÃO DE CÉLULAS LAK	23
3.13.2 Ensaio de citotoxicidade: liberação de lactato de desidrogenase (LDH)	24
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4. RESULTADOS	26

4.1. OS LEUCÓCITOS DA CAVIDADE PERITONEAL PROVENIENTES DE ANIMAIS IMPLANTADOS COM MELANOMA B16-F0 APRESENTAM AUMENTO DA EXPRESSÃO DO GENE RESPONSÁVEL PELA CODIFICAÇÃO DA 5-LO (ALOX5).	27
4.2. OS ANIMAIS DEFICIENTES DE 5-LO SÃO MAIS EFICIENTES NO CONTROLE DO TUMOR E APRESENTARAM SIGNIFICATIVO AUMENTO NA SOBREVIVÊNCIA.	28
4.3. ANIMAIS 5-LO KO PORTADORES DE MELANOMA, COMPARADOS AO GRUPO DE ANIMAIS WT, APRESENTAM MENOS CÉLULAS NKT, ELEVAÇÃO NUMÉRICA DE NEUTRÓFILOS (15 E 30 DIAS P.I), NÚMEROS REDUZIDOS DE MACRÓFAGOS (15 E 20 DIAS P.I) E ELEVAÇÃO NUMÉRICA MAIS TARDIA DAS CÉLULAS NK.	31
4.4. CAMUNDONGOS 5-LO KO IMPLANTADOS COM MELANOMA, DIFERENTEMENTE DOS CAMUNDONGOS WT, GERAM MAIOR NÚMERO DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO/APCs, PREDOMINANTEMENTE COM FENÓTIPO IAb+CD19+ E EXPRESSANDO PREFERENCIALMENTE CD80+/B7.1.	33
4.5. ANIMAIS 5-LO KO, MAS NÃO ANIMAIS WT, APRESENTAM EXPANSÃO DE LINFÓCITOS T, LINFÓCITOS T CD4+, LINFÓCITOS T CD8+ E LINFÓCITOS B NA FASE INICIAL PÓS-IMPLANTAÇÃO COM MELANOMA B16-F0 (15 DIAS).	35
4.6. OS ESLENÓCITOS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS 5-LO KO IMPLANTADOS COM CÉLULAS TUMORAIS DIFEREM DOS ESLENÓCITOS PROVENIENTES DE CAMUNDONGOS WT PELA SUA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO RÁPIDA E EM NÍVEIS ELEVADOS DE IL-6, TNF α E IFN- γ E POR PRODUZIREM MENORES NÍVEIS DE IL-10.	37
4.7. CAMUNDONGOS 5-LO KO IMPLANTADOS COM MELANOMA B16-F0 DIFEREM DOS CAMUNDONGOS WT IMPLANTADOS COM MELANOMA B16-F0 PELA PROPRIEDADE DOS SEUS ESLENÓCITOS PRODUZIREM PREDOMINANTEMENTE E EM MAIORES NÍVEIS CITOCINAS PADRÃO Th1 (IFN γ) E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-6 E TNF α), MAS NÃO CITOCINAS PADRÃO Th2 (IL-10).	39
4.8. ANIMAIS 5-LO KO IMPLANTADOS COM MELANOMA B16-F0, COMPARADOS AOS ANIMAIS WT, GERAM MAIS RAPIDAMENTE E EM MAIOR NÚMERO LINFÓCITOS T CD4+ E LINFÓCITOS T CD8+ ATIVADOS.	41
4.9. LINFÓCITOS T CD4+ E LINFÓCITOS T CD8+ EFETORES SÃO GERADOS MAIS RAPIDAMENTE E EM MAIOR NÚMERO EM ANIMAIS 5-LO KO IMPLANTADOS COM MELANOMA B16-F0, QUANDO COMPARADOS AOS ANIMAIS WT.	43
4.10. CÉLULAS LAK DERIVADAS DOS ESLENÓCITOS PROVENIENTES DE ANIMAIS 5-LO KO SÃO MAIS EFICIENTES PARA EXERCER ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE O MELANOMA B16-F0, COMPARADAS À ATIVIDADE DE CÉLULAS LAK DERIVADAS DOS ESLENÓCITOS PROVENIENTES DE ANIMAIS WT.	45
4.11. A INIBIÇÃO DA 5-LO PELO MK886 NÃO AFETA A GERAÇÃO DE CÉLULAS LAK MAS, AUMENTA SIGNIFICATIVAMENTE A ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS CÉLULAS LAK EM CÉLULAS DO MELANOMA B16-F0.	47
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	50
6. CONCLUSÃO	58
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O Câncer é uma doença com grande incidência na população mundial e altamente letal. Estima-se que cerca de 10 milhões de novos casos de Câncer são diagnosticados anualmente. Os dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 7 milhões de pacientes portadores de Câncer morrem anualmente e 12% das causas de óbito no mundo, estariam associados ao Câncer (PARKIN, 2001; KYRIAZI *et al.*, 2006).

O Câncer é considerado uma doença genética resultante de múltiplas alterações intrínsecas da célula e mudanças nos fatores presentes no microambiente extracelular. As alterações genéticas como translocação, genes mutados, duplicação gênica e epigênicas causam um descontrole e/ou alterações no perfil da expressão gênica favorecendo a instabilidade genômica em células normais. Esta instabilidade levaria a morte celular, no entanto, estas células transformadas sobrevivem tornando células neoplásicas ou malignas. Apesar da natureza pleiotrópica que os tumores possuem, várias características são compartilhadas por quase todos os tipos de tumores malignos, como: auto-suficiência em sinais para proliferação, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, evasão a morte celular programada/apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. (LUO *et al.* 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A identidade das células tumorais pode ser caracterizada por apresentar morfologia atípica, atividade funcional alterada, alterações fenotípicas qualitativas e/ou quantitativas das moléculas expressas na membrana celular, entre outros (EL-). Os perfis morfológico, funcional e fenotípico são tumor-específico e estão associados a linhagem da células da qual foi derivada e/ou grau de malignidade, portanto importantes para identificação tipo do tumor, bem como, para adequar o tratamento mais eficiente para a doença. (GREENMAN *et al.* 2007; WOOD *et al.* 2007).

Em um microambiente tumoral, vários mediadores pró-inflamatórios participam de um complexo processo de sinalização que provoca alterações no nicho (microambiente externo), mudanças na micro-arquitetura tissular (células e matriz extracelular), suporte nutricional/hormonal e mutações sucessivas em diferentes genes ou grupos de gene. Estes

eventos estão relacionados à invasão de células tumorais através do estroma, possibilitando a progressão tumor (SETHI, 2012 ; ALBINI, 2007).

As alterações dinâmicas no nicho tumoral, a instabilidade genômica das células tumorais, a capacidade invasiva e metastática dos tumores e o grande volume tumoral, podem influenciar a eficiência terapêutica dos antineoplásicos. A instabilidade genética pode causar mutações genéticas que tornam as células resistentes ao medicamento, pois desenvolvem habilidade de inativarem a droga pela catálise ou oxidação (GROSSMAN, 2001).

1.2 Melanoma

O Melanoma é um tipo de Câncer cutâneo derivado de melanócitos (células produtoras de melanina). O desenvolvimento do melanoma não está totalmente esclarecido e tem sido associado à susceptibilidade genética e fatores predisponentes ambientais como a destruição da camada de ozônio e/ou alta exposição aos raios ultravioletas, principalmente UVB (TUCKER e GOLDSTEIN 2003; MORTON et al. 2003). A incidência do melanoma é predominante em indivíduos adultos de cor branca e é responsável por 25% dos casos de Câncer no Brasil. Esta neoplasia maligna possui mau prognóstico em estágios avançados além de ser reconhecida como um dos cânceres mais agressivos por apresentar alta propensão à metástase e por ser refratária ao tratamento com quimioterápicos (SALEEM, 2008). A crescente incidência de melanoma, seu elevado grau de malignidade e a ausência de uma terapia eficaz, têm motivado a comunidade científica em buscar modelos adequados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O uso de modelos murinos de melanoma já é bem estabelecido. As linhagens de células de melanoma murino da série B16 são modelos bem caracterizados para análise da progressão tumoral e avaliação de agentes anticancerígenos (DUNCAN, 1998). Embora seja difícil extrapolar diretamente para os seres humanos, são importantes ferramentas experimentais, pois possibilitam o estudo de novas drogas e novas estratégias terapêuticas.

O melanoma B16 foi obtido de um melanoma que desenvolveu espontaneamente em camundongo C57BL. O melanoma B16, provenientes do tumor, foram mantidos em cultura e denominados de B16-F0, bem como, mantida *in vivo*, pelo transplante subcutâneo das células do tumor em camundongos isogênicos C57BL. Diversas sublinhagens do melanoma B16 foram derivadas de células do tumor desses animais. As células B16 que cresceram em cultura após a

primeira seleção *in vivo* foram designadas como linhagem B16-F1, e essas células foram injetadas em novo grupo de animais isogênicos para selecionar a linhagem B16-F2. Após dez seleções, foi obtida a linhagem B16-F10, com maior capacidade de gerar metástase nos pulmões, comparadas a linhagem B16-F1 (NICOLSON *et al*, 1978; TANIGUCHI *et al*, 1985). A linhagem B16-F0 são menos invasivas comparadas as suas sublinhagens B16-F10 e B16-BL6 e a habilidade de formar metástases aumenta segundo a ordem: B16-F0<B16-F1< B16-F10=B16-BL6 (NAKAMURA *et al.*, 2002).

1.3 Sistema Imune e Câncer

O sistema imune atua como um sistema de reconhecimento que conta com a participação coordenada de seus componentes inatos e adaptativos a fim de gerar uma resposta imunológica efetiva. De uma forma simplificada, componentes moleculares e celulares atuam na geração de células efetoras que reconhecem e são eficientes para a eliminação de bioagentes patogênicos, como bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos (SCHREIBER, 2011). Por outro lado componentes moleculares e celulares do sistema imunológico podem atuar funcionalmente gerando tolerância, pela geração de mecanismos efetores e células efetoras com atividade imunorregulatória que impedem ou eliminam a geração células efetoras que reconhecem componentes moleculares e celulares constitutivos do nosso corpo evitando a geração de autoimunidade (KIM *et al*, 2007).

As células tumorais são originadas de células constitutivas no organismo, portanto, a função efetora do sistema imune para células tumorais seriam predominantemente tolerogênicos. De fato, a maioria dos tumores apresenta baixa imunogenicidade (KIM *et al* 2007,DUNN *et al*, 2005).

Na década de 50, foi descoberta uma população de células do sistema imune capaz de distinguir reconhecer uma célula maligna. Essa população de células foi denominada como células natural killer ou NK. Essas células reconhecem as células tumorais apresentam alteração na expressão de moléculas na membrana celular, a expressão reduzida de moléculas do MHC I ou marcadores que são expressos em células estressadas/neoplásicas como a elevação de expressão da molécula Fas ou uma molécula do MHC não clássicas como o NKG2, MICA e MICB. Esses achados levaram a hipótese da imunovigilância, onde as células NK eliminariam as células tumorais recém-transformadas (ZAMAI, 2005; CERWENKA, 2005).

Na década de 70-80, uma nova população de células do sistema imune capazes de eliminar células tumorais geradas por vírus oncogênicos, e foram denominadas de células T citotóxicas CD8⁺ e a sua capacidade para eliminar células tumorais está relacionado ao reconhecimento de antígenos virais expressos no tumor. Nessa mesma época, foi observado que mediadores inflamatórios e células da resposta imune inata poderiam favorecer a gênese de tumores ou mesmo, favorecer a progressão do tumor. Ainda, foi verificado que células tumorais podem inibir a resposta imunológica secretando mediadores imunorregulatórios e até mesmo a eliminação de células do sistema imune (SCHREIBER, 2011; COUSSENS e WERB, 2002).

Nas últimas duas décadas, estudos relacionando a inflamação e geração de células neoplásicas e a progressão do tumor, tem sido alvo de intensas investigações (SETHI, 2012; HANAHAN, 2011). Atualmente a resposta inflamatória tem sido relacionada como benéfica pelo restabelecimento da homeostase tissular. A inflamação protetora é auto-limitada, e ao ser induzida pela invasão de patógenos gera mecanismos eficientes para sua eliminar não causando injúria tissular, promovendo desta forma, a resolução da inflamação pela reparação tecidual. A resposta inflamatória patogênica ou prejudicial ao hospedeiro seriam aquelas excessivas pela perda ou redução dos mecanismos de controle ou as inflamações persistentes/crônicas e estão associados a patogênese de diversas doenças, incluindo as neoplasias, bem como, a progressão tumoral (COUSSENS e WERB, 2002; SETHI, 2012).

As inflamações descontroladas ou crônicas contribuiriam na gênese de células tumorais porque sendo um ambiente rico em células inflamatórias e mediadores inflamatórios, causariam estresse celular deste microambiente, levando a perda do controle homeostático por um excesso de sinais estimulatórios/fatores de crescimento ou mesmo estresse metabólico (SETHI, 2012; HANAHAN, 2011). A sinalização excessiva nessas células pode causar a perda do controle da expressão gênica e do mecanismo de reparo do DNA. O estresse metabólico na célula e os elementos participantes da inflamação geram radicais livres em excesso que provocam alterações estruturais no DNA e favorecem e/ou induzem mutações genéticas (COUSSENS e WERB, 2002; SETHI, *et al.* 2012).

Além disso, no ambiente inflamatório persistente há quantidades elevadas de fatores angiogênicos, presença de nutrientes e fatores que promovem a proliferação das células tumorais como a citocina IL-6, que é um dos mediadores inflamatórios anti-apoptótico que favorece a

promoção e a proliferação de diversas linhagens de células tumorais (HANAHAAN e WEINBERG, 2011; COUSSENS e WERB, 2002; SETHI *et al.* 2012) .

