

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

**Cancro Colorretal e Inflamação -
Vias Celulares e Alvos
Farmacológicos**

Bárbara Lopes Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sobre a orientação do Prof. Doutor João Pedro Fidalgo Rocha

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia

**Cancro Colorretal e Inflamação -
Vias Celulares e Alvos
Farmacológicos**

Bárbara Lopes Gonçalves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sobre a orientação do Prof. Doutor João Pedro Fidalgo Rocha

2015

Cancro Colorretal e Inflamação - Vias Celulares e Alvos Farmacológicos

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Bárbara Lopes Gonçalves

Copyright Bárbara Lopes Gonçalves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Neste livro que é a vida, este é um momento que representa o fechar de mais um capítulo. É um momento que pela sua importância incita uma reflexão sobre aquilo que ficou escrito. Com personagens que saltaram de capítulos anteriores e com personagens recém-chegadas, todas elas à sua maneira, mais que um simples obrigado, merecem um pensado agradecimento:

Os pais que para além das suas banais profissões têm como *hobby* a magia, o malabarismo e até o contorcionismo.

O irmão, ausente mas presente, chato e que chateio e que sempre vai lá estar.

O pequeno Afonso, que ainda há pouco chegou mas que mais do que muitos já marcou; a mais recente descoberta para a cura de qualquer forma de tristeza.

A Bruna, a Rita e a Bruna e a Rita. Porque há partes que se encontram que não se sabia que faltavam. Porque há partes que deixam de ser partes. Porque três partes são mais do que o triplo.

Os colegas de turma que com a sua individualidade criaram aquela que para sempre será a “turminha”.

A Universidade do Algarve que se tornou uma casa. Uma casa onde se cresce. E em especial, um dos membros dessa casa, e orientador deste trabalho final, o professor João Rocha.

RESUMO

O cancro colorretal é considerado um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, apresentando elevadas taxas de mortalidade. Assim como o verificado para a maioria dos cancros, o cancro colorretal resulta de uma combinação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.

A descoberta da existência de uma ligação íntima entre a inflamação e a carcinogénese induziu um crescente aprofundamento da análise dos mecanismos responsáveis por este fenómeno. De facto, entre os fatores de risco para esta patologia destacam-se as doenças inflamatórias intestinais, tais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. Para além disso, os processos inflamatórios parecem estar também associados a formas esporádicas ou hereditárias de cancro colorretal.

O processo inflamatório é caracterizado pela acumulação de várias células imunitárias e de moléculas inflamatórias solúveis, tais como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de azoto.

Um dos mecanismos responsáveis pela modulação imune e pela homeostase dos tecidos é assegurado pelas vias de sinalização que envolvem os recetores *Toll-like*. No entanto, é também de salientar o facto de que uma ativação anormal destas vias está associada ao desencadeamento da inflamação e, portanto, ao cancro.

Os avanços na compreensão do microambiente tumoral têm despoletado a identificação de alvos terapêuticos para prevenção e/ou tratamento do cancro colorretal, que incitam tanto o desenvolvimento de novas moléculas como a utilização de moléculas com indicação comum para outras patologias.

Desta forma, atendendo ao previamente disposto, este trabalho irá incidir na caracterização de mecanismos subjacentes aos processos inflamatórios bem como à sua interligação com o desenvolvimento do cancro colorretal. Em resultado dessa análise serão também apresentadas estratégias terapêuticas dirigidas a alvos associados a estes processos.

Palavras-chave: *cancro colorretal, inflamação, sistema imunitário, imunoterapia, quimioprevenção.*

ABSTRACT

Colorectal cancer is considered a major public health problem worldwide, with high mortality rates. Thus as found for most cancers, colorectal cancer results from a combination of genetic, epigenetic and environmental factors.

The discovery of the existence of a close link between inflammation and carcinogenesis induced an increasing depth analysis of the mechanisms responsible for this phenomenon. Indeed, among the risk factors for this disease the inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, stand out. In addition, inflammatory processes also appear to be associated with sporadic or hereditary forms of colorectal cancer.

The inflammatory process is characterized by the accumulation of various immune inflammatory cells and soluble molecules, such as cytokines, chemokines, growth factors, reactive oxygen species and reactive nitrogen species.

One of the mechanisms responsible for the immune modulation and tissue homeostasis is ensured by signaling pathways involving Toll-like receptors. However, it is also noteworthy the fact that an abnormal activation of these pathways is associated with the onset of inflammation and thus cancer.

Advances in the understanding of tumor microenvironment have triggered the identification of therapeutic targets for the prevention and/or treatment of colorectal cancer, inducing both the development of new molecules and the use of molecules with common indication for other pathologies

Thus, given the previously disposed, this work will focus on the characterization of the mechanisms underlying inflammatory processes as well as its interconnection with the development of colorectal cancer. As a result of this analysis will also be presented therapeutic strategies directed to targets associated with these processes.

Keywords: *colorectal cancer, inflammation, immune system, immunotherapy, chemoprevention.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
I. INTRODUÇÃO	1
1.1.Carcinogénese	1
1.1.1.Proto-oncogenes e oncogenes	1
1.2.Cancro colorretal.....	2
1.2.1.Dados epidemiológicos	2
1.2.2.Patogénese.....	3
1.2.3.Relação com outras patologias.....	4
II. SISTEMA IMUNITÁRIO	5
2.1.Classificação e funcionamento	5
2.2.Imunidade inata.....	6
2.2.1.Células apresentadoras de antigénios.....	7
2.2.2.Macrófagos.....	7
2.2.3.Mastócitos	8
2.2.4.Células <i>natural killer</i>	10
2.2.5.Células dendríticas	11
2.2.6.Neutrófilos	12
2.3.Imunidade adquirida	13
2.3.1.Linfócitos B.....	14
2.3.2.Linfócitos T	14
III. RECETORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO	16
3.1.Recetores <i>Toll-like</i>	16

3.1.1. Moléculas adaptadoras	18
3.1.2. Via de sinalização dependente do MyD88.....	19
3.1.3. Via de sinalização independente do MyD88.....	20
3.1.4. TLRs na carcinogénese	21
3.1.4.1. Recetor <i>Toll-like</i> 2	22
3.1.4.2. Recetor <i>Toll-like</i> 4	25
3.1.4.3. Recetor <i>Toll-like</i> 9	26
3.1.5. NF- κ B.....	28
3.1.5.1. NF- κ B na carcinogénese.....	30
3.1.5.2. IKK na carcinogénese.....	31
IV. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS	32
4.1. Ácidos gordos polinsaturados	33
4.2. Lipo-oxigenase.....	35
4.3. Ciclo-oxigenase.....	36
4.4. ROS e RNS	36
V. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	38
5.1. Imunoterapia	38
5.1.1. Agonistas do TLR2	39
5.1.2. Agonistas do TLR4	41
5.1.3. Agonistas do TLR9	42
5.2. Fármacos anti-inflamatórios	44
5.2.1. Fármacos anti-inflamatórios sintéticos	45
5.2.1.1. Anti-inflamatórios não esteroides.....	45
5.2.1.1.1. Ácido acetilsalicílico.....	46
5.2.1.1.2. Indometacina.....	47
5.2.1.1.3. Sulindac.....	47

5.2.1.1.4.Celecoxib	47
5.2.1.2.Inibidores da iNOS	48
5.2.2. Fármacos anti-inflamatórios naturais	48
5.2.2.1.Curcumina.....	48
5.2.2.2.Resveratrol	49
5.2.2.3.Diosgenina	49
5.2.2.4.Triterpenóides	49
5.2.2.5.PUFAs ω -3.....	50
VI. CONCLUSÃO	52
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III-1: Via de sinalização dependente do MyD88 e via de sinalização independentes do MyD88	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

15-epiLXA ₄	15-epi-lipoxina A ₄
15R-HETE	Ácido 15R hidroxieicosatetraenoico
AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ALR	Recetor AIM-2- <i>like</i>
AOM	Azoximetano
APC	Célula apresentadora de antigénio
AR	Anfiregulina
BAFFR	Fator ativador de linfócitos B
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BLT	Recetor do LTB ₄
c-KitR	Recetor da tirosina cinase c-Kit
CAC	Cancro colorretal associado a colite
CCR	Cancro colorretal
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
cDC	Célula dendrítica convencional
CIMP	Fenótipo metilador de ilhas CpG
ClO ⁻	Ião hipoclorito
CLR	Recetor de lectina tipo C
COX	Ciclo-oxigenase
CpGs	Sequências de nucleótidos de citosina-guanina
DAMPs	Padrões moleculares associados a perigo
DC	Célula dendrítica
DD	<i>Death domain</i>
DHA	Ácido docosahexaenoico
DII	Doença inflamatória do intestino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
dsRNA	Ácido ribonucleico de cadeia dupla
DSS	Sulfato de sódio dextrano

EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
eNOS	Sintase endotelial de monóxido de azoto
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FLAP	Proteína de ativação da 5-LOX
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos e de macrófagos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HNPCC	Cancro colorretal hereditário não polipoide
IEC	Células epiteliais intestinais
IFN	Interferão
IKK	Cinase IκB
IL	Interleucina
IMO	Oligonucleotídeo imunomodulador
iNOS	Sintase indutível de monóxido de azoto
IRAK	Cinase associada ao recetor da IL-1
IRF	Fator regulador do interferão
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
KIR	<i>Killer inhibitory receptors</i>
LB	Linfócitos B
LOX	Lipo-oxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	Repetições ricas em leucina
LT	Linfócitos T
LTβR	Recetor da linfotoxina β
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LXA ₄	Lipoxina A ₄
M1	Macrófagos “classicamente ativados”
M2	Macrófagos “alternativamente ativados”
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDSC	Células supressoras derivadas da linhagem mieloide
MHC	Complexo major de histocompatibilidade

MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MSI	Instabilidade de microssatélites
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NEMO	NF- κ B <i>essential modulator</i>
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NIK	Cinase indutora do NF- κ B
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	Rácio de neutrófilos/linfócitos
nNOS	Sintase neuronal de monóxido de azoto
NO	Monóxido de azoto
NOS	Sintase de monóxido de azoto
NOX	NADPH-oxidase
nTreg	Treg de ocorrência natural
O ₂ ⁻	Anião radical superóxido
ODN	Oligonucleotídeo
OH	Hidróxido
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PAMPs	Padrões moleculares associados a patogénios
PAR-2	Recetor ativado por proteases 2
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide
PDGF- β	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR	Recetor ativado por proliferadores do peroxissoma γ
PRR	Recetor de reconhecimento padrão
PUFA	Ácido Gordo polinsaturado
RANK	Recetor ativador do NF- κ B
RHD	Domínio de homologia Rel
RLR	Recetor RIG-1- <i>like</i>
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SCF	Fator de células estaminais
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadeia simples
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TAM	Macrófagos associados a tumores
TAK1	Cinase 1 ativada pelo TGF- β
TBK1	Cinase 1 de ligação ao TANK
T _C	T citotóxica
TCR	Recetor do linfócito T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
TGI	Trato gastrointestinal
T _H	T <i>helper</i>
TIR	Recetor <i>Toll</i> /Interleucina-1
TIRAP	Domínio TIR contendo uma proteína adaptadora
TLR	Recetor <i>Toll-like</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRAF6	Fator 6 associado ao recetor do TNF, ubiquitina-ligase E3
TRAM	Molécula adaptadora relacionada com o TRIF
Treg	T reguladoras
TRIF	Domínio TIR contendo uma proteína adaptadora indutora do IFN- β
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

I. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinogénese

A palavra cancro é empregue como designação de patologias caracterizadas por um crescimento celular descontrolado, invasão tecidual e metástase. [1][2] A carcinogénese, ou transformação neoplásica, resulta de um acumular de mutações genéticas não letais, permitindo às células a aquisição de características fenotípicas anormais. [1] O termo carcinogénese define o início de um tumor, enquanto que o termo oncogénese se refere à manutenção e à subsequente evolução do tumor. [3]

Ainda que a cada tumor esteja associado um percurso de transformação único e irrepetível por outro tumor, em repercussão da premissa de que tumores com características semelhantes compartilham mecanismos patogénicos e padrões de progressão comuns, a sua classificação advém de características clínicas, patológicas e moleculares que lhes são inerentes. [2]

Desde as propostas iniciais de Boveri, há mais de um século atrás, um vasto conjunto de evidências experimentais confirma que, a nível molecular, o cancro surge em resultado de lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. [4] Inicialmente, observou-se que uma célula cancerosa transmite às suas células filhas as características fenotípicas que caracterizam o estado “canceroso”. [4] Posteriormente, constatou-se que a maioria dos compostos reconhecidos como mutagénicos é também cancerígena, tendo como alvo o DNA celular. [4] Finalmente, o conhecimento do cariótipo de vários tipos de tumores humanos, particularmente os que pertencem ao sistema hematopoiético, conduziu à identificação de aberrações cromossómicas qualitativas e numéricas recorrentes, refletindo rearranjos patológicos do genoma celular. [4] Estas observações sugerem que a patogenicidade molecular do cancro humano emerge de alterações estruturais e/ou funcionais de genes específicos cuja função normal consiste em controlar o crescimento e diferenciação celular. [4] Desta forma, a disfunção do ciclo celular pode ser considerada condição *sine qua non* no desenvolvimento de um cancro humano, ou seja, é a base molecular da oncogénese. [1]

1.1.1 Proto-oncogenes e oncogenes

Os proto-oncogenes codificam proteínas que estão envolvidas no controlo do crescimento celular. [4] Alterações na estrutura e/ou expressão de proto-oncogenes

podem induzir a sua progressão a oncogenes, que apresentam capacidade de provocar alterações fenotípicas neoplásicas em células suscetíveis. [4] Com base nas propriedades funcionais e bioquímicas das proteínas codificadas pelos proto-oncogenes homólogos, os oncogenes podem ser classificados em cinco grupos: fatores de crescimento, recetores dos fatores de crescimento, transdutores de sinais, fatores de transcrição e outros, incluindo os reguladores da morte celular programada (apoptose). [4]

Contrariamente aos oncogenes, que são ativados por mutações dominantes e cuja atividade consiste na promoção do crescimento celular, os genes supressores de tumores, que são inativados por mutações do tipo recessivo, atuam nas células normais como controladores negativos do crescimento celular e são inativos em células tumorais. [4]

Para além dos oncogenes e dos genes supressores de tumores, considera-se ainda uma terceira classe de genes, associada em particular a tumores nos quais um gene mutado hereditário desempenha um papel significativo na predisposição tumoral. [4] Estes tumores incluem cancros em indivíduos que sofrem de síndrome de Lynch, anteriormente conhecida como cancro colorretal hereditário não polipoide (HNPCC). [4][5] Os genes implicados nestes tumores foram definidos como genes modificadores ou genes envolvidos no processo de reparação de DNA (*DNA-mismatch repair*). [4] Embora não estejam diretamente envolvidos no processo de carcinogénese, estes genes, quando inativados, expõem as células a uma carga mutagénica elevada que, eventualmente, pode envolver a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais. [4]

1.2 Cancro colorretal

1.2.1 Dados epidemiológicos

A terceira posição na lista dos cancros mais comumente diagnosticados pertence ao cancro colorretal (CCR), representando cerca de 10% de todos os cancros e afetando mais de um milhão de pessoas em todo o mundo a cada ano. [6][7][8] A isto, acresce o facto de este tipo de cancro continuar a ser um dos mais fatais, correspondendo, em muitos países, à principal causa de morte relacionada com o cancro. [7][9]

O prognóstico encontra-se fortemente relacionado com a fase de diagnóstico. [10] Sem discriminação de estádios, a taxa de sobrevivência para cinco anos é de aproximadamente 66,1%. [10] No entanto, as taxas relativas de sobrevivência para cinco

anos correspondem a cerca de 90% para a doença localizada em comparação com 13% aquando da existência de metástases no momento do diagnóstico. [10]

1.2.2 Patogénese

Da mesma forma que o verificado para a maioria dos cancros, o CCR resulta de uma combinação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. [11][12] O CCR desenvolve-se lentamente ao longo dos anos, sendo que a sua carcinogénese é descrita como um processo de várias etapas. [7][11] Inicialmente manifesta-se pela presença de pólipos que, posteriormente, evoluem para adenomas e finalmente para carcinomas com potencial para invasão e metástase. [7][13] Fatores de risco associados ao desenvolvimento de pólipos incluem a idade, o tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade e condições inflamatórias crónicas tais como as doenças inflamatórias do intestino (DIIs). [11]

Durante a carcinogénese as células tumorais interagem com um microambiente complexo que é composto por matriz extracelular e células hospedeiras não neoplásicas, incluindo células mesenquimais, células endoteliais vasculares, células inflamatórias e células imunitárias. [2] O microambiente do tumor garante o aporte, às células cancerosas, de nutrientes, oxigénio, fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores químicos que suportam a proliferação do tumor, a sobrevivência, a invasão e a metástase. [2] As interações tumor-hospedeiro são mediadas, indiretamente, através de moléculas da matriz extracelular e moléculas bioativas solúveis libertadas a partir de células do hospedeiro ou de células neoplásicas e, diretamente, através de moléculas da superfície das células não neoplásicas ou das células neoplásicas. [2][12] Como tal, admite-se que as interações hospedeiro-tumor são influenciadas pelo genoma e epigenoma tanto das células neoplásicas como das células não neoplásicas. [2]

No que concerne particularmente ao CCR, demonstrou-se que as principais características genéticas e epigenéticas, tais como a instabilidade de microssatélites (MSI), a instabilidade cromossómica, o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) ou a hipometilação global do DNA, conduzem a alterações de funções dos genes, afetando todo o genoma. [7]