A inflamação também contribui para invasão tissular do tumor e geração de metástases tumorais. Os leucócitos inflamatórios presente no sítio tumoral como os macrófagos e neutrófilos parecem contribuir na invasão do tumor em metástase. Os macrófagos inflamatórios presentes no sítio tumoral secretam citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- α (SOLINAS *et al* 2010; NOONAN *et al.*, 2008; DINARELLO, 2006). Estas citocinas contribuem promovendo o crescimento do tumor, pois além de induzem a secreção pelos neutrófilos de metoproteinasas que degradam as fibras da matriz extracelular e permitem invasão tissular do tumor e metástase, elas também induzem a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais e células tumorais (BARLEON *et al*, 1996).

A geração de uma resposta imune protetora ao câncer é extremamente complexa e um desafio aos imunologistas. Na última década foi descoberto que a ativação resposta imune inata poderiam ser promovida pelas células tumorais. As células tumorais secretam padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs). Essas moléculas seriam reconhecidas por células da resposta imune inata, como macrófagos e células dendríticas, através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Uma vez ativadas, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são secretadas promovendo, entre outras coisas, a maturação de células dendríticas (BINDEA *et al.*, 2010; SOLINAS *et al* 2010; NOONAN *et al.*, 2008; DINARELLO, 2006).

As células dendríticas maduras podem capturar exossomos secretados por células tumorais que expressam MHCI contendo determinantes antigênicos dos tumores. Ainda, podem endocitar fragmentos de células tumorais lisadas ou mesmo proteínas secretadas ou solubilizadas pela clivagem de moléculas expressas na membrana das células tumorais e deste modo, as células dendríticas processam e apresentam determinantes antigênicos dos tumores em MHCII. Ao migrarem para órgãos linfóides (linfonodos) próximos ao tumor ou mesmo recircular via vasos linfáticos, entram na circulação sistêmica até atingir o baço, e desta forma ativam linfócitos T para tornarem células T efectoras CD4⁺ e CD8⁺ (DUDDA, 2005 ; BANCHEREAU, 2000).

Células T efectoras podem recircular e infiltrar no sítio tumoral. As mais eficiente na eliminação de células tumorais são predominantemente CD8⁺ e causam a morte das células tumorais pela liberação do conteúdo de seus grânulos como a perforina (causam citólise) e granzimas (induzem apoptose). Ainda células T efectoras CD8⁺ podem promover a apoptose das

células tumorais pela interação de moléculas expressas na membrana como o FasL com moléculas expressas em células tumorais como Fas (BINDEA *et al.*, 2010; AGGARWAL *et al.* 2006). As células T efetoras CD4⁺ como as Th1 secretam citocinas IL-2 e IFN γ , que são ativadoras de células NK. Esta célula ao migrar para o sítio tumoral lisam as células tumorais pela interação FasL-Fas e liberação de granzimas e perforinas. Células Th1 podem ainda ativar células B e diferenciá-las em plasmócitos produtores de anticorpos capazes de reconhecer antígenos expressos em células tumorais (TURCOTTE *et al.*, 2011; ZAMAI, 2007). A instabilidade genômica em células tumorais podem gerar sub- clones de células tumorais com características distintas, deste modo, células T efetoras CD8⁺ e anticorpos não seriam capazes de eliminar esses sub- clones de células tumorais. Deste modo, a atuação efetora do sistema imune selecionaria clones refratários de células T efetoras CD8⁺ e anticorpos causando a persistência do tumor. Esse fenômeno é conhecido como imunossobrevivência (DEMARIA 2011).

Certos eventos inibem a geração e a ação de mecanismos efetores que controlam os tumores. As células T efetoras CD8⁺ presentes no sítio tumoral, podem perder a sua capacidade funcional, pois a medida que envelhecem de 4-5 dias começam expressar a molécula CTLA-4, que podem interagir com moléculas B7 expressas em células dendríticas presentes no sítio tumoral (BANCHEREAU, 2000). Ainda, células T efetoras CD8⁺ e células NK ativadas podem ser inativadas por células presentes no sítio tumoral em progressão, como por exemplo, as células mielóides imaturas Gr-1⁺, que inibem as células T e NK pela geração de altos níveis de óxido nítrico (NO) (ZAMAI, 2007; SETHI *et al.* 2012). A inibição da indução de uma resposta imune contra as células tumorais está associada à inibição de células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e células B) presente no sítio tumoral, além dos mediadores secretados pelas células tumorais como prostaglandinas E2 e TGF- β , bem como, células T regulatórias CD4⁺ CD25⁺ (Treg) presentes no sítio inflamatório onde há progressão tumoral. As Treg podem inibir as APCs através de mediadores solúveis como TGF- β e IL-10 ou mesmo pelo contato das moléculas CTLA-4 que interagem com moléculas B7 em APCs (NISHIKAWA, 2010; CAO *et al.* 2007, XU *et al.* 2009). Deste modo, a impossibilidade da resposta imune controlar a progressão do tumor estaria associada à falência dos mecanismos efetores e inabilidade para induzi-las por um tempo prolongado. O segredo para controlar o tumor pela resposta imune, portanto, é tornar a resposta protetora gerada nas fases iniciais do Câncer e torna-las persistentes.

1.4 Mediadores lipídicos e Câncer

Os lipídios são macromoléculas biológicas altamente solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (FAHY *et al.*, 2005). São os principais constituintes estruturais das membranas biológicas e podem exercer atividade hormonal ou atuarem como mediadores capazes de agir sobre células alvo que apresentam receptores específicos. São conhecidos como moléculas de sinalização desde longa data e possuem a capacidade de estimular diferentes tipos de resposta fisiológica (HANNUN e OBEID, 2008).

A estrutura fundamental dos lipídeos é composta por ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeias hidrocarbonadas não ramificadas constituídas por 4 a 24 átomos de carbono. Aparecem no organismo como componentes de gorduras e lipídios de membrana. As propriedades dos ácidos graxos, como solubilidade e flexibilidade, são determinadas pelo tamanho da cadeia e grau de insaturação, sendo que ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, são mais flexíveis e solúveis que os saturados (KOOLMAN e ROHM, 2005)

Além da manutenção das membranas, os ácidos graxos poliinsaturados presentes nos fosfolipídios são também precursores da síntese dos eicosanóides. Os eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, canabinóides e fator agregador de plaquetas) são potentes mediadores lipídicos envolvidos em diversas funções homeostáticas e processos inflamatórios. São derivados do ácido araquidônico, que pela ação de fosfolipase são liberados os fosfolipídeos de membrana. Prostaglandinas e leucotrienos são gerados pela ação de isoenzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX) e lipoxigenase 5, 12, 15 (LO) (GOODMAN *et al.*, 2004, SOORY, 2002, BALSINDE, 2002, KOOLMAN, 2005).

FIGURA 1. Eicosanoides bioativos derivados da família Omega-6 (GREENE, HUANG ET al. 2011).

O metabolismo do ácido araquidônico é realizado pela via das cicloxigenases quando a cicloxigenases (COX) 1 e (COX) 2 convertem o ácido araquidônico em prostaglandina (PG)H₂. As isoenzimas catalisam dois passos de reações, primeiro ciclizando o ácido araquidônico a forma PGG₂ e segundo reduzindo a forma PGH₂. PG sintases de células específicas catalisa a conversão de PGH₂ em produtos finais biologicamente ativos incluindo PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ e tromboxano (TX)A₂, conhecidos coletivamente como prostanóides. (FUNK, 2001; ROCHA *et al.*, 2003).

O ácido araquidônico metabolizado por lipoxigenases (LOX) é convertido a ácidos hidroieicosanóides (HETEs) e leucotrienos (LTs). As lipoxigenases (5-LO, 12-LO e 15-LO) constituem família de enzimas citoplasmáticas, classificadas de acordo com a posição em que oxidam o ácido araquidônico (FUNK, 2001; ROCHA *et al.*, 2003). Dessa forma, a 5-lipoxigenase (5-LO) é aquela que oxida a insaturação em carbono-5 (C-5) deste ácido graxo

essencial, sendo a mais importante destas enzimas, pois promove a bioformação dos leucotrienos (PETERS-GOLDEN, 2000)

Para que se inicie a biosíntese dos leucotrienos é necessário que o ácido araquidônico se converta a um intermediário instável LTA₄ pela 5-lipoxigenases (5-LO) em conjunção com a proteína auxiliar FLAP (5-LO-activating protein). O leucotrieno A₄ pode ser hidrolisado e formar LTB₄ ou conjugar com a glutatona, para formar o LTC₄, que ao eliminar resíduos de glutamina e glicina, dá origem a LTD₄ e LTE₄, respectivamente. Os leucotrienos C₄, LTD₄ e LTE₄ são coletivamente chamados de cisteinil-leucotrienos (CysLTs) ou peptidoleucotrienos (HATTORI e LEVI, 1984; MEXMAIN *et al*, 1985).

FIGURA 2. Formação dos mediadores lipídicos a partir dos fosfolípidos de membrana (DING, X .;ADRIAN T.,2001)

Os leucotrienos são produzidos predominantemente por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos ativados, mastócitos e as células dendríticas (HARIZI *et al.*, 2003). Os leucotrienos são mediadores lipídicos que apresentam papel relevante, induzindo o processo inflamatório, ativando células para função efetora ou inibindo a função dessas células, (SPANBROEK *et al.*, 2000; PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005), além de influenciar a manutenção da homeostase tecidual (FUNK, 2001).

A produção excessiva de eicosanóides derivados do ácido araquidônico parece estar relacionada a muitos distúrbios autoimunes e em diversas doenças inflamatórias, incluindo asma, artrites, glomerulonefrite, doenças inflamatórias do intestino e hepatite aguda pelo recrutamento e estimulação de outras células inflamatórias (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005). Foram encontrados níveis significativamente superiores de eicosanóides em células malignas quando comparados aos níveis encontrados nos tecidos normais de vários órgãos como o pulmão, próstata, cólon, mama e pele (STEELE, 1999). Desta forma, eicosanóides estariam envolvidos no processo de carcinogênese relacionados com iniciação e promoção do Câncer, proliferação celular e metástase tumoral (FUNK, 2005). Ainda, foram demonstrados que vários eicosanóides promovem a sobrevivência celular de células tumorais, angiogênese, modulam a adesão e motilidade das células, aumenta a permeabilidade vascular e manutenção da inflamação, apresentando, deste modo, um importante papel na promoção e crescimento do tumor (NATHOO, 2004).

Há evidências que 5-LO e seus derivados produzidos pelas células tumorais poderiam atuar autocrinamente para promover sua proliferação, bem como, controlar a morte celular. O ciclo autócrino envolve formação de 5-HETE, um mecanismo pelo qual o ácido araquidônico regula o crescimento e a sobrevivência das células tumorais, desempenhando um importante papel na sobrevivência das células tumorais (GHOSH, 2004). Eicosanóides da série 5-LO estão implicados no desenvolvimento e progressão de Cânceres humanos, pois atuam como fatores críticos para a sobrevivência de células tumorais da próstata (GHOSH, 1998).

Os estudos com linhagens tumorais pancreáticas, mostram que a inibição da 5-LO, leva a uma diminuição significativa da proliferação celular e indução de apoptose nestas células, tanto *in vitro* como *in vivo* (ANDERSON *et al.*, 1998; TONG *et al.*, 2002; DING *et al.*, 1999). Ainda, o tratamento com inibidores de 5-LO em melanoma humano leva a redução significativa das

células tumorais, inibem a sua adesão em células endoteliais levando a redução de metástases (WANG, 2004).

O envolvimento de 5-LO e a formação de uma variedade de produtos metabólicos com diferentes papéis na gênese de células neoplásicas e na progressão do Câncer humano tem despertado interesse dos pesquisadores. Esta enzima pode representar uma nova e promissora abordagem terapêutica para diversos tipos de tumores. Por outro lado, o papel funcional dos leucotrienos produzidos pelas células somáticas normais ou mesmo a atuação desses mediadores em células do sistema imunológico adaptativo são pouco explorados e conhecidos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1 | Objetivo Geral: Investigar a relevância dos mediadores lipídicos (Leucotrienos) gerados pela enzima 5-LO na susceptibilidade ou resistência de camundongos ao Melanoma experimental com células tumorais B16-F0, ambos expressando H-2b (singênico), utilizando como modelo camundongos produtores de leucotrienos (129/Sv ou WT) e camundongos deficientes/"knockout" de 5-LO (129/Sv-*Alox5tm1Fun* ou 5-LO KO).

2.2 | Objetivos Específicos: Os diferentes grupos de camundongos implantados com melanoma B16-F0 serão analisados para os seguintes parâmetros:

- 1- Nível de expressão do gene para 5-LO em leucócitos peritoneais;
- 2- Crescimento Tumoral e a Mortalidade;
- 3- Perfil Qualitativo/Fenotípico e Quantitativo dos diferentes leucócitos do baço;
- 4- Padrão e os Níveis das diferentes citocinas produzidas pelas células do baço;

Análise in vitro com células esplênicas:

5- Avaliar o impacto da deficiência de 5-LO (Genética ou Inibição Farmacológica), no modelo de indução e atuação efetora das Células Citotóxicas ao Tumor ativadas por linfocinas/Lymphokine Activated Killer Cells (Células LAK).

MATERIAIS E MÉTODOS

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1| Animais: Neste trabalho, foram utilizados camundongos isogênicos 129/Sv (WT) e camundongos 129/Sv-*Alox5tm1Fun*, 5-Lipoxigenase “knockout” (5-LO KO), machos, com 4-6 semanas de idade e pesando entre 18-22g. Os animais (gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – FCFRP/USP) foram adquiridos do Biotério de Animais isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e mantidos em condições ambientais controlados e adequados (livre de patógenos específicos – SPF), com água e ração *ad libitum* no Biotério de Animais de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Os experimentos foram conduzidos em conformidade as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus USP- Ribeirão Preto e Comissão de Biossegurança da FCFRP/USP e aprovados sob protocolo de n. 10.1.1095.53.8.

3.2 Linhagens Celulares/Tumorais: As seguintes linhagens celulares foram usadas neste estudo: Melanoma B16-F0, proveniente de camundongos C57BL/6 haplótipo semelhante ao 129 (I-A^b), adquirido do Banco de Células do Rio de Janeiro/UFRJ e P815_IL-2, Mastocitoma de Camundongo transgênico para IL-2 (Secretor de altos níveis de IL-2), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Mengel (FIOCRUZ, RJ).

3.3| Meio de Cultivo Celular: Para a manutenção e realização de determinados ensaios com as diferentes linhagens/populações celulares utilizamos o meio RPMI 1640 completo ou RPMI-C, contendo 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomicina, 2.0 mM L-glutamina, 7.5% soro bovino fetal (SBF) e tamponado com 10 mM de ácido n-2 hidroxietilpiperazina-n-2-etano-sulfônico (HEPES) e 24 mM Bicarbonato de Sódio. Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen, SP, Brasil.

3.4| Implantação do Tumor (Melanoma B16-F0): Previamente, um dia antes de realizar o implante, 5-10 animais/grupo experimental tiveram parte da região dorsal anterior tricotomizada com auxílio de barbeador Panasonic (~1.5 cm/diâmetro). No dia do experimento, células do Melanoma B16-F0 em cultivo apresentando fase de crescimento exponencial, foram removidas

mecanicamente da superfície dos frascos de cultura com auxílio de “cell scrapper”, colocadas em tubos plásticos de 50 mL, lavadas 2x em Solução Salina tamponada com Fosfato 0,01M, pH=7.2-7.4 (PBS 1X) gelado à 1000rpm/10`/10°C, contadas e ajustadas na concentração de 10^6 células/mL de Solução Salina 0,9%. Cada animal foi implantado com uma suspensão contendo 10^5 células B16-F0/0,1mL Solução Salina 0,9% pela via subcutânea.

3.5| Avaliação do Crescimento Tumoral e Mortalidade: O crescimento do tumor foi monitorado a cada 2 dias após o implantação das células de melanoma B16-F0, medindo suas dimensões (mm) com auxílio de paquímetro (Mitutoyo, série 522). O volume da massa tumoral foi calculado conforme a fórmula V_t : altura x largura x comprimento/2, conforme descrito por Xu, Gu et al. 2004. A mortalidade dos animais foi acompanhada através da observação diária dos animais durante o todo o período de experimentação.

3.6| Obtenção de Células da Cavidade Peritoneal dos diferentes grupos de animais implantados com Melanoma: Os leucócitos da cavidade peritoneal foram obtidos para a análise da expressão de mRNA para 5-LO. Para tanto, 2 animais/grupo experimental do dia 0, 15, 20 e 30 após a implantação do tumor foram sacrificados pela instilação de CO₂. A cavidade peritoneal de cada animal foi lavada com 5 mL de Solução Salina tamponada com Fosfato 0,01M, pH=7.2-7.4 (PBS) gelado, contendo 5 UI/mL de Heparina Sódica com auxílio de seringa e agulha. O lavado peritoneal dos animais (individualmente) foram transferidos para tubos plásticos de 15 mL, lavadas 2x com PBS a 1000 rpm/10`/10°C e o número total de células obtidos pela contagem em câmara de Neubauer. Ao final da última lavagem o sobrenadante foi descartado e o “pellet” contendo 2×10^6 células transferidas individualmente para tubos tipo eppendorf de 2 mL estéril e armazenadas à -70°C para posterior utilização em análises pela técnica de PCR em tempo real.

3.7| Análise da expressão do mRNA para 5-LO em Células da Cavidade Peritoneal

3.7.1 Extração de RNA total: O RNA total de células do lavado peritoneal, provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais, foi extraído pelo método do *TRIzol® Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Ao “pellet” de células foi adicionado *TRIzol®* na proporção 3:4 (v/v) (250 µL de PBS + 750 µL de *TRIzol®*), 100 µg de glicogênio (USB, Cleveland, Ohio, EUA) e homogeneizado em vortex. Os tubos contendo as amostras das células foram incubados por 5 minutos em temperatura ambiente para a dissociação nucleoprotéica. Em seguida, 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen - Alemanha) foram adicionados aos tubos, seguido por agitação em vórtex durante 15 segundos e incubados por mais 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 x g a 4°C. Nesta etapa, a mistura é separada em uma fase inferior de coloração rosa (fase fenol-clorofórmio); uma interface; e uma fase superior, incolor (fase aquosa). A fase aquosa contendo RNA, das diferentes amostras, foi coletado e transferido para tubos novos.

Em seguida, RNA extraído das amostras foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Hessen - Alemanha) e incubação a -20°C *overnight*. Após esse período, a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi removido, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 x g a 4°C. O RNA, após secagem em tubo aberto, foi ressuspenso em 20 µL de água DEPC (dietil pirocarbonato) e estocado a -80°C. O RNA total das diferentes amostras foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific), considerando-se que 1 OD₂₆₀ é igual a 40µg/mL. O RNA também foi avaliado quanto à integridade por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese foi conduzida a 100 volts (V) durante 40 minutos e o gel foi corado com brometo de etídeo. A visualização das bandas 28S e 18S do RNA foi realizada expondo o gel em luz ultravioleta no transiluminador. Todas as amostras de RNA nos ensaios realizados se mostraram íntegras (dados não mostrados).

3.7.2 Obtenção de cDNA pela Técnica de Transcrição Reversa: O RNA total das células do lavado peritoneal das diferentes amostras foram transcritos em cDNA para a quantificação e comparação com os resultados do SAGE (Serial analysis of gene expression), utilizando-se o kit

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - USA). A reação foi preparada adicionando-se 5,0 µL de tampão RT (10X); 4,0 µL de mix de dNTP (100 mM); 5,0 µL *Random Primers* (10X); 0,15 µL de *RNase out*; 125 U da enzima *MultiScribe® MuLV reverse transcriptase*, 2 µg de RNA e água DEPC para um volume final de 50 µL. Em seguida, a reação foi colocada no termociclador e incubada seguindo as condições: 25°C durante 10 minutos e 37°C durante 120 minutos.

3.7.3 Análise dos genes expressos em células da Cavidade Peritoneal

3.7.3.1 Técnica de PCR em tempo real: Os resultados obtidos no SAGE foram validados por meio da quantificação relativa de alguns genes utilizando-se PCR quantitativa em tempo real. A metodologia empregada para a PCR quantitativa em tempo real foi *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - USA). A metodologia de *TaqMan®* consiste na utilização de *primers* específicos para o gene de interesse, bem como uma sonda de hidrólise, que se liga com especificidade ao fragmento amplificado. A cada ciclo de reação, a sonda se liga ao fragmento a ser amplificado, e é degradada devido a atividade 5'→3' exonuclease da enzima *Taq* polimerase. Com isso, a sonda emite fluorescência dada pelo fluorocromo FAM® (comprimento de onda de 520 nm) que é captada pelo filtro, do aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA). A intensidade de fluorescência é proporcional ao número de fragmentos amplificados. Os resultados da PCR em tempo real foram analisados pelo software *Sequence Detection System V1.3 System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA). Para tanto, utilizou-se na reação 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 µL de sonda gene-específica (20X); 2,0 µL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água DEPC para um volume final de 10 µL. Todas as reações com amostras foram realizadas em duplicata. O gene utilizado para a validação foi: 5-lipoxigenase (Alox5)- Mm 01182743_ m1. A normalização dos genes estudados foi realizada empregando-se a média geométrica dos Cqs dos seguintes genes de referência: *β-actina (ACTB)*- NM _007393, *GAPDH* (4310884-E) e *beta-2-microglobulin (B2M)* (4333766-0710013) (VANDESOMPELE et al., 2002).

3.7.3.2 Cálculo da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): O cálculo da expressão relativa dos genes foi obtido empregando-se o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001). Primeiramente, calculou-se o ΔCt , subtraindo-se a média geométrica dos Cqs dos genes de referência do Cq do gene alvo. A mediana dos ΔCt s do grupo controle foi utilizada como calibrador para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$, subtraindo-se o ΔCt do gene alvo por esse valor. A seguir, elevou-se 2 à negativa de $\Delta\Delta Ct$, como a seguir:

$$\Delta Ct = Cq \text{ do gene alvo} - \text{média geométrica dos Cqs dos genes de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ do gene alvo} - \text{mediana dos indivíduos controles (calibrador)}$$

$$\text{Expressão Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.8| Obtenção de Células Esplênicas/Esplenócitos: Para essa finalidade, 2 animais/grupo experimental nos dias 0, 15, 20 e 30 após a implantação do tumor foram sacrificados pela instilação de CO_2 e os baços removidos cirurgicamente. Os esplenócitos de cada animal foram obtidos por divulsão do baço em peneiras de aço inox com porosidade de 0,01mm em 4 mL de meio RPMI-C. Em seguida, as células foram lavadas por 2x a 1000rpm/10"/10°C, contadas/viabilidade em Azul de Trypan, ressuspensas em meio RPMI na concentração de 10×10^6 células/mL e utilizadas para fins experimentais (NOMIZO et al., 2005).

3.9| Obtenção de Sobrenadantes de Cultura de Esplenócitos: Preparações de células esplênicas dos diferentes grupos experimentais obtidas conforme descrito acima foram ressuspensas a uma concentração de 10×10^6 células/mL em meio completo RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis) suplementado com 10% SBF (Gibco, Brasil), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (2-ME; Sigma Chemical Company, St. Louis), 20 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Company, St. Louis) e 20 µg/mL de sulfato de gentamicina (Shering-Plough, Rio de Janeiro) [RPMI-C]. Para a obtenção dos sobrenadantes de cultura, as células esplênicas foram acondicionadas em placas estéreis de 24 poços, na concentração de 10×10^6 células/mL/poço. As

placas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Os sobrenadantes foram colhidos após 48 horas de incubação e mantidos a -70°C para posterior análise de presença de citocinas (NOMIZO et al., 2005).

3.10 | Quantificação de citocinas pelo Sistema Multiplex/Cytometric Bead Array (CBA) em Citômetro de Fluxo (CBA): A presença das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-6, TNF e IL-17A foi avaliada, utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA): Mouse Th1/Th2/Th17 da BD Biosciences, catálogo 560485. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Previamente todas as amostras de sobrenadantes de cultura de esplenócitos em quadruplicata (2 amostras do exp.1 e 2 amostras do exp.2), foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizados em vórtex.

3.10.1 Preparação das amostras Padrão/Controle de Citocinas: Os padrões citocinas liofilizadas foram reconstituídos com 2,0 mL de diluente de ensaio e deixados por pelo menos 15 minutos para o equilíbrio, evitando agitar. Em seguida, os padrões foram colocados dentro de um tubo cônico de 15 mL e etiquetados como Top Standard (20000 pg/mL). Tubos novos foram etiquetados e arrumados em ordem de diluição 1:2/ 1:4/ 1:8/ 1:16/ 1:32/ 1:64/ 1:128/ 1:1256. Em seguida pipetou-se 300 μ L de diluente de ensaio em cada tubo, efetuando-se uma diluição seriada, transferindo 300 μ L do tubo Top Standard para o tubo de diluição 1:2 para o tubo 1:4 e assim sucessivamente até 1:256. Por fim preparou-se um tubo contendo diluente de ensaio para servir como controle negativo (0 pg/mL).

3.10.2 Procedimento do Ensaio: Previamente tubos apropriados para citometria de fluxo (Tubos tipo Cristal) foram etiquetados para a amostra da curva padrão, amostra controle negativo e para as amostras experimentais a serem testadas. Em seguida, 50 μ L de solução das Beads de Captura e anticorpos de detecção foram colocadas aos diferentes tubos. Dando sequência, 50 μ L de solução de amostra foram adicionados aos seus respectivos tubos. O conteúdo dos tubos foi delicadamente misturado e incubado por 2 horas à temperatura ambiente, protegidos da luz. Ao findar do período de incubação, cada tubo foi acrescido de 1 mL de Tampão de Lavagem (wash Buffer) e centrifugado a 200g/5'/t.a. O sobrenadante dos tubos (contendo os anticorpos de detecção em excesso) foi descartado por inversão dos tubos e o “pellet” contendo as Beads

gentilmente homogeneizados manualmente. Finalmente, 300 µL do tampão de lavagem (wash Buffer) foram adicionados aos tubos contendo as diferentes amostras. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo [FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA] utilizando como parâmetros: FL₂ (Ac detecção) x FL₃ (Beads de Captura). A obtenção da Curva Padrão e determinação dos níveis das diferentes citocinas analisadas foram obtidas utilizando o software FCAP Array™ (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

3.11 | Análise do Perfil Fenotípico dos Esplenócitos Os leucócitos do baço foi analisado quanto aos marcadores fenotípicos expressos na membrana celular por Citometria de Fluxo (FACS). Para a análise do fenótipo de superfície, amostras individuais de esplenócitos dos diferentes grupos experimentais foram suspensas na concentração de 1×10^6 células/mL em Solução de PBS, contendo 2% de SBF e 0,1% de azida sódica (Solução Salina Tamponada para FACS/ST_FACS). Em seguida, alíquotas da suspensão celular (200µL/poço) foram colocadas em placas de 96 poços/fundo em U. As células foram centrifugadas a 2000rpm/15 segundos, o sobrenadante descartado pela inversão da placa e o pellet de células desfeito pela agitação da placa em Vortex (Lavagem das células). As células contidas nos poços foram incubadas com 30 µL de ST_FACS contendo anticorpos anti-FcRγ/Fc-block (BD-Biosciences, CA, USA), por 30´/4°C. Ao findar da incubação, 100µL de ST_FACS foram colocadas nos poços e as células lavadas 1x. Em seguida, as células foram marcadas, adicionando aos poços 30µL ST_FACS contendo anticorpos monoclonais relevantes conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), r-ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila (PerCP) ou Cychrome (Cy): 143-2C11(anti-CD3), H129.19 (anti-CD4), 53-6.7 (anti-CD8), MB19-1 (anti-CD19), 7D4 (anti-CD25), KM114 (anti-CD44), 16A (anti-CD45RB), MEL-14 (anti-CD62L, PK136 (anti-NK1.1), RB6-8C5 (anti-Gr-1/Ly6G), HL3 (anti-CD11c), AF6-120.1 (anti-IAb), HL3 (anti-CD11c), 16-10A1 (anti-CD80/B7.1), GL1 (anti-CD86/B7.2), adquiridos da [BD Biosciences, CA] e CI:A3-1 (anti-F4/80), adquirido da [Serotech, Raleigh, NC] ou anticorpos (isotipo) controles e incubados por 30´/4°C/Protegidos da luz. Após marcação, as células foram lavadas por mais 2x vezes com 200 µL de ST_FACS, transferidas para tubos de FACS contendo 500µL de PBS e analisadas em Citômetro de Fluxo (FACSCanto - Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Para cada amostra foram adquiridos 20.000 células, utilizando os detectores e canais adequados para a leitura de cada

fluorocromo. A análise dos resultados foram realizado utilizando o software FACS DIVA™ (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

3.12| Obtenção de Sobrenadantes de Cultura rico em rIL-2: Para tanto, o P815_IL-2, Mastocitoma de Camundongo transgênico para IL-2 (Secretor de altos níveis de IL-2) foi cultivado com meio RPMI-C em garrafas de cultivo celular 175 cm² em Estufa de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Os sobrenadantes de cultura (~20 mL/garrafa) foram coletados a cada 48h e armazenadas em frasco estéril a 4°C. O “pool” de sobrenadantes coletados (~ 500 mL) foi filtrado em membranas de 0,22 µm de diâmetro, os níveis de IL-2 determinados pelo CBA (200 ng/mL), aliquotadas em tubos de 2 mL e congelados a -20 °C. Para fins experimentais utilizamos o sobrenadante rico em rIL-2 diluídos a 10% (20 ng/mL).