Sabe-se também que a ativação de oncogenes, incluindo KRAS, BRAF, PIK3CA e TP53, afeta as vias de sinalização intracelulares. [7][14] Em resultado da interrupção de mecanismos da via supressora, por alterações em genes supressores de tumor tais como

Apc e p53, na maioria dos casos de CCR, aproximadamente 85%, é verificada a ocorrência de instabilidade cromossômica, traduzida por um perfil molecular caracterizado por ampliações e transformações cromossômicas específicas, aneuploidia e perda da heterozigocidade. [7][14]

1.2.3 Relação com outras patologias

Estudos epidemiológicos revelam que a inflamação crônica funciona como um fator de predisposição para alguns tipos de cancro. [15] As DIIs, incluindo a doença de Crohn e a colite ulcerativa, correspondem a patologias poligénicas complexas de caráter crónico inflamatório, que envolvem o aparelho digestivo. [16] A patogénese das DIIs parece estar relacionada com uma estimulação excessiva do sistema imunitário dirigida contra os antígenos da microbiota intestinal, conduzindo à inflamação crónica. [17]

A doença de Crohn pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal (TGI), da boca ao ânus, mas mais frequentemente envolve o íleo e o cólon. [16][18] A colite ulcerativa pode afetar apenas o reto (proctite) ou pode progredir e afetar parte ou a totalidade do cólon. [16][18] Os sinais e sintomas clínicos incluem diarreia, dor abdominal, sangramento gastrointestinal e perda de peso. [16] Uma complicação grave a longo prazo da inflamação crónica é o desenvolvimento de cancro colorretal. [16]

Assim, de acordo com a associação a processos inflamatórios, admite-se a existência de dois tipos de CCR: o CCR esporádico, que se pensa resultar da instabilidade genética intrínseca, sendo a inflamação subsequente ao início do cancro, e o cancro colorretal associado a colite (CAC), despoletado por uma DII. [19]

O CCR não síndrómico, ou familiar, que é geralmente definido como um conjunto de CCRs que é distinto das síndromes hereditárias. [20] O CCR familiar é uma condição heterogénea que inclui doentes com síndromes hereditárias não reconhecidas e doentes com formas aparentemente esporádicas que se agregam em famílias. [20] Nestes doentes o mecanismo molecular não foi ainda estabelecido, admitindo-se que, provavelmente, uma combinação de fatores ambientais e fatores genéticos herdados (normalmente, alterações genéticas de baixa penetrância) desempenhem um papel no desenvolvimento do CCR nestas famílias. [20]

As DIIs são classificadas como a terceira condição de maior risco para o CCR, ficando apenas atrás da polipose adenomatosa familiar (PAF) e da síndrome de Lynch. [21] A PAF, uma doença autossómica dominante, é caracterizada pelo desenvolvimento

de centenas a milhares de adenomas no reto e no cólon durante a segunda década de vida. [22] Quando não tratada, na maioria dos doentes, a PAF evolui para CCR. [22] A síndrome de Lynch, condição autossômica dominante, é caracterizada pelo desenvolvimento de CCR, cancro do endométrio e vários outros tipos de cancro. [5]

II. SISTEMA IMUNITÁRIO

2.1 Classificação e funcionamento

Sob condições normais, aproximadamente 70% das células do sistema imunitário do organismo humano encontram-se localizadas no intestino. [23] A sinalização entre essas células, as bactérias comensais e as células epiteliais intestinais (IEC) é fundamental tanto para os processos fisiológicos normais como para a proteção contra patógenos invasores. [23]

O sistema imunitário é constituído por diferentes órgãos e tecidos que, funcionalmente, podem ser classificados em dois grupos essenciais – órgãos linfoides primários e órgãos linfoides secundários. [24] Pode ainda considerar-se que o sistema imunitário é constituído por uma componente menos específica, a imunidade inata, e por uma componente mais específica, a imunidade adquirida ou adaptativa. [24][25]

O sistema imunitário desempenha um papel complexo e multifacetado no que concerne ao cancro, interferindo em aspetos relacionados quer com a carcinogénese quer com o tratamento. [26] As células imunitárias podem intervir tanto como supressores da iniciação e progressão do tumor, bem como promotores da proliferação, infiltração, e metástase. [26]

Da interação altamente complexa entre as células tumorais e o sistema imunológico surgiu o conceito de *cancer immunoediting*, um processo duplo do qual fazem parte as ações imunitárias que promovem a proteção contra tumores e as que promovem a formação de tumores. [18] Este processo engloba uma fase de eliminação, uma fase de equilíbrio e uma fase de escape. [18][25] Na fase de eliminação (conceito que veio substituir *cancer immunosurveillance*), observa-se o reconhecimento e a destruição das células tumorais primitivas pela interação de mecanismos da imunidade inata e da imunidade adaptativa. [18][25] Caso não se verifique uma eliminação completa das células tumorais, atinge-se uma fase de equilíbrio, ou período de latência, na qual a

imunidade adaptativa controla o crescimento de células tumorais clinicamente indetetáveis e bloqueia a sua imunogenicidade. [18][27] Quando o seu estado de latência termina, as células malignas com reduzida imunogenicidade iniciam a fase de escape, caracterizada pela evasão à eliminação, progressão tumoral e expressão clínica. [18][28] Evidências de que a *cancer immunoediting* desempenha um papel crítico no controlo do desenvolvimento de cancro surgem do facto de indivíduos imunodeprimidos, como por exemplo na infeção avançada pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), apresentarem um maior risco para vários tipos de cancro, quando comparados com indivíduos saudáveis. [26]

O microambiente tumoral é caracterizado por uma rede complexa de células do estroma, células inflamatórias e células imunitárias inatas e adaptativas. [18] Tanto as células imunitárias inatas [macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas (DC), células mieloides derivadas de células supressoras e células *natural killer* (NK)] como as células imunitárias adaptativas (linfócitos T e B) estão presentes e interagem com o tumor através de contacto direto ou através da sinalização por quimiocinas e citocinas, o que modela o comportamento do tumor e a sua resposta à terapia. [26] Desta forma, verifica-se que tanto as células do sistema imunitário inato como as do adquirido orquestram um ambiente inflamatório que pode funcionar tanto para estimular como para inibir o crescimento do cancro. [29]

2.2 Imunidade inata

A imunidade inata constitui o primeiro mecanismo de defesa do organismo humano perante uma situação anormal, tal como cancro. [7] Mais especificamente, no cancro, o sistema imune inato reconhece antigénios tumorais específicos presentes na superfície das células cancerosas. [26] A maioria dos componentes da imunidade inata encontra-se presente mesmo antes da ocorrência de uma infeção e constitui um conjunto de mecanismos que reconhecem as moléculas próprias do organismo daquelas que lhe são estranhas, mas não são especializados na distinção de pequenas diferenças entre estas moléculas estranhas. [24] Pode considerar-se que a imunidade inata compreende quatro tipos de barreiras: anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias. [24]

As células imunitárias inatas, tais como as células NK, reconhecem a escassez de moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe I nas células

tumorais, envolvem-se na morte dessas células e, em seguida, recrutam outras células inflamatórias através da produção de citocinas. [26] Os monócitos recrutados, designadamente os macrófagos e as DCs, fagocitam as células tumorais e, posteriormente, apresentam na sua superfície o antígeno associado ao tumor que ativa uma resposta específica de linfócitos T (LT). [26]

2.2.1 Células apresentadoras de antígenos

As células apresentadoras de antígenos (APCs) são células especializadas que incluem os macrófagos, os linfócitos B (LB) e as DCs, e são distinguidas por expressarem moléculas de MHC de classe II nas suas membranas e por serem capazes de exercer um sinal de coestimulação que é necessária para a ativação dos linfócitos T *helper* (T_H). [24] As APCs inicialmente internalizam os antígenos, por fagocitose ou endocitose, e posteriormente apresentam parte desse antígeno na sua membrana, ligado a uma molécula de MHC de classe II. [24] Os linfócitos T_H reconhecem e interagem com o complexo antígeno-MHC II. [24] Um sinal adicional é então produzido pela APC levando à ativação do linfócito T_H. [24]

2.2.2 Macrófagos

Os macrófagos são uma população heterogénea de células imunitárias, em resultado da adaptação ao ambiente tecidual em que se localizam, que têm uma variedade de funções tanto no que concerne à indução como à resolução da inflamação, sendo responsáveis pela homeostase. [30][31] Desta forma, proporcionam a primeira linha de defesa perante agentes patogénicos e são também responsáveis pelo despoletar da imunidade adquirida, através do processamento e apresentação de antígenos, bem como por exercerem outras funções efetoras. [32]