3.13 | Ensaios de Indução e Avaliação da Atividade de Células LAK

3.13.1 Indução de Células LAK: Preparações de células esplênicas provenientes de camundongos WT ou 5-LO KO foram suspensas em meio RPMI-C a uma concentração de 1×10^6 células/mL e semeadas em placas de 24 poços e cultivadas por 48 h em estufa de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, na presença de: meio ou 10% de sobrenadante rico em IL-2 (20 ng/mL) [1-2 placas de 24 poços para cada grupo experimental]. Em determinados experimentos utilizamos somente células esplênicas de camundongos WT, que semelhantemente foram cultivadas com: Meio, 1 µM de MK886 (Calbiochem, San Diego, CA), 0,1 µM de MK886, 10% de sobrenadante rico em IL-2 (20 ng/mL), 10% de sobrenadante rico em IL-2 (20 ng/mL) e 1 µM de MK886 ou 10% de sobrenadante rico em IL-2 (20 ng/mL) e 0,1 µM de MK886. Ao findar do período de cultura as células LAK geradas nas diferentes condições experimentais foram coletadas, lavadas 2x com RPMI-C a 1000 rpm/10°C, a viabilidade checada pelo corante vital Azul de Trypan e ressuspensas em meio RPMI-C na concentração de 2×10^6 células LAK/mL e utilizado em ensaio, como descrito por Hiroshi Kamago, 1998.

3.13 | Avaliação da Atividade de Células LAK (Atividade Citotóxica) em Células do Melanoma B16-F0: O ensaio de Atividade Citotóxica usando um método não radioativo foi

realizado onde a determinação da atividade citotóxica das células efetoras (células LAK) é medida analisando sua capacidade de causar lise celular e a liberação de lactato Desidrogenase (LDH) das células Alvo (Melanoma B16-F0) para o meio extracelular (kit Cytotox 96- Promega, catálogo G1780). O ensaio foi realizado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Assim, previamente as células tumorais B16-F0 mantidas em cultura sub confluenta (fase exponencial de crescimento), foram removidas dos frascos de cultivo celular pela adição de solução de tripsina-EDTA (2.5 g/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluídas 1:10 em solução salina 0,9%, lavadas 2x com RPMI-C a 1000 rpm/10"/10°C, a viabilidade checada pelo corante vital Azul de Trypan, ressuspensas em meio RPMI-C na concentração de 2×10^5 células/mL. A seguir, 10^4 células tumorais B16-F0/50µL/poço (Células Alvo) foram semeadas em 3 placas de 96 poços/fundo distintas denominadas de (placas A, C e D) e incubadas por 1 hora em Estufa de CO₂ a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Após esta incubação, os meios dos poços de cultivo celular de todas as placas foram removidos e repostos com: 50µL de meio RPMI-C fresco (placa C), 50µL de meio RPMI-C fresco (placa D) ou 50µL de meio RPMI-C contendo diferentes quantidades de células LAK/Efetoras [2×10^5 ; 1×10^5 ; 5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$; $1,125 \times 10^4$ ou $0,5625 \times 10^4$] (placa A). Deste modo, o ensaio foi realizado com as seguintes proporções de Células Efetora/Alvo: [20:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, 1,125:1 e 0,5625:1]. Paralelamente, uma nova placa (placa B) foi semeada com 50µL de meio RPMI-C/poço, contendo as diferentes concentrações de células LAK. Em seguida todas as placas foram centrifugadas a 250 G, 4°C por 5 minutos e incubadas por 4 horas a 37°C e 5% CO₂ e 95% de ar. 45 minutos antes do término da cultura, 10 µl de solução de lise foram adicionados aos poços da placa D. Em determinados experimentos o ensaio foi realizado na presença de MK886 (0,1 µM ou 1 µM) no meio de cultura onde 6 novas placas foram acrescentados ao ensaio. Ao findar do tempo de cultivo, todas as placas foram centrifugadas a 250 g/5"/4°C. Em seguida, 50µL dos sobrenadantes dos poços das diferentes condições de cultivo celular foram transferidos para novas placas de 96 poços, respectivamente (placas A, B, C e D). Aos poços das novas placas, contendo os sobrenadantes das diferentes condições e de cultivo celular, foram adicionados 50µL da solução contendo substrato para LDH (fornecida pelo kit). Todas as placas foram novamente incubadas por 30"/T.A/Escuro. Ao termino deste período, a reação foi interrompida através da adição de 50µL/poço da Solução de Bloqueio/Solução de Acido Acético 1M (fornecida pelo kit). A

presença do efeito citotóxico sobre as células nas diferentes condições de ensaio foi determinada medindo-se a quantidade do produto colorido, gerado pela atividade LDH sobre o substrato, em espectrofotômetro (490 nm). A atividade de células LAK específica sobre as células tumorais B16-F0, foi calculada da aplicando a seguinte fórmula: % de citotoxicidade em células tumorais B16-F0 = $(A - B - C) / (D - C) \times 100$, onde A e o valor de O.D nos sobrenadantes provenientes do co-cultivo de células efetoras/células alvo (atividade citolítica Experimental), B e o valor de O.D obtidas nos sobrenadantes provenientes de cultura somente de células LAK (citólise espontânea/basal em células LAK), C e o valor de O.D obtidas nos sobrenadantes provenientes da cultura somente de células tumorais B16-F0 (citólise espontânea/basal em células tumorais B16-F0) e D e o valor de O.D obtidas nos sobrenadantes provenientes da cultura células tumorais B16-F0 100 % lisadas (citólise total das células tumorais B16-F0).

3.14 | Análise Estatística: Os resultados experimentais são representativos de um experimento de dois realizados de forma independente com resultados semelhantes e foram expressos como média $\pm$ Desvio Padrão (SD) das amostras em duplicata/triplicata. A comparação das curvas de sobrevivência foi analisada aplicando o Teste Log-rank (Mantel-Cox) e Teste Gehan-Breslow-Wilcoxon. A análise comparativa dos dados obtidos com os diferentes grupos experimentais foi realizada aplicando o Teste de Análise de Variância (TwoWay-ANOVA), seguido do teste corretivo de Bonferroni. Valores de $p < 0,01$, foram considerados significativo. A análise estatística foi feita no software PRISM 5 for Windows (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Os leucócitos da cavidade peritoneal provenientes de animais implantados com Melanoma B16-F0 apresentam aumento da expressão do gene responsável pela codificação da 5-LO (Alox5).

Inicialmente realizamos experimentos que mostrassem uma evidência consistente e que apoiasse a nossa hipótese sobre a relevância da enzima 5-LO em animais implantados com melanoma B16-F0. O nosso resultado da análise da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real indica que as células do lavado peritoneal provenientes de animais WT implantados com melanoma B16-F0 apresentam níveis de expressão aumentada do gene Alox5 (FIGURA 3). Verificamos que a expressão deste gene nestes animais, aumenta gradativamente com o decorrer da doença, sendo que a maior expressão acontece no 30º dia após implantação com o tumor (30º dia p.i), onde a expressão desse gene é seis vezes maior, quando comparado aos níveis expressos em animais controle. Ainda, como o esperado, foi observado que as células do lavado peritoneal provenientes de animais 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0, não expressam o gene Alox5/5-LOX, indicando claramente que a utilização deste animal como modelo no presente estudo seria pertinente.

FIGURA 3. Níveis de expressão do gene Alox5/5-LOX em leucócitos da cavidade peritoneal obtidos de camundongos implantados com Melanoma B16-F0. As células da cavidade peritoneal foram coletadas dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2 por grupo experimental). Os níveis de expressão do gene Alox5/5-LOX foi analisada pela técnica de PCR em tempo real, conforme descrito no item 3.7 em Material e Métodos. Os valores numéricos da figura representam a expressão relativa do gene obtidas a partir da determinação do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os dados mostrados na figura são representativos de um experimento de dois realizados, com resultados semelhantes.*animais 129 controle vs. animais 129 implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.2. Os animais deficientes de 5-LO são mais eficientes no controle do tumor e apresentaram significativo aumento na sobrevivência.

Os nossos resultados de monitoramento do crescimento do tumor em animais implantados com células do Melanoma B16-F0 indicaram que a média do volume do tumor em camundongos 5-LO KO foi significativamente menor comparado aos volumes observados em camundongos WT, pois apresentou um volume tumoral final de $\sim 1300 \text{ mm}^3$, diferindo significativamente do volume tumoral final de $\sim 3000 \text{ mm}^3$ apresentados pelos camundongos WT (FIGURA 4). Ainda, de forma importante, nossos dados indicam que os animais 5-LO KO seriam mais eficientes no

controle da massa tumoral comparados aos animais WT, pois foi observada uma dimensão mínima e precisa para determinar o volume do tumor (~4 mm) somente 25 dias p.i, enquanto que, os animais WT apresentaram tumores com volume mínimo/mensurável a partir do 13° dia p.i.

FIGURA 4. Perfil da progressão do volume tumoral em camundongos WT e 5-LO KO implantados com células tumorais B16-F0. Camundongos WT e 5-LO KO (n=10) foram implantados com 10^5 células B16-F0, pela via s.c. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$ *.

Os nossos experimentos de observação da sobrevivência dos diferentes grupos de animais implantados com células do Melanoma B16-F0 (FIGURA 5) mostrou que os animais WT começam a morrer mais precocemente (23° dia p.i), comparativamente ao início da mortalidade observada em animais 5-LO KO (26° dia p.i). Além disso, verificamos que 100% dos animais implantados com células do Melanoma B16-F0 morreram, no entanto, os animais 5-LO KO sobreviveram por mais tempo, 38 dias, enquanto que animais WT sobreviveram somente por 33 dias.

FIGURA 5. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com célula tumora B16-F0. Camundongos WT e 5-LO KO (n=10) foram implantados com 10^5 células B16-F0, pela via s.c. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$ *.

4.3. Animais 5-LO KO portadores de Melanoma, comparados ao grupo de animais WT, apresentam menos células NKT, elevação numérica de Neutrófilos (15 e 30 dias p.i), números reduzidos de Macrófagos (15 e 20 dias p.i) e elevação numérica mais tardia das células NK.

A análise do perfil fenotípico de células presentes no baço de animais implantados com Melanoma B16-F0 indica que animais WT e animais 5-LO KO apresentam diferenças qualitativas e quantitativas em células do Sistema Imune Inato (FIGURA 6).

Mais especificamente observamos que comparativamente, animais 5-LO KO apresenta um aumento considerável de células Gr-1⁺/Neutrófilos no 15º dia p.i e numericamente superiores no 30º dia p.i (FIGURA 6A). Outra diferença significativa foi verificada em células F4/80⁺/Macrófagos, onde os animais WT apresentaram números significativamente maiores 15 e 20 dias p.i (FIGURA 6B).

Ademais, nossos resultados indicam que animais WT implantados com Melanoma B16-F0 apresentam uma elevação numérica e gradativa de células NK1.1⁺/Células NK no 15º e 20º dia p.i. Diferentemente em animais 5-LO KO a elevação numérica e gradativa de células NK ocorre somente no 20º e 30º dia p.i (FIGURA 6C). Finalmente, nossos resultados indicam que animais WT controles ou portadores de Melanoma apresentam maiores números de células CD3⁺NK1.1⁺/Células NKT comparados aos animais 5-LO KO (FIGURA 6D).

FIGURA 6. Perfil fenotípico das diferentes populações de leucócitos esplênicos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do Melanoma B16-F0. Os dados da figura expressam os valores obtidos pela análise de populações celulares do baço dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2, por grupo experimental). Os fenótipos de esplenócitos foram obtidos pela análise em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.11 em Material e Métodos. Os dados representam os resultados de um experimento dentre dois realizados com resultados similares. *Obtidos pela comparativa de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.4. Camundongos 5-LO KO implantados com Melanoma, diferentemente dos camundongos WT, geram maior número de células apresentadoras de antígeno/APCs, predominantemente com fenótipo IAb⁺CD19⁺ e expressando preferencialmente CD80⁺/B7.1.