Determinados estímulos alteram a expressão genética destas células de forma a serem produzidos “macrófagos ativados” que apresentam características que lhes permitem a eliminação da causa do seu influxo e o restauro da homeostase. [32] De acordo com o processo de polarização, os macrófagos são caracterizados como “classicamente ativados” (M1) ou como “alternativamente ativados” (M2). [31][32] Estes processos são induzidos por estímulos diferentes, tais como lipopolissacarídeos (LPS) e interferão- γ (IFN- γ) para a via clássica e IL-4 para a via alternativa. [31] De um modo

semelhante aos macrófagos residentes em tecidos e órgãos normais, os macrófagos presentes em tumores (macrófagos associados a tumores, TAM) executam algumas funções homeostáticas chave que permitem a manutenção e crescimento do tumor. [33] A ativação e maturação dos TAM estão sob a influência do microambiente do tumor. [7]

Os M1 são detentores de capacidades que permitem a inibição do crescimento tumoral; estão intimamente envolvidos na imunidade inata uma vez que têm como alvo as células alteradas, produzem moléculas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-23 e TNF α) e promovem a imunidade adquirida através do aumento da expressão de moléculas de MHC II e moléculas coestimuladoras. [7][27] A persistência de uma resposta inflamatória, no entanto, pode ser prejudicial e favorecer a iniciação e/ou progressão do cancro através da geração de indutores de mutações, nomeadamente espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). [32][34] Existem também evidências de que alguns TAM, especialmente os que secretam IL-12 e IL-23, infiltram o tumor e estão correlacionados com funções antitumorais. [7]

Em contrapartida, os M2 segregam citocinas imunossupressoras e promovem o crescimento tumoral. [7] Entre as células com o fenótipo M2, demonstrou-se que os TAM apresentam a capacidade de segregar proteases, tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs) que fomentam a invasão e metástase, em conjunto com uma variedade de citocinas, que inibem uma resposta imunitária adquirida ao tumor, e com fatores angiogénicos, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que promovem a neovascularização. [7][34]

2.2.3 Mastócitos

Os mastócitos, originários de células hematopoiéticas multipotentes na medula óssea, migram, através da corrente sanguínea, para os tecidos, onde maturam. [35] Normalmente encontram-se localizados na superfície epitelial de vasos sanguíneos, de nervos e de glândulas. [36] Quando nos tecidos, estímulos microambientais controlam o perfil fenotípico dos mastócitos, levando à existência de diferentes subtipos que têm em comum a mesma célula progenitora. [35] Estas células expressam muitos tipos de recetores, o que lhes permite reconhecer diferentes estímulos e reagir em conformidade. [36] As características da resposta acionada pelos mastócitos vão depender do tipo, propriedades, força e combinação dos estímulos que recebem. [35]

As funções pleiotrópicas dos mastócitos refletem a sua capacidade de segregação de um largo espectro de moléculas biologicamente ativas com propriedades pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e/ou imunossupressoras. [35] Entre estas moléculas estão vários mediadores associados a grânulos, tais como histamina, serotonina, heparina, triptase, quimase, timidina fosforilase, TNF α , VEGF, fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β) e EGF, vários mediadores derivados de lípidos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas, várias citocinas, tais como fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e IL-6, e ainda várias quimiocinas. [36] Estas moléculas podem ser divididas em duas categorias: mediadores pré-formados, que são instantânea e rapidamente libertados mediante a ativação dos mastócitos, e mediadores sintetizados de novo, que começam a ser sintetizados após a ativação dos mastócitos. [35]

A rápida libertação destas moléculas é crucial para o início da resposta imunitária no local da infeção uma vez que possibilitam a modulação da circulação das células imunes e providenciam sinais coestimuladores para a ativação dessas células. [35] Entre os produtos libertados de forma imediata pelos mastócitos, o TNF- α , uma citocina pré-formada, desempenha um papel crucial durante a imunidade inata uma vez que por induzir o influxo de neutrófilos, promove a eliminação de agentes patogénicos. [35] Os compostos libertados pelos mastócitos contribuem também para a resposta imunitária adquirida, funcionando como mediadores para o recrutamento e ativação de LB e LT. [35]

Em particular, a ativação do recetor da tirosina cinase c-Kit (c-KitR) pelo fator de células estaminais (SCF) e pela triptase desempenha um papel fundamental na angiogénese tumoral. [36] O aumento da ativação da via do c-KitR conduz à ativação dos mastócitos, que induz a libertação de citocinas pró-angiogénicas e de triptase, contribuindo desta forma para o reforço da sinalização pró-angiogénica. [36] A triptase é também um agonista do recetor ativado por proteases 2 (PAR-2), que é expresso em células epiteliais e endoteliais com atividades proteolíticas. [36] A ativação deste recetor pela triptase conduz à proliferação celular e à libertação de IL-6 e do fator estimulador de colónias de granulócitos e de macrófagos (GM-CSF), que atuam como moléculas pró-angiogénicas. [36] Além disso, a triptase degrada os componentes da matriz extracelular, ativando as MMPs e os ativadores do plasminogénico que em conjunto contribuem para a invasão e para metástase de células tumorais. [36]

Apesar de inicialmente ter sido destacado o papel destas células nas reações de hipersensibilidade, a descoberta da sua intervenção tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa permitiu redefinir a sua interação em diversos mecanismos. [36] No que respeita à imunidade inata, os mastócitos expressam alguns recetores para componentes do complemento e outros que pertencem à família de recetores *Nod-like* (NLRs). [36] Porém, o reconhecimento de patogénios pelas células imunitárias inatas e a ligação entre a imunidade inata e a adaptativa são estabelecidos através dos recetores *Toll-like* (TLRs). [36]

No CCR, os mastócitos acumulam-se em lesões pré-malignas, em pólipos adenomatosos, sugerindo seu envolvimento nestes tumores em estádios iniciais. [37] Os mastócitos contribuem também para a angiogénese no CCR, tal como refletido pelo aumento da densidade microvascular em tecidos tumorais. [37] Assim, a alta densidade microvascular e a elevada presença de mastócitos estão positivamente correlacionados entre si e níveis aumentados de ambas foram significativamente correlacionados com mau prognóstico, isto é, com um período mais curto de sobrevida livre de doença. [37] De facto, verifica-se que a maioria dos estudos realizados com o objetivo de estabelecer uma correlação entre a presença de mastócitos e o estágio/prognóstico em doentes com CCR, mostram que uma alta densidade de mastócitos está relacionada com o aumento da agressividade do tumor e com a redução da sobrevivência. [36]

2.2.4 Células *natural killer*

As células NK são linfócitos granulares que fazem parte do sistema imunitário inato, atuando como primeira linha de defesa perante a identificação de células tumorais ou células infetadas com agentes patogénicos. [7][28] No CCR, níveis elevados de células NK têm sido associados a um melhor prognóstico, verificando-se uma diminuição destes valores para fases mais avançadas do cancro. [7]

Estas células possuem dois tipos de recetores: os recetores de ativação, incluindo o NKG2D e os *killer inhibitory receptors* (KIR). [27] O recetor NKG2D reconhece diferentes ligandos ativadores que se encontram sobre-expressos nas células cancerosas. [27] Por outro lado, os KIR reconhecem moléculas de MHC de classe I e, desta forma, as células NK podem também ser ativadas pela reduzida expressão de moléculas de MHC de classe I pelas células cancerosas. [27] Uma vez reconhecido o alvo, as células NK procedem à libertação de citocinas e ao recrutamento de outras células do sistema

imunológico, predominantemente através da secreção de IFN- γ e do TNF α ou direcionando a atividade citotóxica. [28] A citotoxicidade pode ser subdividida em citotoxicidade natural, que não requer estimulação prévia, e em citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), em que os anticorpos presentes nas células alvo são reconhecidos pelas células NK CD16 (*cluster* de diferenciação 16) e, subsequentemente, eliminados. [28]

2.2.5 Células dendríticas

Considera-se a existência de dois tipos de células dendríticas: as células dendríticas convencionais (cDCs) e as células dendríticas plasmacitoides (pDCs). [38] As células dendríticas, APCs críticas para a estimulação de respostas imunitárias adaptativas antitumorais eficazes, são caracterizadas pela expressão de moléculas de MHC de classe I, moléculas de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (B7, ICAM-1, LFA-1, LFA-3 e CD40). [7][39] Estas moléculas funcionam em conjunto para gerar uma rede de sinais secundários essenciais para reforçar o sinal específico do antígeno na ativação de LT. [39] As DCs podem apresentar-se em menor número no microambiente tumoral facilitando, desta forma, a evasão tumoral ao sistema imunitário por não se registrar uma estimulação adequada dos LT. [7] Evidências sugerem que a presença de DCs pode desempenhar uma papel benéfico e significativo em doentes com CCR. [7]

As DCs processam antígenos sintetizados endogenamente em péptidos antigénicos, que são apresentados na superfície da célula pelas moléculas de MHC de classe I e reconhecidos pelos recetores dos LT (TCRs) em linfócitos T CD8+ *naive*. [39] As DCs podem também capturar e processar antígenos exógenos, que são apresentados por moléculas de MHC de classe I através de uma via endógena num processo conhecido como "*cross-presentation*". [39] Para além disso, os antígenos exógenos são também capturados pelas DCs e, no compartimento endossomal/lisossomal, são degradados em peptídeos antigénicos por proteases e peptidases. [39] Estes antígenos, em seguida, complexam com moléculas de MHC de classe II para reconhecimento pelo TCR de linfócitos T CD4+ *naive*. [39] A eficiente apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I e de classe II nas DCs é essencial para desencadear respostas imunitárias específicas para o tumor. [39] As DCs maduras são mais eficientes no que respeita ao processamento e apresentação do complexo MHC-peptídeo ao TCR e à indução dos

linfócitos T citotóxicos (T_C) devido à maior expressão de MHC de classe I e de classe II e de moléculas coestimuladoras. [39]

As DCs imaturas residem nos tecidos periféricos onde capturam e processam os antígenos, degradando-os a péptidos. [39] Esses péptidos complexam com moléculas de MHC de classe I para apresentação a linfócitos T_C CD8+ ou complexam com moléculas de MHC de classe II para a apresentação a linfócitos T_H CD4+. [39] A diferenciação das DCs imaturas em DCs maduras é desencadeada por estímulos moleculares que são libertados em resposta a alterações dos tecidos e a respostas inflamatórias locais causadas por patógenos. [39] Depois da captação dos antígenos e da estimulação pela resposta inflamatória, as DCs imaturas nos tecidos periféricos sofrem um processo de maturação caracterizado pelo aumento da expressão de moléculas de MHC de classe I e de classe II, de moléculas coestimuladoras e de receptores de quimiocinas, tais como CCR7, e pelo aumento da secreção de citocinas, tais como a IL-12. [39] As DCs maduras migram para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam os antígenos aos linfócitos T CD4+ e CD8+. [39]

2.2.6 Neutrófilos

Os neutrófilos são produzidos por hematopoiese na medula óssea, derivando de precursores mielóides; são libertados no sangue periférico e circulam por sete a dez horas antes de migrarem para os tecidos, onde têm um tempo de vida de apenas alguns dias. [40][24] De entre os vários tipos de leucócitos presentes no sangue, os neutrófilos são os que se encontram em maior abundância. [40]

Em resposta a vários tipos de infecções, verifica-se um aumento do número de neutrófilos libertados pela medula óssea, sendo que, geralmente, estas células são as primeiras a chegar ao local de inflamação. [24] Uma série de substâncias geradas durante uma reação inflamatória funcionam como fatores quimiotáticos promovendo a acumulação de neutrófilos no local da inflamação. [24] Entre estes fatores quimiotáticos, estão alguns dos componentes do complemento, componentes do sistema de coagulação sanguínea e várias citocinas secretadas por linfócitos T_H ativadas e por macrófagos ativados. [24]

Os neutrófilos ativados são capazes de produzir e libertar mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-1, a IL-8 e a proteína inflamatória de macrófagos 1s (MIP-1s). [9] Os neutrófilos sintetizam e armazenam nos grânulos citoplasmáticos grandes

quantidades de ROS, de serina-proteases e de enzimas, incluindo a mieloperoxidase (MPO) e a lisozima. [9] A MPO é responsável pela formação de ácido hipocloroso que é citotóxico. [9] Para além disso, a IL-23 e a IL-17 ativam a inflamação pelos neutrófilos pela indução da síntese e libertação de MPO, de MMP-8 e de MMP-9, contribuindo, como as serina-proteases, para a destruição dos tecidos através da sua atividade proteolítica. [9]

O rácio de neutrófilos/linfócitos (NLR), calculado pela divisão do número de neutrófilos pelo número de linfócitos, é sugerido como sendo um marcador de resposta imunológica geral a vários estímulos de *stress*. [41] Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na proliferação do tumor, produzindo uma série de ligandos que induzem a proliferação e invasão de células tumorais e promovendo a vascularização tumoral pela libertação de quimiocinas pró-angiogénicas e de outros fatores. [41] Constata-se portanto que o aumento da população de neutrófilos pode promover o crescimento tumoral e a metastização. [41] Por outro lado, os linfócitos têm um papel chave na supressão de tumores. [41] Um decréscimo no número de linfócitos prejudica a resposta imune antitumoral do hospedeiro e confere um mau prognóstico. [41] O NLR pode, portanto, ser considerado como um equilíbrio entre o estado pró-tumoral de inflamação e o estado antitumoral imune. [41] Apesar de, em estudos anteriores, os valores de *cut-off* oscilarem entre 2,5 a 5, as evidências sugerem que a um NLR elevado está significativamente associado um mau prognóstico em doentes com CCR. [40][41]

2.3 Imunidade adquirida

O reconhecimento pelas células imunitárias inatas inicia uma cascata inflamatória que conduz à ativação de uma resposta imunitária adaptativa. [26] A imunidade adquirida responde com um elevado grau de especificidade aos antígenos, reconhecendo-os e eliminando-os. [24] Numa situação de neoplasia, a imunidade adquirida irá corresponder a uma resposta específica dirigida a um determinado antígeno associado ao tumor. [29]

A imunidade adquirida apresenta essencialmente quatro atributos característicos: especificidade antigénica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento próprio/não-próprio. [24]

Uma resposta adquirida efetiva requer a cooperação entre dois importantes grupos de células – os LT e as APCs. [24]

2.3.1 Linfócitos B

Os LB têm como precursores as células-tronco hematopoiéticas e desenvolvem-se por um processo fortemente regulado, conduzindo à geração de LB que apresentam diferentes fenótipos e funções. [42] Após maturação na medula óssea, cada linfócito expressa, na sua membrana, um único recetor de antígenos, que reconhece epítomos antigénicos específicos. [7][24] Este recetor de antígenos, ou recetor do linfócito B, corresponde a um anticorpo ligado à membrana. [24] Desta forma, as diferentes populações de LB podem ser identificadas pela expressão de anticorpos de superfície específicos. [42]

O reconhecimento e ligação de um antígeno ao anticorpo de um linfócito B *naive*, induz uma rápida divisão celular do LB com posterior diferenciação em LB memória e LB efetores (também designadas como células plasmáticas ou plasmócitos). [24] O anticorpo de membrana expresso pelos LB memória é igual ao do LB do qual é proveniente. [24] Os plasmócitos produzem anticorpos que na sua maioria são excretados, possuindo poucos ou nenhuns ligados à membrana. [24]

É função dos LB a apresentação de antígenos para a iniciação da resposta imunitária pelos linfócitos T. [7] Os LB podem ainda desempenhar um papel significativo como células reguladoras tanto em situações de infeção como de autoimunidade, através da produção de citocinas supressoras, tais como IL-4, IL-10 ou TGF- β . [7] O papel desempenhado pelos LB em situações de cancro é complexo e, portanto, um pouco controverso. [7] Dependendo do seu estado de ativação, foram já descritas funções divergentes dos LB quanto à diferenciação e função efetora dos LT. [7] Foi reportado que os LB em repouso suprimem a imunidade antitumoral mediada pelos LT, atuando tanto nos LT CD4⁺ como nos CD8⁺. [7] Por outro lado, tem sido também sugerida a eficácia dos LB ativados na imunoterapia dirigida a neoplasias. [7]

2.3.2 Linfócitos T

Os LT são produzidos na medula óssea; no entanto, em oposição aos LB, migram para o timo onde completam o processo de maturação. [24] Durante este processo, os LT passam a exprimir, na sua membrana, uma molécula de ligação ao antígeno única, designada por TCR. [24]

Encontram-se definidas, principalmente, duas subpopulações de LT, os T_H e os T_C. [24] Estas células podem ser distinguidas pela presença das glicoproteínas de

membrana CD4 ou CD8. [24] Geralmente, os LT que expressam CD4 funcionam como linfócitos T_H e os que expressam CD8 funcionam como linfócitos T_C . [24]

Distintamente dos anticorpos ligados às membranas dos LB, que apresentam capacidade de reconhecer os antígenos livres, os TCRs apenas reconhecem antígenos ligados a proteínas de membrana celular, conhecidas como moléculas do MHC. [24] Admite-se a existência de dois tipos de moléculas de MHC: as moléculas de MHC de classe I, que são expressas pela maioria das células nucleadas, e as de classe II, que são unicamente expressas pelas APC. [24] Quando um linfócito T *naive* encontra um antígeno combinado com uma molécula de MHC numa célula, verifica-se uma proliferação do linfócito T e diferenciação em LT memória e LT efetores. [24]

Após o reconhecimento e interação de um linfócito T_H com o complexo antígeno-MHC II, a célula é ativada e incorre numa transformação metabólica, tornando-se numa célula efetora que secreta citocinas. [24] Estas citocinas desempenham um papel importante na ativação dos LB, LT, macrófagos e várias outras células que participam na resposta imune. [24] Os diferentes padrões de resposta imune irão pois surgir em função da heterogeneidade de citocinas produzidas pelos linfócitos T_H . [24] Os linfócitos T_H podem ser subdivididos em linfócitos T_{H1} e T_{H2} . [7] Os linfócitos T_{H1} segregam citocinas, tais como o $IFN-\gamma$ e o $TNF\alpha$, e dão suporte aos linfócitos T_C pela produção de IL-2, necessária para a proliferação dos linfócitos T CD8+. [7] Por outro lado, os linfócitos T_{H2} segregam principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, e limitam a proliferação dos linfócitos T_C . [7]