As nossas análises indicam diferenças qualitativas e quantitativas de uma importante população de células pertencentes ao Sistema Imune Inato (células apresentadoras de antígeno/APCs), com propriedades instrutivas e ativadoras de células do Sistema Imune Adaptativo como os linfócitos T, presentes no baço dos camundongos implantados com Melanoma B16-F0 (FIGURA 7). Essas diferenças se fazem evidentes e especificamente 15° dias p.i, (FIGURA 7A), onde foi observado que camundongos 5-LO KO apresentam maior elevação numérica de APCs (IAb⁺) e APCs (IAb⁺CD19⁺), marcadores presentes em Células B apresentadoras de antígeno e Células Dendríticas Plasmocitóides. Proporcionalmente nossos dados indicam que camundongos portadores de Melanoma expressam predominantemente este tipo de APCs (IAb⁺CD19⁺). No entanto, enquanto os camundongos WT apresentam também um significativo aumento de APCs (IAb⁺CD11c⁺), marcador de Células Dendríticas Mielóides, Os camundongos 5-LO KO geram majoritariamente APCs com o fenótipo (IAb⁺CD19⁺). De forma importante, a análise de APCs expressando as diferentes isoformas de moléculas co-estimulatórias B7 mostram que camundongos WT apresentam elevação numérica semelhantes de APCs expressando B7.1 (CD80⁺) e APCs expressando B7.2 (CD86⁺). Diferentemente, camundongos 5-LO KO apresentam elevação numérica predominantemente de APCs expressando B7.1 (CD80⁺) (FIGURA 7A). Nos dias 20 e 30 p.i, verificamos que os animais implantados com melanoma apresentam uma significativa redução no número de APCs, no entanto, não observamos diferenças significativas entre os animais WT comparados aos animais 5-LO KO (dados não mostrados).

FIGURA 7. Perfil fenotípico das células apresentadoras de antígeno presentes no baço dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do Melanoma B16-F0. Os dados da figura expressam os valores obtidos pela análise de populações celulares do baço dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2, por grupo experimental). Os fenótipos de esplenócitos obtidas pela análise em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.11 em Material e Métodos. A linha tracejada representa os números de APCs observados em esplenócitos controle. Os dados representam os resultados de um experimento dentre dois realizados com resultados similares. .*Obtidos pela comparativa de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.5. Animais 5-LO KO, mas não animais WT, apresentam expansão de Linfócitos T, Linfócitos T CD4⁺, Linfócitos T CD8⁺ e Linfócitos B na fase inicial pós-implantação com Melanoma B16-F0 (15 dias).

Semelhantemente ao verificado em populações de células do Sistema Imune Inato (FIGURA 6 e 7), os animais WT/B16-F0 e os animais 5-LO KO/B16-F0 apresentam diferenças quantitativas de células do Sistema Imune Adaptativo, como verificado nas diferentes populações de linfócitos esplênicos (FIGURA 7). Nossos resultados indicam que há uma redução numérica nas populações de linfócitos e é uma característica bem evidente dos animais WT/B16-F0, principalmente na fase avançada da doença (30^o dia p.i, onde numericamente são inferiores aos encontrados em animais controles), para Linfócitos B (CD19⁺), Linfócitos T (CD3⁺), Linfócitos T CD4⁺ e Linfócitos T CD8⁺ (FIGURA 8). Por outro lado, animais 5-LO KO/B16-F0 são caracterizados por apresentar expansão numérica de Linfócitos B CD19⁺, Linfócitos T CD3⁺, Linfócitos T CD4⁺ e Linfócitos T CD8⁺ 15 dias p.i (FIGURA 8). Animais WT/B16-F0 apresentam uma tendência para a expansão de Linfócitos T (CD3⁺), Linfócitos T CD4⁺ e Linfócitos T CD8⁺ 15 dias p.i, pois esse aumento não se mostrou significativo estatisticamente. Ainda, podemos observar que a elevação numérica dos Linfócitos T CD8⁺ em animais 5-LO KO/B16-F0 atinge o seu pico 20 dias p.i (FIGURA 8D). A redução numérica e gradativa, semelhante aos observados em animais WT, porém menos acentuada, também foi observado em animais 5-LO KO/B16-F0 30 dias p.i para Linfócitos B CD19⁺ (FIGURA 8A), Linfócitos T CD3⁺ (FIGURA 8) e Linfócitos T CD4⁺ (FIGURA 8C).

FIGURA 8. Perfil fenotípico das diferentes populações de linfócitos esplênicos de camundongos WT e 5-LO KO implantados com células do Melanoma B16-F0. Os dados da figura expressam os valores obtidos pela análise de populações celulares do baço dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2, por grupo experimental). Os fenótipos de esplenócitos obtidas pela análise em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.11 em Material e Métodos. Os dados representam os resultados de um experimento dentre dois realizados com resultados similares. *Obtidos pela comparativa de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.6. Os esplenócitos provenientes de camundongos 5-LO KO implantados com células tumorais diferem dos esplenócitos provenientes de camundongos WT pela sua capacidade de produção rápida e em níveis elevados de IL-6, TNF α e IFN- γ e por produzirem menores níveis de IL-10.

Nesse estudo observamos que comparativamente os animais 5-LO KO na fase inicial (15 dias) após serem implantados com células tumorais apresentam maiores números de células APCs, predominantemente com fenótipo I-A^{b+}CD19⁺ e expressando preferencialmente B7.1, portanto expressando características essenciais para a estimulação de linfócitos T (FIGURA 7). De fato, observamos que esses animais nessa mesma fase são caracterizados por apresentar a expansão numérica de Linfócitos T CD3⁺, Linfócitos T CD4⁺, Linfócitos T CD8⁺ (FIGURA 8B, 8C e 8D). No entanto, é conhecido que a capacidade instrutiva para a geração preferencial de linfócitos T ativados/efetores com características e propriedades funcionais eficientes para o controle do antígeno indutor estaria diretamente associada ao perfil qualitativo e quantitativo das citocinas presentes durante a ativação dos linfócitos T. A análise das citocinas produzidas pelos esplenócitos provenientes de animais WT e animais 5-LO KO 15 dias p.i, apresentam perfis diferentes (FIGURA 9). Nossos resultados indicam que esplenócitos provenientes de camundongos 5-LO KO, comparados aos provenientes de camundongos WT, produzem maiores níveis de IL-6, TNF α e IFN- γ e menores níveis de IL-10 (FIGURA 9).

FIGURA 9. Níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO 15 dias após a implantação de células tumorais B16-F0. 10×10^6 esplenócitos/mL, dos diferentes grupos de animais 15 dias após serem implantados com células tumorais ($n=2$, por grupo experimental) foram cultivados por 48h em meio RPMI-C. Os níveis de citocinas nos sobrenadantes foram quantificados pelo método Cytometric Bead Array (CBA) em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.10 em Material & Métodos. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. A linha tracejada representa os níveis de citocinas produzidos pelos esplenócitos controle. *Obtidos pela análise comparativa de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p<0,01$.

4.7. Camundongos 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0 diferem dos camundongos WT implantados com Melanoma B16-F0 pela propriedade dos seus esplenócitos produzirem predominantemente e em maiores níveis citocinas padrão Th1 (IFN γ) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α), mas não citocinas padrão Th2 (IL-10).

Os resultados expressos na Figura 10 indicam que, os esplenócitos de camundongos implantados com Melanoma B16-F0 produzem maiores níveis de citocinas na fase inicial (15 dias) após serem implantados com células tumorais quando comparados a fases mais avançadas, 20 e 30 dias, bem como, que apresentam capacidade para produção em níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α) e citocinas do padrão Th1 (IFN γ), comparados aos níveis de produção das citocinas do padrão Th2 (IL-10, não observamos níveis detectáveis de IL-4) e IL-17A.

Ainda, verificamos que esplenócitos de camundongos WT/B16-F0 e camundongos 5-LO KO/B16-F0 apresentam perfis temporais e/ou quantitativo diferenciados. Nossos dados experimentais mostram claramente que comparativamente, os esplenócitos de camundongos 5-LO KO/B16-F0 produzem maiores níveis de citocinas do padrão Th1 (IFN γ , IL-2 30 dias p.i) (FIGURA 10B e 10D) e apresentam reduzida capacidade para produção de citocinas do padrão Th2 (IL-10) (FIGURA 10C e 10D). Ainda, produzem maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, 15 dias p.i; TNF α , 15 e 30 dias p.i e menos IL-17A, 30 dias p.i. Os resultados da análise global de citocinas (Média Geométrica) do animais implantados com Melanoma B16-F0, corroboram com a análise quantitativa, indicando que comparativamente, camundongos 5-LO KO/B16-F0 produzem mais citocinas pró-inflamatórias/Efectoras (IL-6, TNF α e IFN γ) e menos citocinas anti-inflamatórias/inibitórias, como a IL-10 (FIGURA 10D). Em conjunto os resultados mostrados na FIGURA 9 e FIGURA 10, sugerem que células esplênicas dos animais 5-LO KO/B16-F0 funcionalmente estariam direcionadas e capacitadas para produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, citocinas do padrão Th1, mas não do padrão Th2.

FIGURA 10. Níveis de citocinas Th1/Th2/Th17 em sobrenadantes de cultura de esplenócitos provenientes dos camundongos WT e 5-LO KO implantados com células tumorais B16-F0. 10×10^6 esplenócitos/mL dos animais com 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais ($n=2$, por grupo experimental) foram cultivados por 48h em meio RPMI-C. Os níveis de citocinas nos sobrenadantes foram quantificados pelo método Multiplex/Cytometric Bead Array (CBA) em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.10 em Material & Métodos. Os dados expressos na Figura 10D, representa a média $\pm$ desvio padrão, obtidos pela somatória total das diferentes citocinas produzidas por esplenócitos dos animais com 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais. A figura representa os dados de um experimento de dois realizados com resultados semelhantes. *Obtidos pela análise comparativa de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.8. Animais 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0, comparados aos animais WT, geram mais rapidamente e em maior número Linfócitos T $CD4^+$ e Linfócitos T $CD8^+$ ativados.

Verificamos em nosso estudo que há diferenças no perfil de citocinas Th1/Th2 produzidos pelos esplenócitos provenientes de animais WT e animais 5-LO KO/B16-F0 (FIGURA 9 e 10). Ademais, observamos uma tendência ou aumento significativo no número de Linfócitos T ($CD3^+$), Linfócitos T $CD4^+$ e Linfócitos T $CD8^+$ nesses animais (FIGURA 8). As evidências da literatura mostram que citocinas Th1 e citocinas Th2 levam a estimulação de sub-populações de linfócitos T, bem como, a diferenciação terminal de células T efetoras funcionalmente distintas. Estas informações despertaram nossa curiosidade para analisar o perfil de células T esplênicas ativadas expressando fenótipo CD45RB ou CD44.

Nossos resultados mostraram que a implantação de células tumorais B16-F0 em camundongos leva a elevação numérica de linfócitos T esplênicos ativados expressando o marcador CD45RB [capacidade para migração para tecidos não linfoides] ou CD44 (FIGURA 11). Observamos que os linfócitos T ativados estão presentes em maior número em células $CD4^+$ comparado aos números observados em células $CD8^+$. Observamos que a presença numérica mais acentuada de linfócitos T esplênicos ativados $CD45RB^+$ ($CD4^+CD45RB^+$ e $CD8^+CD45RB^+$) 15 dias p.i, e que em fases mais tardias, 20 e 30 dias p.i, essas populações reduzem gradualmente (FIGURA 11A) e (FIGURA 11C), respectivamente. Diferentemente, a elevação numérica mais pronunciada de linfócitos T ativados $CD44^+$ ($CD4^+CD44^+$ e $CD8^+CD44^+$) são observados somente mais tardiamente, no dia 20 p.i. (FIGURA 11B) e (FIGURA 11D), respectivamente.

De forma importante nossos dados mostram que, comparativamente aos animais WT/B16-F0, animais 5-LO KO/B16-F0 apresentam maiores números de linfócitos T ativados expressando o marcador CD45RB (FIGURA 11A e 11C). Essa elevação numérica mais acentuada de linfócitos T ativados em animais 5-LO KO/B16-F0 também pode ser observada para linfócitos expressando CD44 15 dias p.i (FIGURA 11B e 11D). Ainda, nossos resultados indicam que, a elevação numérica de linfócitos T ativados $CD44^+$ em animais WT/B16-F0 ocorreria mais tardiamente (20 dias p.i), quando comparados aos animais 5-LO KO/B16-F0, onde essa população de linfócitos T são encontradas em número significativamente aumentadas com 15 dias p.i (FIGURA 11B e 11D).

FIGURA 11. Perfil fenotípico das populações de linfócitos T esplênicos ativados, presentes em camundongos WT ou 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0. Os dados da figura expressam os valores obtidos pela análise de populações celulares do baço dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2, por grupo experimental). O fenótipo de esplenócitos foi obtido pela análise em citômetro de fluxo, conforme descrito no item 3.11 em Material & Métodos. Os dados representam os resultados de um experimento de dois realizados com resultados similares. *Obtidos pela análise de animais 129 implantados com tumor vs. animais 5-LO KO implantados com tumor. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.9. Linfócitos T CD4⁺ e Linfócitos T CD8⁺ efetores são gerados mais rapidamente e em maior número em animais 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0, quando comparados aos animais WT.

Finalmente, analisamos as populações de linfócitos T diferenciados terminalmente ou linfócitos T efetores esplênicos em nosso modelo de Melanoma Experimental. Essas populações de linfócitos são de extrema importância, pois, a sua atuação funcional em última instância é responsável pela susceptibilidade ou resistência dos animais ao tumor.

Nossos dados mostram que a implantação do Melanoma B16-F0 em camundongos induz a geração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras expressando o fenótipo [CD44^{high}] ou [CD44^{high}CD62L^{low}, linfócitos T de Memória Efetora ou linfócitos T efetores capazes de migrar para o sítio tumoral] (FIGURA 12). Ainda, observamos que linfócitos T CD4⁺ efetores (FIGURA 12A e 12B) são numericamente maiores comparados a população de linfócitos T CD8⁺ efetores (FIGURA 12C e 12D).

Importantemente, nossas análises mostram que, animais 5-LO KO/B16-F0, comparativamente aos animais WT/B16-F0, apresentam um maior número de linfócitos T CD4⁺ efetores 15 dias p.i (FIGURA 12A e 12B) e linfócitos T CD8⁺ efetores 15 e 20 dias p.i (FIGURA 12C e 12D). Ademais, observamos que a elevação numérica mais acentuada de linfócitos T efetores em animais 5-LO KO/B16-F0 ocorre mais precocemente, 15 dias p.i, comparado aos animais WT/B16-F0 onde os números mais pronunciados dessas células são encontradas mais tardiamente, 20 dias p.i (FIGURA 12).

FIGURA 12. Perfil fenotípico das populações de linfócitos T esplênicos efetores, presentes em camundongos WT ou 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0. Os dados da figura expressam os valores obtidos pela análise de populações celulares do baço dos animais com 0, 15, 20 e 30 dias após implantação de 10^5 células tumorais (n=2, por grupo experimental). O fenótipo de esplenócitos foi obtido pela análise em Citômetro de Fluxo, conforme descrito no item 3.11 em Material & Métodos. Os dados da FIGURA 12B e 12D indicam o percentual de células $CD44^{high}CD62L^{low}$ presentes na população de células esplênicas $CD4^+$ ou $CD8^+$, respectivamente. Os dados representam os resultados de um experimento de dois realizados com resultados similares. *Obtidos pela análise de esplenócitos em animais 129/B16-F0 vs. esplenócitos em animais 5-LO KO/B16-F0. Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.10. Células LAK derivadas dos esplenócitos provenientes de animais 5-LO KO são mais eficientes para exercer atividade citotóxica sobre o Melanoma B16-F0, comparadas à atividade de Células LAK derivadas dos esplenócitos provenientes de animais WT.

Os nossos experimentos *in vivo*, indicam que animais 5-LO KO seriam mais eficientes para controlar o Melanoma B16-F0, porque a deficiência de leucotrienos nesses animais estaria possibilitando a geração de uma resposta imune efetora/protetora maior e mais rápida. Para tornar nossos achados mais consistentes, realizamos experimentos *in vitro* para analisar a geração e a atividade funcional de células efetoras/células LAK na presença ou ausência (deficiência genética ou pela inibição farmacológica da 5-LO) de leucotrienos.

Para tanto, primeiramente avaliamos a atividade de células LAK geradas pela cultura de esplenócitos provenientes de animais WT ou animais 5-LO KO na presença de IL-2. Nossos dados indicam que tanto as células LAK/WT, derivadas de esplenócitos provenientes de animais WT ou células LAK/5-LO KO, derivadas de esplenócitos provenientes de animais 5-LO KO, apresentam atividade citotóxica em células do Melanoma B16-F0 (FIGURA 13). Verificamos que a atividade citotóxica das células LAK/WT e células LAK/5-LO KO são semelhantes (~40%) onde há grande número de células efetoras/células alvo (20:1), no entanto, quando verificamos a eficiência das células LAK diminuindo a proporção de células efetoras (10:1; 5:1 e 2,5:1), observamos que a atividade citotóxica das células LAK/5-LO KO é significativamente mais elevada, quando comparado ao verificado para células LAK/WT (FIGURA 13). Ainda, quando comparado à atividade citotóxica basal de esplenócitos cultivados somente na presença de meio (controle), verificamos que as células LAK/WT apresentam atividade citotóxica significativamente maior, somente quando há proporções mais elevadas de células efetoras (20:1 e 10:1). Diferentemente, a atividade citotóxica das células LAK/5-LO KO, comparados a atividade observada em células controle, mostraram significativamente maiores em todas as proporções de células efetoras testadas nesse estudo, 20:1, 10:1; 5:1 e 2,5:1 (FIGURA 13).

Atividade Efetora das Células LAK

FIGURA 13. Atividade de células LAK derivadas de esplenócitos provenientes de animais WT ou 5-LO KO cultivadas na presença de IL-2. Os dados da figura expressam a atividade citotóxica (%) de células LAK geradas pelo cultivo dos esplenócitos de animais WT ou 5-LO KO na presença de IL-2 e analisada pelo ensaio Cyto Tox 96, conforme descrito no item 3.13 em Material & Métodos. Os valores representam a média $\pm$ SD de cada grupo experimental (realizados em duplicata), obtidos de dois experimentos realizados independentemente. *(análise das células LAK/5-LO KO vs. células LAK/WT); #(análise das células LAK/5-LO KO vs. células 5-LO KO controle ou células LAK/WT vs. células WT controle). Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

4.11. A inibição da 5-LO pelo MK886 não afeta a geração de células LAK mas, aumenta significativamente a atividade citotóxica das células LAK em células do Melanoma B16-F0.

Nesses experimentos finais, avaliamos o efeito da deficiência de leucotrienos pela inibição farmacológica da 5-LO com o MK886, na geração das células LAK ou na atividade citotóxica de células LAK, derivadas de esplenócitos provenientes de animais WT (FIGURA 14). Os nossos resultados expressos na FIGURA 14A, indicam que inibição da 5-LO pelo tratamento na cultura com 0,1 μ M ou 1 μ M de MK886 não afeta significativamente a geração de células LAK pela IL-2, pois, a atividade citotóxica das células LAK obtidas na ausência ou presença de MK886 sobre células do Melanoma B16-F0 se mostraram semelhantes em todas as proporções de células efectoras testadas nesse estudo, 20:1, 10:1; 5:1 e 2,5:1.

Diferentemente, nossos resultados mostram que a atividade citotóxica das células LAK sobre células do Melanoma B16-F0 aumenta significativamente pela inibição da 5-LO na cultura, pelo tratamento com 0,1 μ M ou 1 μ M de MK886, quando comparados à atividade das células LAK obtida na presença somente de meio na cultura (FIGURA 14 B). A eficiência aumentada da atividade citotóxica das células LAK tratadas com MK886 foi observada em condições onde há proporções numéricas maiores de células efectoras/células alvo 20:1, 10:1 e 5:1. Os nossos resultados mostram que a atividade citotóxica das células LAK tratadas com MK886 na proporção 20:1 é 25% mais eficiente comparada atividade verificada em células LAK controle (FIGURA 14B).

FIGURA 14. Efeito do tratamento com MK886 na geração e atividade efetora das células LAK derivadas de esplenócitos. Os dados da Figura 14A mostram a atividade citotóxica (%) de células LAK

geradas pelo cultivo dos esplenócitos de animais WT com IL-2, tratadas ou não com MK886. Os dados da Figura 14B mostram a atividade citotóxica (%) de células LAK na presença ou ausência de MK886 na cultura. A atividade citotóxica foi analisada pelo ensaio Cyto Tox 96, conforme descrito no item 3.13 em Material & Métodos. Os valores representam a média $\pm$ SD de cada grupo experimental (realizados em duplicata), obtidos de dois experimentos realizados independentemente. *(análise das células LAK vs. células LAK/MK886). Foi considerado significativo valores de $p < 0,01$.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste presente trabalho investigamos a relevância dos mediadores lipídicos (Leucotrienos) gerados pela enzima 5-LO na susceptibilidade ou resistência de camundongos ao Melanoma experimental com células tumorais B16-F0, utilizando como modelo camundongos produtores de leucotrienos (129_WT) e camundongos geneticamente deficientes/"knockout" de 5-LO (129_5-LO KO). O nosso modelo ainda merece ser destacado, pois, diferente de outros modelos de melanoma experimental que utilizam células tumorais de melanoma alogênicos (H-2 diferentes), nesse estudo utilizamos uma linhagem tumoral singênico (H-2 semelhantes). Tornando assim, o nosso modelo mais próximo de um melanoma "endógeno" em desenvolvimento no próprio animal.

De forma inédita apresentamos evidências diretas que a atividade da enzima 5-LO seria relevante durante a resposta do hospedeiro frente ao melanoma experimental em camundongos. Esta afirmação é sustentada pela observação da elevada expressão do mRNA de 5-LO que os leucócitos peritoneais de camundongos 129 apresentam após serem implantados com células tumorais do melanoma B16-F0 (FIGURA 3). Nosso conjunto de resultados mostra que comparativamente aos animais produtores de 5-LO os animais deficientes de 5-LO são mais eficientes no controle da progressão do Melanoma (FIGURA 4) e apresentam significativo aumento na sobrevivência (FIGURA 5).

A maior eficiência dos camundongos 5-LO KO no controle do crescimento do melanoma implantado corrobora com os resultados demonstrados em trabalhos anteriores, em que o bloqueio da 5-LO *in vitro* favorece a morte por apoptose em diversas linhagens tumorais (MACCARRONE *et al.*, 1997; LIM *et al.*, 2010). Recentes demonstrações indicam que o bloqueio farmacológico da 5-LO ou mesmo o bloqueio do principal mediador lipídico gerado por essa enzima, o LTB₄, provoca alterações importantes na resposta inflamatória gerada no local de implantação do Melanoma, pois inibe a progressão da massa tumoral (BACHI *et al.*, 2009). De forma importante, nossos resultados apresentam pela primeira vez dados bastante consistentes indicando que a deficiência de 5-LO possibilitaria o camundongo gerar uma Resposta Imunológica mais rápida e eficiente no controle do tumor quando comparados aos camundongos WT.

Para tanto, nossas observações consistiram em observar os diferentes grupos de animais implantados com melanoma em diferentes fases: 15 dias após implantação do tumor (15 dias p.i) os animais WT já apresentam tumor evidente/mensurável e animais 5-LO KO não (FIGURA 4); 20 dias após implantação do tumor (20 dias p.i) os animais 5-LO KO ainda não apresentam tumor evidente enquanto que neste mesmo período os animais WT já começam a morrer; 30 dias após implantação do tumor (30 dias p.i) os animais WT apresentam grande taxa de mortalidade e é somente neste período que os animais 5-LO KO já apresentam tumor com volume mensurável e alguns animais começam a morrer.

Deste modo, os nossos resultados mostram que animais 5-LO KO, deficientes de Leucotrienos e portadores de Melanoma, comparados ao grupo de animais WT apresentam diferenças numéricas e qualitativas em componentes da resposta Imune Inata. Ao analisarmos as células de um órgão linfóide secundário central/sistêmico como o baço (FIGURA 6), observamos que a eficiência no controle do tumor em animais 5-LO KO correlaciona com a presença de números reduzidos de células NKT (em todo período da doença), Macrófagos (15 e 20 dias p.i) e números aumentados de Neutrófilos (15 e 30 dias p.i). Embora existam trabalhos mostrando que células NKT seriam importantes para o controle do tumor (GODFREY *et al.* 2004); (GUMPERZ 2004); (SHIMIZU *et al.* 2007) nossos dados corroboram com a recente descoberta que mostra que as células NKT podem atuar como células regulatórias inibindo a geração de uma resposta protetora ao Melanoma B16 mediada por linfócitos T CD8⁺ (DURGAN *et al.*, 2011). Ainda, nossos resultados estão de acordo com observações anteriores, mostrando que a presença de um número aumentado de macrófagos na fase inicial ou menos avançada do Melanoma estaria relacionado com a progressão mais agressiva do tumor (NONOMURA *et al.*, 2007; TASKINEN *et al.*, 2008), bem como, a elevação numérica de neutrófilos poderiam estar associado ao melhor controle inato e desta forma gerando uma resposta adaptativa mais eficiente para o controle do tumor (LE BITOUX, 2008).

As nossas análises de uma importante população de células pertencentes ao Sistema Imune Inato presentes no baço dos camundongos implantados com Melanoma B16-F0, as APCs, que tem propriedade ativadora e instrutiva em células do Sistema Imune Adaptativo como os linfócitos T, indicam que o eficiente controle do tumor em animais 5-LO KO correlaciona com a presença de maior número de APCs (15 dias p.i), predominantemente com fenótipo I-A^{b+}CD19⁺ e expressando preferencialmente B7.1 (FIGURA 7), portanto expressando características

essenciais para a estimulação de linfócitos T. De fato, observamos que esses animais nessa mesma fase são caracterizados por apresentar a expansão numérica de Linfócitos T CD3⁺, Linfócitos T CD4⁺, Linfócitos T CD8⁺ (FIGURA 8B, 8C e 8D).

A presença de um número aumentado de APCs tem sido correlacionado em diversos modelos onde há uma melhor eficiência imunológica para o controle do melanoma, que seja em modelos onde se avalia a relevância de quimiocinas como o MCP-1 (NAKASONE *et al.*, 2012), bem como, modelos de desenvolvimentos de vacinas baseado na terapia com células dendríticas anti-tumorais (APETOH *et al.*, 2011; GILBOA, 2007; ZITVOGEL *et al.*, 1996).

O marcador CD19⁺ está presente em uma população de APCs minoritárias (~ 3-5%), denominada de Células Dendríticas Plasmocitóides e ela está relacionada a um pior prognóstico nos modelos de Câncer Experimental e Pacientes Humanos (TREILLEUX, 2004), bem como, linfócitos B apresentadores de antígeno (TZEHOVAL, 1983). Embora nossos resultados não possam descartar a presença de Células Dendríticas Plasmocitóides em nosso modelo, o número aumentado de APCs CD19⁺ (~27%) correlaciona com o número aumentado de Células B (FIGURA 8A). Os resultados indicando a presença aumentada de linfócitos B com propriedade apresentadora de antígeno corroboram com a recente evidência que APC derivada de células B são fundamentais para geração de uma resposta imune potente e eficiente para o controle do Melanoma (PENAFUERTE *et al.*, 2012) e ainda guardada as diferenças entre modelos experimentais e pacientes humanos portadores de Melanoma, nossos resultados corroboram com a importante demonstração que pacientes com número aumentado no sangue de linfócitos B expressando preferencialmente CD80⁺, mas não CD86⁺ apresentam melhor prognóstico ao Melanoma (MARTÍNEZ-ESCRIBANO *et al.*, 2003, TREILLUX, 2004).

É conhecido que a capacidade instrutiva para a geração preferencial de linfócitos T ativados/efetores com características/propriedades funcionais eficientes para o controle do antígeno (Melanoma B16-F0), estaria diretamente associada ao perfil qualitativo e quantitativo das APCs, bem como, das citocinas presentes durante a ativação dos linfócitos T. Os nossos resultados mostram claramente que animais 5-LO KO, 15 dias p.i, diferentemente dos animais WT que já apresentam progressão tumoral evidente, apresentam esplenócitos com capacidade diferenciada para produção aumentada de IL-6, TNF α e IFN- γ e menores níveis de IL-10 (FIGURA 9).

A presença aumentada de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF α e citocinas Th1 como o IFN- γ associada à reduzida capacidade de produção de IL-10 está diretamente relacionado à geração de uma resposta potente e protetora, gerando desta forma, bom prognóstico em modelos experimentais de Melanoma (KURAISHY *et al.*, 2011; ZAMARRON e CHEN, 2011; LE BITOUX e STAMENKOVIC, 2008; TSUDA, 2011).