Os linfócitos T_C constituem um dos principais intervenientes no que concerne à imunidade antitumoral. [7] Após a interação de uma célula tumoral com o complexo antígeno-MHC I, para o qual o TCR é específico, os LT CD8+ proliferam e diferenciam-se. [7] Uma vez ativados, os linfócitos T_C podem mediar a destruição específica de células tumorais através da libertação de componentes líticos via interação célula-célula. [7] A perforina, uma proteína citolítica encontrada nos grânulos de linfócitos T CD8+ e em células NK, e as proteases enzimáticas, incluindo a granzima B, são segregadas determinando a morte celular pela ruptura da membrana celular e ativação da via apoptótica, respetivamente. [7]

Os linfócitos T reguladores (Treg) têm sido definidos como uma população de LT que funcionalmente suprime uma resposta imune por influenciar a atividade de um outro tipo de células. [7] Os linfócitos Treg foram categorizados em duas classes principais com base na sua ontogenia: Treg de ocorrência natural (nTreg), que se desenvolvem no timo

e estão presentes no organismo humano desde um período pós-natal precoce, e Treg que podem surgir na periferia (ou *in vitro*). [7] Os nTreg são caracterizados pela sua elevada expressão de CD25 (CD4+CD25+) e pela coexpressão da FOXP3. [7] Os linfócitos Treg funcionam de forma a manter a homeostase imune e a limitar a inflamação aguda. [7] Estas células interferem com a ativação dos LT e podem afetar a função antitumoral das células efetoras através da secreção de TGF- β e de IL-10. [7] Uma série de investigações sugere que a infiltração do tumor por linfócitos Treg pode estar associada a repercussões negativas no prognóstico. [7] No entanto, o aumento dos níveis de linfócitos Treg foi associado a um prognóstico favorável no CCR. [7] Os mecanismos deste duplo efeito, que parece dependente do tipo de tecido, não estão completamente esclarecidos, embora se coloque a hipótese de que os linfócitos Treg possam suprimir a inflamação induzida pelos fatores de crescimento de células do sistema imunitário inato. [7]

III. RECETORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO

Os recetores de reconhecimento padrão (PRRs) podem ser divididos em cinco subfamílias distintas: recetores *Toll-like*, recetores de lectina tipo C (CLRs), recetores *NOD-like* (NLRs), recetores *RIG-1-like* (RLRs), e recetores *AIM-2-like* (ALRs). [43] Estas subfamílias de PRRs diferem nas suas estruturas, nos padrões de localização, nos diferentes tipos de ligandos que reconhecem e na ativação de cascatas de sinalização intracelular específicas que medeiam uma variedade de respostas, tais como a regulação da transcrição de genes, a ativação e proliferação de células e a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas antivirais. [43]

3.1 Recetores *Toll-like*

Embora sejam classificados como PRRs do sistema imunitário inato, os TLRs ativam também classes de células associadas ao sistema imunitário adaptativo, estando envolvidos na ligação entre estes dois sistemas. [25][44]

Os TLRs pertencem a uma classe de glicoproteínas transmembranares do tipo I. [45] Estes recetores apresentam três domínios: um domínio extracelular N-terminal que consiste em repetições ricas em leucina (LRR), que reconhece os padrões moleculares

associados a patogénios (PAMPs) e os padrões moleculares associados a perigo (DAMPs, que são libertados a partir de células sob *stress* ou em necrose), um domínio transmembranar e um domínio intracelular/citoplasmático C-terminal homólogo ao recetor Toll/Interleucina-1 (TIR), que interage com moléculas adaptadoras para a propagação dos sinais da via efetora. [43][45][46]

Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patogénios ou a organismos comensais da flora intestinal, desencadeando a ativação de cascatas de sinalização intracelular que conduzem à indução de genes envolvidos na defesa antimicrobiana do hospedeiro, tais como os que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. [14][46] Atualmente encontram-se identificados dez tipos de TLRs em humanos. [45][46] Os TLRs podem localiza-se na superfície da célula (TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou nos endossomas (TLR3, 7, 8 e 9). [45] Devido ao pequeno repertório de TLRs disponíveis para reconhecer uma combinação virtualmente ilimitada de PAMPs, cada TLR deve ser capaz de detetar e responder a um grande número de agentes patogénicos, tais como bactérias, fungos, protozoários e vírus. [43] Assim, a sinalização *downstream* e a subsequente estimulação imune são de grande variedade entre os subtipos de TLRs. [23] Por exemplo, os TLRs 1, 2, e 6 reconhecem lipopéptidos, glicopéptidos, e acil-peptídeos expressos nas superfícies de várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de micobactérias. [43] A cooperação adicional entre os TLRs 1, 2, 6 permite-lhes ainda discriminar diferentes componentes microbianos. [43] O TLR4 reconhece componentes de lipopolissacáridos da parede celular de bactérias Gram-negativas através do seu correceptor DM-2. [43] Além disso, o TLR4 também pode reconhecer ligandos endógenos, tais como proteínas de choque térmico, componentes da matriz extracelular, ácido hialurónico e sulfato de heparina. [43] Os TLRs 3, 7 e 9 reconhecem ácidos nucleicos tais como ácido ribonucleico de cadeia simples (ssRNA), ácido ribonucleico de cadeia dupla (dsRNA), e ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (dsDNA), e são vitais para as respostas antivirais. [43]

Os complexos padrões de expressão dos TLRs diferem entre os tipos de células, localização fisiológica e são controlados pelo microambiente. [23] Os TLRs são constitutivamente ou indutivamente expressos por um número de diferentes tipos de células no TGI, incluindo células epiteliais intestinais, monócitos, macrófagos, LT, DCs, miofibroblastos, células endoteliais e adipócitos. [44][47] No TGI saudável, os TLRs são expressos pelas IEC e desempenham funções na modulação imune e na homeostase dos tecidos, estimulando a resposta imunitária contra agentes patogénicos bacterianos,

atenuando a resposta imune contra bactérias comensais, detetando ruturas nas barreiras de proteção intestinal e desencadeando sinalização proliferativa. [14][23]

O lúmen do intestino é submetido a contínuas interações com microrganismos e estaria num estado constante de inflamação, se não fosse a expressão controlada destes TLRs. (48) A ativação anormal destas vias pode pôr em perigo os processos fisiológicos normais e causar doenças inflamatórias, cancro e doenças autoimunes. [45][43] Vários polimorfismos nos genes que codificam os TLRs estão associados a alterações na vulnerabilidade a estas patologias. [46]

3.1.1 Moléculas adaptadoras

Existem quatro principais moléculas adaptadoras intervenientes nas vias de sinalização que envolvem os TLRs: o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), o domínio TIR contendo uma proteína adaptadora (TIRAP, também conhecido como MAL), o domínio TIR contendo uma proteína adaptadora indutora do IFN- β (TRIF) e a molécula adaptadora relacionada com o TRIF (TRAM). [43] Estas moléculas adaptadoras são usadas em várias combinações pelos diferentes TLRs sendo que, generalizadamente, se considera a existência de duas vias principais, que são designadas como dependentes ou independentes do MyD88. [43][46] Com a exceção do TLR3, todos os TLRs seguem uma via de sinalização dependente do MyD88. [43][46]

Na figura 1 encontra-se um esquema representativo da via de sinalização dependente do MyD88 e da via de sinalização independente do MyD88.