Nossos dados indicam que a ausência de Leucotrienos estaria favorecendo a produção de IFN- γ . De fato isso tem sido mostrado como uma habilidade de animais 5-LO KO, verificado no modelo de Schistosomíase (SECOR *et al.* 1998), Toxoplasmose (ALIBERTI *et al.* 2002), Tuberculose (BAFICA *et al.* 2005), Strongiloidíase (MACHADO *et al.* 2005) e Doença de Chagas (CANAVACI, 2006). Os Linfócitos T humanos normais estimulados com anti-CD3 e cultivadas na presença de antagonista do receptor de Cis-Leucotrienos, (Montelukast-MNT) apresentam capacidade para produção de IFN- γ (SPINOZZI *et al.* 2004). Ainda em alguns desses e outros modelos de infecção/Inflamação também tem verificado que a resistência de animais 5-LO KO está relacionada ao aumento da produção de IFN- γ como verificado na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (CANAVACI, 2006); Schistosomíase (SECOR *et al.* 1998), Toxoplasmose (ALIBERTI *et al.* 2002), Tuberculose (BAFICA *et al.* 2005) e na Fibrose pulmonar (PETERS-GOLDEN *et al.* 2002).

Níveis aumentados de TNF- α foram observados em camundongos 5-LO KO com 15 dias p.i concomitante com níveis elevados de IFN- γ . Este mesmo perfil também foi observado em camundongos 5-LO KO infectados com *Trypanosoma cruzi* (CANAVACI, 2006). Nossa hipótese é de que o aumento nos níveis de TNF- α nesses modelos possivelmente estaria sendo estimulado pelo IFN- γ , um potente indutor de TNF- α (DINARELLO *et al.* 1986; ARENZANA-SEISDEDOS *et al.* 1987; HART *et al.* 1988).

Os nossos resultados mostrando que camundongos 5-LO KO resistentes ao Melanoma apresentam reduzida capacidade de produção de IL-10 (Figura 10). Dados similares têm sido observados no controle eficiente do *Schistosoma mansoni* pelos camundongos 5-LO KO e está relacionado a menor produção de IL-10 (SECOR *et al.* 1998). Ainda, nossos dados indicam que a capacidade aumentada para produção de IFN- γ e diminuída para produção de IL-10 em camundongos 5-LO KO 15 dias p.i, ou seja, em uma fase onde há condições ideais para indução/geração da resposta efetora anti-tumoral, estaria relacionada ao melhor controle do tumor

por esses animais. Esse perfil com altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 também foram observados e associados à geração de uma resposta imune protetora de camundongos 5-LO KO durante a Infecção pelo Trypanosoma cruzi (CANAVACI, 2006).

De fato, nossos resultados mostram que camundongos 5-LO KO implantados com Melanoma B16-F0 é mais eficiente no controle da massa tumoral (15-20 dias p.i) e se diferem dos camundongos WT implantados com Melanoma B16-F0 pela propriedade dos seus esplenócitos produzirem predominantemente e em maiores níveis citocinas padrão Th1 (IFN γ) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF α), mas não citocinas padrão Th2 (IL-10), indicando que células esplênicas dos animais 5-LO KO/B16-F0 funcionalmente estariam direcionadas e capacitadas para produção de altos níveis de citocinas do padrão Th1, mas não, padrão Th2 (FIGURA 10). De forma importante, nossos dados corroboram com os dados consistentes da literatura mostrando que a presença aumentada de células Th1 e reduzidas das células Th2 está associada à resposta protetora ao Melanoma (BECKER *et al.*, 2009; BYRNE *et al.*, 2011; CÔTÉ *et al.*, 2011).

Os nossos resultados indicam que a maior eficiência dos animais deficientes de 5-LO em controlar o Melanoma, comparados aos animais WT, está associada à presença aumentada de APCs, I-A^{b+}CD19⁺CD80⁺ (TREILLEUX, 2004) e citocinas predominantemente Th1. Essa característica está relacionada diretamente com a maior presença de células T ativadas esplênicas CD4⁺CD45RB⁺, CD4⁺CD44⁺, CD8⁺CD45RB⁺ e CD8⁺CD44⁺ (FIGURA 11), na fase em que esses animais apresentam um eficiente controle do crescimento tumoral (15-20 dias p.i), além de gerar mais rapidamente e em maior número (15 dias p.i) de linfócitos T efetores esplênicos CD4⁺CD44^{high}, CD8⁺CD44^{high} e linfócitos T efetores esplênicos com habilidade para recircular pelos vasos linfáticos e migrar para o sítio tumoral CD4⁺CD44^{high}CD62L^{low} e CD8⁺CD44^{high}CD62L^{low} (FIGURA 12). Esses resultados correlacionam aos relatos anteriores, reforçando que a eficiência da resposta imune para o controle do melanoma está associada à habilidade do hospedeiro, seja em modelo experimental ou em paciente humanos, gerar uma resposta imune adaptativa com potente perfil Th1, a presença aumentada de linfócitos T ativados e linfócitos T efetores CD4⁺ e principalmente CD8⁺ (BYRNE *et al.*, 2011; CÔTÉ *et al.*, 2011; NAKASONE *et al.*, 2012).

Embora tenha sido relatado anteriormente que a deficiência de 5-LO e consequentemente de leucotrienos, favorecem células tumorais entrarem em apoptose (ANDERSON *et al.*, 1998; TONG *et al.*, 2002; DING *et al.*, 1999), nossos resultados *in vitro*, corroboram com nossas observações *in vivo* e pela primeira vez indicam que a atividade citolítica de células efetoras, constituídas por sua maioria de linfócitos T, como as células LAK (FIGURA 13,14), seriam afetadas positivamente pela deficiência de leucotrienos, tornando-as mais efetivas para exercer citotoxicidade sobre as células tumorais como verificado para o Melanoma B16-F0 (FIGURA 13,14).

Ainda, especulamos que a possível presença de LTB₄ gerados pela 5-LO em animais WT poderia levar a estimulação de receptores estimulados por proliferadores de peroxissomos α PPAR- α (DEVCHAND, *et al.* 1996) induzindo a produção de Heme Oxidase 1 (HO-1), um potente indutor de monóxido de carbono (CO) que está relacionado a supressão da atividade dos linfócitos T (MOUGIAKAKOS 2011), bem como células da resposta imune inata pela inibição do NF- κ B (WAYMAN *et al.* 2002). De fato, animais WT apresentam menor número ou mesmo retardo na geração de linfócitos T ativados, linfócitos T efetores (FIGURA 10) e apresentam uma queda bem mais acentuada nos números de linfócitos T e neutrófilos após a implantação do Melanoma B16-F0 (FIGURA 8).

A morte dos animais portadores de melanoma em nosso modelo é intrigante e merece uma investigação mais apropriada. Uma característica geral desses animais está relacionada à perda de controle da massa tumoral, possivelmente porque na presença ou ausência de leucotrienos, esses animais apresentam níveis elevados de IL-6, uma citocina relacionado em promover a proliferação de células tumorais, inibir a apoptose de células tumorais e apresentar propriedades angiogênica (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2010; GRIVENNIKOV *et al.*, 2008), já que não conseguem manter aumentado o número de linfócitos T efetores (FIGURA 12). A perda do controle precoce da massa tumoral e morte dos animais WT, mas não animais 5-LO KO, é explicada pela incapacidade de gerar uma resposta imune protetora e apresentarem uma profunda deficiência de linfócitos T naive e estimulados, devido a presença de leucotrienos (FIGURA 11).

Por outro lado, animais 5-LO KO apesar de apresentarem determinadas populações de linfócitos T ativados e efetores acima dos níveis basais, e por este motivo menor massa tumoral,

apresentam maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Este perfil de citocinas poderia levar a diversos efeitos hemodinâmicos relacionados com a letalidade dos animais como injúria renal e aumento da permeabilidade vascular como observados em animais IL-10 KO infectados com *Trypanosoma cruzi* (HOLSCHER *et al.* 2000) e choque séptico (PAIVA *et al.* 2003).

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostram que a atuação funcional da enzima 5-LO, possivelmente pela geração de leucotrienos, modulam negativamente a capacidade de camundongos para a geração de uma resposta Imune eficiente no controle do Melanoma B16-F0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.;SHISHODIA, S., *et al.* Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochem Pharmacol**, Houston, v. 72. p.1605-1621, Nov 2006.

ALBINI, A. SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat Rev Cancer**, Milan, v. 7. p. 139-147, Feb 2007.

ALIBERTI, J. SHER, A. Role of G-protein-coupled signaling in the induction and regulation of dendritic cell function by *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect**, v. 4. p. 991-997, Jul. 2002.

ANDERSON, K. M.;SEED, T., *et al.* Five-lipoxygenase inhibitors reduce Panc-1 survival: the mode of cell death and synergism of MK886 with gamma linolenic acid. **Anticancer Res**, Chicago v. 18. p. 791-800, Mar-Apr. 1998.

APETOH, L.;LOCHER, C., *et al.* Harnessing dendritic cells in cancer. **Semin Immunol**, Dijon, v. 23. p. 42-49, Feb.

ARENZANA-SEISDEDOS, F.;TEYTON, L., *et al.* Immunoregulatory mediators in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol Suppl**, v. 66. p. 13-17, 1987.

BACHI, A. L.;KIM, F. J., *et al.* Leukotriene B4 creates a favorable microenvironment for murine melanoma growth. **Mol Cancer Res**, São Paulo, v. 7. p. 1417-1424, Sep 2009.

BAFICA, A.;SCANGA, C. A., *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med**, v. 202. p. 1715-1724, Dec 2005.

BAFICA, A.;SCANGA, C. A., *et al.* Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest**, Maryland, v. 115. p. 1601-1606, Jun 2005.

BANCHEREAU, J.;BRIERE, F., *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, Dallas v. 18. p. 767-811, 2000.

BALDUS, S. E.;ZIRBES, T. K., *et al.* Increased galectin-3 expression in gastric cancer: correlations with histopathological subtypes, galactosylated antigens and tumor cell proliferation. **Tumour Biol**, v. 21. p. 258-266, Sep 2000.

BALSINDE, J.;WINSTEAD, M. V., *et al.* Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett**, Valladolid, v. 531. p. 2-6, Oct 2002.

BARLEON, B.;SOZZANI, S., *et al.* Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood**, v. 87. p. 3336-3343, Apr 1996.

BINDEA, G.;MLECNIK, B., *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Curr Opin Immunol**, Paris, v. 22. p. 215-222, Apr 2010.

BOADO, R. J.;PARDRIDGE, W. M., *et al.* Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in human brain tumors: evidence for the expression of a multitranscript family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89. p. 9044-9048, Oct 1992.

BYRNE, K. T.;COTE, A. L., *et al.* Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8+ memory T cell responses to mouse melanoma. **J Clin Invest**, Lebanon, v. 121. p. 1797-1809, May

BYRNE, W. L.;MILLS, K. H., *et al.* Targeting regulatory T cells in cancer. **Cancer Res**, Ireland., v. 71. p. 6915-6920, Nov.

CANAVACI, A. M.;BUSTAMANTE, J. M., *et al.* In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-Trypanosoma cruzi compounds. **PLoS Negl Trop Dis**, Athens, v. 4. p. e740.

CAO, Q.;WANG, L., *et al.* Downregulation of CD4+CD25+ regulatory T cells may underlie enhanced Th1 immunity caused by immunization with activated autologous T cells. **Cell Res**, China., v. 17. p. 627-637, Jul. 2007.

CERWENKA, A.;FALK, C. S., *et al.* NK cells--from basic research to cancer therapy. **Eur J Immunol**, Institute for Immunology, INF 305, 69120 Heidelberg, Germany., v. 37. p. 1161-1164, May. 2007.

COTE, A. L.;BYRNE, K. T., *et al.* Protective CD8 memory T cell responses to mouse melanoma are generated in the absence of CD4 T cell help. **PLoS One**, New Hampshire, v. 6. p. e26491.

COTE, A. L.;ZHANG, P., *et al.* Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens. **J Immunol**, Lebanon, v. 186. p. 275-283, Jan .

COUSSENS, L. M. WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, California, v. 420. p. 860-867, Dec 2002.

DEMARIA, S. Defining the role of the immune system in cancer treatment: highlights from the Immunotherapy Conference. **Expert Rev Anticancer Ther**, New York, v. 11. p. 841-843, Jun 2011.

DEVCHAND, P. R.;KELLER, H., *et al.* The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, Switzerland., v. 384. p. 39-43, Nov 1996.

DINARELLO, C. A. The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, Denver, v. 25. p. 307-313, Sep 2006.

DING, X. Z.;KUSZYNSKI, C. A., *et al.* Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, Omaha, v. 266. p. 392-399, Dec 1999.

DING X.; ADRIAN T. Role of lipoxygenase pathways in the regulation of pancreatic cancer cell proliferation and survival. **Inflammopharmacology California**, Vol. 9, No. 1,2, pp. 157–164 (2001)

DUDDA, J. C.;LEMBO, A., *et al.* Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. **Eur J Immunol**, Germany. v. 35. p. 1056-1065, Apr 2005

DUNCAN, K. HEALD, P. Cutaneous T-cell lymphoma: centuries of controversy. **Semin Cutan Med Surg**, New Haven, v. 17. p. 133-140, Jun 1998.

DUNN, G. P.;BRUCE, A. T., *et al.* A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. **Nat Immunol**, Department of Pathology and Immunology, Center for Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, USA., v. 6. p. 722-729, Jul. 2005.

DURGAN, K.;ALI, M., *et al.* Targeting NKT cells and PD-L1 pathway results in augmented anti-tumor responses in a melanoma model. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60. p. 547-558, Apr

FAHY, E.;SUBRAMANIAM, S., *et al.* A comprehensive classification system for lipids. **J Lipid Res**, San Diego, v. 46. p. 839-861, May 2005.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, Philadelphia, v. 294. p. 1871-1875, Nov 2001.

GHOSH, J. Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium: reversal by metabolites of arachidonate 5-lipoxygenase. **Biochem Biophys Res Commun**, Detroit, v. 315. p. 624-635, Mar 2004.