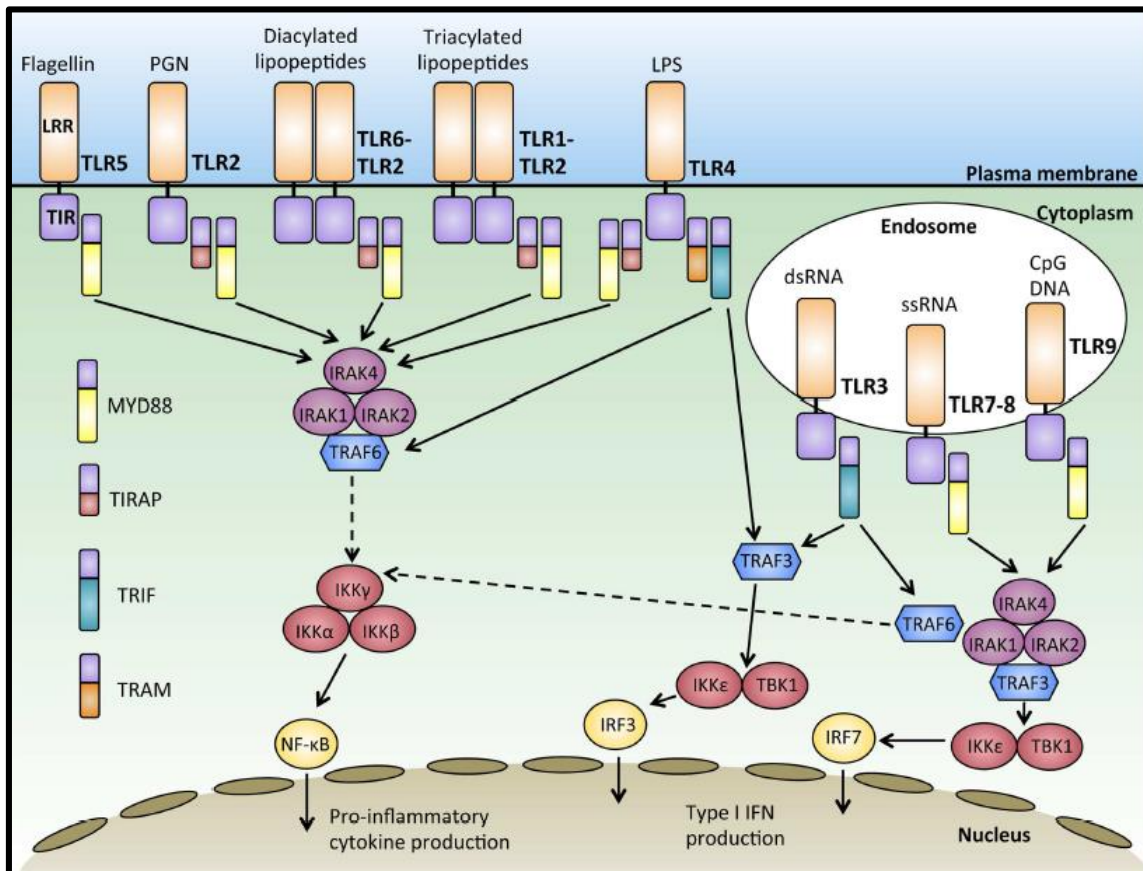


Figura III-1: Via de sinalização dependente do MyD88 e via de sinalização independente do MyD88 (adaptado de [43])

3.1.2 Via de sinalização dependente do MyD88

A proteína MyD88 contém dois principais domínios proteicos: um domínio TIR C-terminal e um domínio N-terminal, conhecido como *death domain* (DD). [43] Após a ativação do TLR, o MyD88 é recrutado para o domínio TIR do TLR através da interação TIR-TIR. [43] A cinase serina-treonina, cinase 4 associada ao recetor da IL-1 (IRAK4), é então recrutada para o MyD88 através da interação dos seus domínios DD. [43] A IRAK4, em seguida, recruta e fosforila a IRAK1 e a IRAK2 para formar uma estrutura conhecida como o *myddosome*. [43] A fosforilação das IRAKs 1 e 2 permite-lhes interagir com o fator 6 associado ao recetor do TNF, ubiquitina-ligase E3 (TRAF6) através do seu domínio de ligação TRAF. [43] O TRAF6, em seguida, procede à ubiquitinação e ativação da cinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformador β (TAK1), que, por sua vez, tem capacidade para ativar tanto a via do fator nuclear κ B (NF- κ B) como a via da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK). [43][48] Nas células em repouso, os

dímeros de NF- κ B mantêm-se numa forma inativa no citoplasma pela ligação a proteínas I κ B. [43] No processo de ativação, a TAK1 fosforila e ativa a cinase I κ B (IKK), que por sua vez induz a degradação proteossomal da I κ B, libertando assim o NF- κ B. [50] A TAK1 também ativa a via da MAPK, que conduz à ativação da cinase c-Jun N-terminal (JNK), que ativa a família Jun de fatores de transcrição. [43]

A via dependente do MyD88 pode ser iniciada pelos TLR5 e TLR7-9 utilizando apenas o MyD88, enquanto que, para iniciar a sinalização pelos TLR2 e TLR4, é também necessária a proteína adaptadora TIRAP. [43] Neste subconjunto de TLRs, a TIRAP atua como uma molécula de triagem, necessária para o recrutamento eficiente de MyD88 para os TLRs ativados, de forma a iniciar a transdução de sinal que conduz à ativação do NF- κ B e à produção de citocinas pró-inflamatórias. [43] Durante a ativação do TLR7 e do TLR9, o MyD88 recruta também TRAF3 para ativar a TBK1 e a IKK ϵ , que fosforila o fator regulador 7 do interferão (IRF7) e leva à produção de IFN- α . [43] A produção de IFN- α , tal como com a produção de outros IFNs, é particularmente importante para as respostas antivirais. [43]

3.1.3 Via de sinalização independente do MyD88

O processo de sinalização independente do MyD88 do TLR3 requer a presença da molécula adaptadora TRIF para a ativação das vias de sinalização subsequentes, incluindo a ativação do IRF3 e a produção de IFN- β . [43] Tem também sido evidenciado que esta molécula adaptadora, TRIF, participa na via de sinalização do TLR4 no que se refere às respostas ao IFN do tipo I. [43] Após a sinalização por um ligando, o TRIF recruta TRAF3, que atua como um suporte para a ativação dos IKKs, TBK1 e IKK ϵ , conduzindo à fosforilação e ativação do fator de transcrição IRF3 e à transcrição do IFN- β . [43]

Enquanto que o TLR3 pode ativar esta via utilizando apenas o TRIF, o TLR4 necessita também de outra molécula adaptadora, a TRAM, uma vez que esta atua facilitando o recrutamento do TRIF para o TLR4. [43] Após a ativação do TRIF, o TRAF6 é recrutado, ativando então a TAK1 através de ubiquitinação e conduzindo à subsequente ativação do NF- κ B. [43]

Curiosamente, tem sido demonstrado que o TRAF3 desempenha papéis importantes tanto na regulação da resposta dependente como da resposta independente do MyD88 através da sua ubiquitinação diferencial. [43] A sinalização independente do MyD88 desencadeia a autoubiquitinação não-degradante do TRAF3, promovendo a

ativação do IRF3. [43] Por outro lado, a via dependente de MyD88 resulta na ubiquitinação degradante de TRAF3 e na ativação da TAK1. [43] Deste modo, o TRAF3, pelas vias dependente e independente do MyD88, atua de forma a garantir um equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e a resposta pela produção de IFN. [43]

3.1.4 TLRs na carcinogénese

Os TLRs funcionam como moduladores essenciais do sistema imunitário do TGI. [23] De forma a manter a homeostase e a suprimir respostas imunes contra organismos comensais, a expressão e a sinalização dos TLRs são estritamente controladas. [23] No entanto, este controlo não se encontra assegurado em algumas patologias, tais como a colite ulcerosa e a doença de Crohn, resultando em inflamação crónica. [23]

A inflamação está associada ao cancro pela via extrínseca, em que a inflamação é induzida por células não transformadas (por exemplo, patógenos invasores ou doenças autoimunes), e pela via intrínseca, em que a inflamação é induzida por células transformadas. [23] No CCR, os TLRs estão envolvidos em ambas as vias. [23] As doenças autoimunes causam inflamação crónica que predispõem os indivíduos ao desenvolvimento de CCR. [23] Por sua vez, uma vez iniciados, os tumores podem intrinsecamente ativar a inflamação através da ligação de DAMPs relacionados com o cancro aos TLRs. [23] A ativação, intrínseca ou extrínseca, dos TLRs resulta na promoção do crescimento tumoral através da via de sinalização do NF- κ B, que conduz à expressão de citocinas inflamatórias tais como a IL-1 β , a IL-6 e o TNF α . [23] Esta expressão aberrante pelas células tumorais no início da carcinogénese pode acionar o recrutamento de células do sistema imunológico pró-tumorigénicas que induzem a inflamação e a proteção contra células imunes citotóxicas. [23]

De facto, os TLRs têm sido investigados em vários modelos experimentais de tumores, verificando-se que desempenham diferentes papéis - enquanto que alguns inibem a progressão do tumor, outros facilitam a evasão da vigilância imunológica. [49] No entanto, os mecanismos exatos pelos quais estes recetores influenciam a progressão do CCR permanecem controversos. [50]

3.1.4.1 Recetor *Toll-like 2*

A complexa resposta do TLR2 é ainda complicada pela sua capacidade de interagir com múltiplos corretores, incluindo o TLR1 e o TLR6. [47][43] O TLR2 é funcionalmente expresso por diferentes tipos de células, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, DCs, mastócitos e células tumorais. [47][14] No CCR o papel do TLR2 é ainda controverso, podendo promover ou suprimir o crescimento do tumor de um modo dependente do contexto. [46][51]

Nas células epiteliais do intestino saudável, o papel dos TLRs2 consiste em manter a tolerância a componentes de organismos comensais. [47] Uma vez que a baixa expressão do TLR2 é importante para garantir a tolerância, existem vários mecanismos que contribuem para manter uma baixa expressão, tais como o aumento da expressão de reguladores negativos e a ativação de vias de sinalização celular que induzem a produção de IL-10. [47] A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, inibe funções dos macrófagos e de DCs efectoras, limita as respostas imunes e promove a diferenciação e ativação local de linfócitos Treg. [47]