GHOSH, J. MYERS, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Charlottesville,v. 95. p. 13182-13187, Oct 1998.

GILBOA, E. DC-based cancer vaccines. **J Clin Invest**, Miami, v. 117. p. 1195-1203, May 2007.

GODFREY, D. I.;MACDONALD, H. R., *et al.* NKT cells: what's in a name? **Nat Rev Immunol**, Australia., v. 4. p. 231-237, Mar 2004.

GOODMAN, J. E.;BOWMAN, E. D., *et al.* Arachidonate lipoxygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk. **Carcinogenesis**, Bethesda, v. 25. p. 2467-2472, Dec 2004.

GREENE, E. R.;HUANG, S., *et al.* Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 96. p. 27-36, Nov 2011.

GREENMAN, C.;STEPHENS, P., *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. **Nature**, Hinxton, v. 446. p. 153-158, Mar 8. 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.;GRETEN, F. R., *et al.* Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, San Diego, v. 140. p. 883-899, Mar.

GROSSMAN, D. ALTIERI, D. C. Drug resistance in melanoma: Mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. **Cancer and Metastasis Reviews**, Altieri, v. 20. p. 3-11, 2001.

GUMPERZ, J. E. CD1d-restricted "NKT" cells and myeloid IL-12 production: an immunological crossroads leading to promotion or suppression of effective anti-tumor immune responses? **J Leukoc Biol**, Madison, v. 76. p. 307-313, Aug 2004.

HANAHAN, D. WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144. p. 646-674, Mar 2011.

HANNUN, Y. A. OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Charleston, v. 9. p. 139-150, Feb 2008.

HARIZI, H.;JUZAN, M., *et al.* Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B₄ production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. **J Immunol**, France., v. 170. p. 139-146, Jan 2003.

HART, P. H.;WHITTY, G. A., *et al.* Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. **J Immunol**, Australia., v. 141. p. 1516-1521, Sep 1988.

HATTORI, Y. LEVI, R. Negative inotropic effect of leukotrienes: leukotrienes C₄ and D₄ inhibit calcium-dependent contractile responses in potassium-depolarized guinea-pig myocardium. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 230. p. 646-651, Sep 1984.

HOLSCHER, C.;MOHRS, M., *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun**, Germany., v. 68. p. 4075-4083, Jul 2000.

MORTON,D.L.; KADISON, A. S. Immunotherapy of malignant melanoma. **Surg Clin North Am**, Santa Monica, v. 83. p. 343-370, Apr. 2003.

KAGAMU, H. SHU, S. Purification of L-selectin(low) cells promotes the generation of highly potent CD4 antitumor effector T lymphocytes. **J Immunol**, v. 160. p. 3444-3452, Apr 1998.

KIM, R.;EMI, M., *et al.* Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, Japan. v. 121. p. 1-14, May. 2007.

KOOLMAN, A. H.;BLOKS, V. W., *et al.* Metabolic responses to long-term pharmacological inhibition of CB1-receptor activity in mice in relation to dietary fat composition. **Int J Obes (Lond)**, The Netherlands., v. 34. p. 374-384, Feb.

KURASHIY, A.;KARIN, M., *et al.* Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. **Immunity**, San Diego, v. 35. p. 467-477, Oct 28.

KYRIAZI, M.;YOVA, D., *et al.* Cancer chemopreventive effects of Pinus Maritima bark extract on ultraviolet radiation and ultraviolet radiation-7,12,dimethylbenz(a)anthracene induced skin carcinogenesis of hairless mice. **Cancer Lett**, Athens, v. 237. p. 234-241, Jun 2006.

LE BITOUX, M. A. STAMENKOVIC, I. Tumor-host interactions: the role of inflammation. **Histochem Cell Biol**, Switzerland., v. 130. p. 1079-1090, Dec 2008.

LUO, J.;SOLIMINI, N. L., *et al.* Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, Boston, v. 136. p. 823-837, Mar 2009.

MACCARRONE, M.;CATANI, M. V., *et al.* Involvement of 5-lipoxygenase in programmed cell death of cancer cells. **Cell Death Differ**, Rome, v. 4. p. 396-402, Jul. 1997.

MACHADO, E. R.;UETA, M. T., *et al.* Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **J Immunol**, Ribeirao Preto, v. 175. p. 3892-3899, Sep 2005.

MARTINEZ-ESCRIBANO, J. A.;HERNANDEZ-CASELLES, T., *et al.* Changes in the number of CD80(+), CD86(+), and CD28(+) peripheral blood lymphocytes have prognostic value in melanoma patients. **Hum Immunol**, Murcia, v. 64. p. 796-801, Aug 2003.

MAUTI, L. A.;LE BITOUX, M. A., *et al.* Myeloid-derived suppressor cells are implicated in regulating permissiveness for tumor metastasis during mouse gestation. **J Clin Invest**, Switzerland, v. 121. p. 2794-2807, Jul 1.

MEXMAIN, S.;COOK, J., *et al.* Thymocyte cyclic AMP and cyclic GMP response to treatment with metabolites issued from the lipoxygenase pathway. **J Immunol**, v. 135. p. 1361-1365, Aug. 1985.

MORTON,D.L.; KADISON, A. S. Immunotherapy of malignant melanoma. **Surg Clin North Am**, Santa Monica, v. 83. p. 343-370, Apr. 2003.

MOUGIAKAKOS, D.;JITSCHIN, R., *et al.* The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 117. p. 4826-4835, May 5.

NAKAMURA, K.;YOSHIKAWA, N., *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sci**, Japan, v. 70. p. 791-798, Jan 2002.

NAKASONE, Y.;FUJIMOTO, M., *et al.* Host-derived MCP-1 and MIP-1alpha regulate protective anti-tumor immunity to localized and metastatic B16 melanoma. **Am J Pathol**, Japan, v. 180. p. 365-374, Jan.

NATHOO, N.;BARNETT, G. H., *et al.* The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **J Clin Pathol**, v. 57. p. 6-13, Jan 2004.

NICOLSON, G. L.;BRUNSON, K. W., *et al.* Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. **Cancer Res**, v. 38. p. 4105-4111, Nov. 1978.

NISHIKAWA, H. SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in tumor immunity. **International Journal of Cancer**, v. 127. p. 759-767, Aug 15.

NOMIZO, A.;POSTOL, E., *et al.* Natural killer T cells are required for the development of a superantigen-driven T helper type 2 immune response in mice. **Immunology**, Ribeirao Preto, v. 116. p. 233-244, Oct. 2005.

NONOMURA, N.;TAKAYAMA, H., *et al.* Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. **Br J Cancer**, Osaka, v. 97. p. 952-956, Oct 2007.

NOONAN, D. M.;DE LERMA BARBARO, A., *et al.* Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. **Cancer Metastasis**, Varese, v. 27. p. 31-40, Mar. 2008.

PAIVA, I.;GOMES, L., *et al.* [Autoimmune hypophysitis or lymphocytic hypophysitis]. **Acta Med Port**, Coimbra, v. 16. p. 459-463, Nov 2003.

PARK, S. W.;KIM, H. S., *et al.* The effects of the stromal cell-derived cyclooxygenase-2 metabolite prostaglandin E2 on the proliferation of colon cancer cells. **J Pharmacol Exp Ther**, Korea., v. 336. p. 516-523, Feb.

PARKIN, D. M.;BRAY, F., *et al.* Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **International Journal of Cancer**, France, v. 94. p. 153-156, Oct 2001.

PENAFUERTE, C.;NG, S., *et al.* B Effector Cells activated by a chimeric protein consisting of IL-2 and the Ectodomain of Transforming Growth Factor beta Receptor II Induce Potent Anti-tumor Immunity. **Cancer Res**, v. p. Jan 12.

PETERS-GOLDEN, M.;BAILIE, M., *et al.* Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. **Am J Respir Crit Care Med**, Michigan v. 165. p. 229-235, Jan 2002.

PETERS-GOLDEN, M. BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161. p. S36-40, Feb 2000.

ROCHA, P. N.;PLUMB, T. J., *et al.* Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Semin Immunopathol**, Durham, v. 25. p. 215-227, Sep. 2003.

SALEEM, M.;MADDODI, N., *et al.* Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. **Clin Cancer Res**, Madison, v. 14. p. 2119-2127, Apr 2008.

SCHREIBER, R. D.;OLD, L. J., *et al.* Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, Washington, v. 331. p. 1565-1570, Mar 25.

SECOR, W. E.;POWELL, M. R., *et al.* Mice deficient for 5-lipoxygenase, but not leukocyte-type 12-lipoxygenase, display altered immune responses during infection with *Schistosoma mansoni*. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, Atlanta, v. 56. p. 291-304, Aug 1998.

SETHI, G.;SHANMUGAM, M. K., *et al.* Multifaceted link between cancer and inflammation. **Biosci Rep**, Singapore, v. 32. p. 1-15, Feb. 2012.

SGAMBATO, A. CITTADINI, A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, Italy, v. 14. p. 263-268, Apr. 2010.

SHIMIZU, K.;KUROSAWA, Y., *et al.* Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. **J Exp Med**, Japan, v. 204. p. 2641-2653, Oct 2007.

SOLINAS, G.;MARCHESI, F., *et al.* Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, Italy, v. 29. p. 243-248, Jun 2010.

SOORY, M. Hormone mediation of immune responses in the progression of diabetes, rheumatoid arthritis and periodontal diseases. **Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord**, United Kingdom, v. 2. p. 13-25, Apr. 2002.

SPANBROEK, R.;HILDNER, M., *et al.* 5-lipoxygenase expression in dendritic cells generated from CD34(+) hematopoietic progenitors and in lymphoid organs. **Blood**, Germany, v. 96. p. 3857-3865, Dec 2000.

SPINOZZI, F.;RUSSANO, A. M., *et al.* Biological effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene receptor-antagonist, on T lymphocytes. **Clin Exp Allergy**, Italy, v. 34. p. 1876-1882, Dec. 2004.

STAHL, H. F.;FAUTI, T., *et al.* miR-155 inhibition sensitizes CD4⁺ Th cells for TREG mediated suppression. **PLoS One**, Germany., v. 4. p. e7158, 2009.

STEELE, V. E.;HOLMES, C. A., *et al.* Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Maryland, v. 8. p. 467-483, May 1999.

TANIGUCHI, K.;KARRE, K., *et al.* Lung colonization and metastasis by disseminated B16 melanoma cells: H-2 associated control at the level of the host and the tumor cell. **International Journal of Cancer**, v. 36. p. 503-510, Oct1985.

TASKINEN, M.;KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L., *et al.* Prognostic influence of tumor-infiltrating mast cells in patients with follicular lymphoma treated with rituximab and CHOP. **Blood**, Finland, v. 111. p. 4664-4667, May 2008.

TREILLEUX, I.;BLAY, J. Y., *et al.* Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. **Clin Cancer Res**, France., v. 10. p. 7466-7474, Nov 2004.

TSUDA, K.;YAMANAKA, K., *et al.* Intratumoral Injection of Propionibacterium acnes Suppresses Malignant Melanoma by Enhancing Th1 Immune Responses. **PLoS One**, Japan., v. 6. p. e 29020. Dez 2011

TONG, W. G.;DING, X. Z., *et al.* Lipoygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. **Mol Cancer Ther**, Chicago, v. 1. p. 929-935, Sep. 2002.

TUCKER, M. A. GOLDSTEIN, A. M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene**, v. 22. p. 3042-3052, May 2003.

TURCOTTE, S. ROSENBERG, S. A. Immunotherapy for metastatic solid cancers. **Adv Surg**, Surgery Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 10 Center Drive, Bethesda, MD 20892, USA., v. 45. p. 341-360.

TZEHOVAL, E.;DE BAETSELIER, P., *et al.* Splenic B cells function as immunogenic antigen-presenting cells for the induction of effector T cells. **Eur J Immunol**, v. 13. p. 89-94, Feb. 1983.

VERMEULEN, J.;DE PRETER, K., *et al.* Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, De Pintelaan 185, B-9000 Ghent, Belgium., v. 39. p. e63, May.

WALLACE, J. M. Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade--eicosanoids, cyclooxygenases, and lipoygenases--as an adjunct in cancer therapy. **Integr Cancer Ther**, v. 1. p. 7-37; discussion 37, Mar 2002.

WANG, Y.;ZHOU, B., *et al.* Inhibitors of 5-lipoxygenase inhibit expression of intercellular adhesion molecule-1 in human melanoma cells. **Acta Pharmacol Sin**, China., v. 25. p. 672-677, May. 2004.

WAYMAN, N. S.;HATTORI, Y., *et al.* Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-gamma and PPAR-alpha) reduce myocardial infarct size. **FASEB J**, UK, v. 16. p. 1027-1040, Jul. 2002.

WOOD, L. D.;PARSONS, D. W., *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. **Science**, Baltimore , v. 318. p. 1108-1113, Nov 2007.

XU, L.;XU, W., *et al.* Depletion of CD4(+)CD25(high) regulatory T cells from tumor infiltrating lymphocytes predominantly induces Th1 type immune response in vivo which inhibits tumor growth in adoptive immunotherapy. **Cancer Biol Ther**, China., v. 8. p. 66-72, Jan. 2009.

YASHIN, D. V.;SASHCHENKO, L. P., *et al.* The CD8+population of LAK cells can lyse both HLA-positive and HLA-negative cancer cell lines. **Dokl Biol Sci**, v. 426. p. 296-297, May-Jun. 2009

YU, K. D.;CHEN, A. X., *et al.* Current evidence on the relationship between polymorphisms in the COX-2 gene and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, Shanghai, v. 122. p. 251-257, Jul.

ZAMARRON, B. F. CHEN, W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci**, Bethesda, v. 7. p. 651-658.

ZITVOGEL, L.;MAYORDOMO, J. I., *et al.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. **J Exp Med**, Pennsylvania, v. 183. p. 87-97, Jan1996.

ZAMAI, L.;PONTI, C., *et al.* NK cells and cancer. **J Immunol**, Italy, Apr 1. 2007.

ZITVOGEL, L.;ROBBINS, P. D., *et al.* Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors. **Eur J Immunol**, v. 26. p. 1335-1341, Jun1996.