A sinalização desencadeada pelos TLRs2 é crítica para a aquisição de propriedades funcionais pelas DCs associadas ao intestino, incluindo a sua capacidade para produzir o ácido retinóico, que intervém na migração dos linfócitos para o intestino e na ativação dos linfócitos Treg. [47] Por outro lado, a estimulação dos TLRs2 pode promover a resposta pelos linfócitos T_H17 e pode reduzir a função supressora dos linfócitos Treg pela indução preferencial da produção de IL-17. [47] A IL-17 é produzida por um subconjunto de linfócitos T_H , os linfócitos T_H17 , que é caracterizado pela produção de IL-17, IL-22 e $TNF\alpha$. [14]

Desta forma, torna-se possível inferir que o TLR2, induzindo efeitos pró e anti-inflamatórios, tem uma ação controversa. [47] Em todo o caso, é de salientar que a capacidade da sinalização desencadeada pelo TLR2 produzir respostas pró e/ou anti-inflamatórias é influenciada pelo microambiente imunológico intestinal no qual a resposta imunitária, a inflamação e a homeostase local são modulados. [47]

Por outro lado, surgem também estudos que demonstraram que os TLRs podem ser expressos pelos LT convencionais e pelos linfócitos Treg. [52] Num estudo conduzido por Olivier *et al*, foi observado que, no estado estacionário, os linfócitos Treg apenas

expressam TLR1 e, em níveis muito baixos, TLR2. [53] No entanto, o perfil de expressão dos TLR nos linfócitos Treg permanece controverso. [53]

Para avaliar o impacto da deficiência de TLR2 no desenvolvimento do CAC, Lowe *et al* utilizaram um modelo com administração de AOM/DSS (azoximetano/sulfato de sódio dextrano) em ratinhos. [54]

Em comparação com os ratinhos *wild type*, nos ratinhos com um genótipo TLR2^{-/-} observaram um incremento da inflamação caracterizado pelo aumento da infiltração por células imunitárias, pelo aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17A e TNF α) e pelo aumento da expressão do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) fosforilado. [54] Estes dados foram correlacionados com o facto de também nos ratinhos com um genótipo TLR2^{-/-} se ter verificado um aumento significativo do número de tumores bem como um aumento da área abrangida por cada tumor. [54] Desta forma, estes investigadores concluíram que a deficiência em TLR2 não só induziu a promoção tumoral como também induziu a progressão tumoral. [44] Evidências de uma outra investigação corroboram esta informação, apontando que, na colite, o TLR2 desempenha um papel de proteção contra o desenvolvimento de CAC. [46]

Estes investigadores apontaram também para o facto de a IL-6, o NF- κ B e o STAT3 ativado estarem interligados no desenvolvimento do CAC. [54] Se por um lado se verifica que o STAT3 pode aumentar a atividade do NF- κ B nas células tumorais, por outro lado verifica-se que a ativação do STAT3 nas células imunitárias do tumor é dependente do NF- κ B e da IL-6, sendo esta resultante da atividade do NF- κ B. [54] Curiosamente, o STAT3 apresentou também capacidade de inibição sobre as IKKs, reduzindo desta forma a resposta imunitária dos linfócitos T_H1 induzida pelo NF- κ B. [54]

Neste modelo de indução de CAC, observou-se que os ratinhos com o genótipo TLR2^{-/-} produziram níveis significativamente menores de IFN- γ e significativamente maiores de TGF- β , que, associados ao aumento da produção de IL-6, conduziram ao aumento dos linfócitos T_H17. [54] De facto, vários modelos animais de CAC apontam para a existência de uma correlação entre a produção da IL-17 e o aumento da tumorigénese. [54]

Resultados de outras investigações permitiram observar que a sinalização desencadeada pelos TLRs2 permite controlar a inflamação e proteger a mucosa intestinal pela regulação das *tight junctions*, associadas à manutenção da integridade da função de

barreira. [47][54] No entanto, estas ações foram maioritariamente associadas a episódios agudos de inflamação. [47] Em situações de inflamação crónica, os TLRs2 demonstraram apenas efeitos moderados sobre a regulação dos processos inflamatórios. [47]

Em contraste com o previamente disposto, um crescente conjunto de evidências sugere que, em comparação com indivíduos saudáveis, no epitélio intestinal de indivíduos com CCR ou com DIIs o TLR2 encontra-se sobre-expresso. [55]

Para determinar os potenciais papéis dos TLRs na regulação da tumorigénese, um grupo de investigadores avaliou a expressão do TLR2 em células tumorais e em células não tumorais do mesmo indivíduo, concluindo que os TLRs2 se encontram sobre-expressos nos tecidos com CCR. [55] O perfil de expressão do TLR2 nos tecidos humanos com CRC revelou que níveis elevados de TLR2 estão correlacionados com graus mais avançados da patologia e com metástases nos nódulos linfáticos, sugerindo uma associação entre a expressão do TLR2 e a progressão do tumor. [55] Por conseguinte, níveis elevados de TLR2 estão correlacionados com uma menor sobrevivência global dos doentes com CCR. [55]

Estes autores fazem referência a uma série de experiências *in vitro*, em que o TLR2 foi identificado como um recetor essencial na indução da inflamação através da ativação da via de sinalização intracelular que resulta na ativação do NF- κ B e na secreção de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-1 β . [55] No entanto, apontam para o facto de a causa da sobre-expressão do TLR2 em cancros humanos ainda não estar elucidada. [55]

Uma outra abordagem surge ainda de Boulard *et al*, que, para definirem o papel dos TLRs2 na indução e na regulação da inflamação intestinal crónica, examinaram os efeitos da supressão do TLR2 em vários modelos de DIIs. [56] Os resultados mostraram que os sinais gerados pela ativação dos TLRs2 não são necessários para a indução de inflamação intestinal crónica quer por respostas imunes inatas quer por respostas imunes adaptativas. [56] Demonstraram ainda que os ratinhos com genótipo TLR2^{-/-} apresentam níveis normais de Treg e são capazes de suprimir a inflamação intestinal de forma tão eficaz como os ratinhos *wild type*. [56] Para além disso, negaram a existência de qualquer função intrínseca à sinalização do TLR2 necessária para as respostas patogénicas desencadeadas pelos linfócitos T no intestino. [56] Estes resultados sugeriram que as bactérias intestinais desencadeiam uma resposta inflamatória crónica através da

estimulação de outras vias de PRR e que a modulação da sinalização dos TLRs2 pode ter um impacto limitado durante a fase crónica da inflamação intestinal. [56]

3.1.4.2 Recetor *Toll-like* 4

O TLR4 é expresso e funcionalmente ativo em células cancerosas, atuando na promoção do seu escape imune através da indução de fatores imunossupressores e quimiocinas, tais como o TGF- β , o NO, a IL-8, a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e a MMP-9, bem como pela resistência à apoptose. [46][57] De facto, no CCR, a expressão elevada de TLR4 é observada em todos os componentes tumorais, tais como as camadas epitelial, endotelial e do estroma. [45] Quanto às células não cancerosas, o TLR4 é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos, CDs mieloides, mastócitos, LB e IECs. [47]

Fukata *et al* demonstraram que o TLR4 encontra-se sobre-expresso em humanos no CAC. [58] Num modelo animal de tumorigénese do colón induzida por inflamação em que foi administrado AOM a ratinhos *wild type*, a sobre-expressão do TLR4 foi também confirmada; mais ainda, verificou-se que a deleção de TLR4 induziu a sua proteção contra a tumorigénese no cólon. [58] Concluíram que o TLR4 é necessário para a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e para a produção aumentada da prostaglandina E2 (PGE2) observada na colite crónica. [58] Para além disso, mostraram que a tumorigénese dependente do TLR4 está também associada à ativação da sinalização pelo recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). [58]

A sinalização pelo TLR4 integra a sinalização inflamatória e a tumorigénese através das duas vias: COX-2-PGE2 e AR-EGFR (anfiregulina-EGFR). [59] A sinalização pelo TLR4 induz a ativação da COX-2 em macrófagos da lâmina própria e, em menor extensão, nas células epiteliais, o que resulta num aumento da PGE2, pela atuação da COX-2 no ácido araquidónico (AA). [59] A PGE2, por sua vez, pela ligação aos seus recetores, ativa um conjunto de moléculas que estão associadas com a proliferação celular, como por exemplo a anfiregulina. [59] Esta sobre-regulação da PGE2 parece ser necessária para a restituição da mucosa em resposta a lesões epiteliais. [50] No entanto, a ativação continuada deste eixo, TLR4-COX-2-PGE2, pode resultar na proliferação de células epiteliais aberrantes e, portanto, levar ao desenvolvimento de CAC. [59] Para além disso, verificou-se que na inflamação crónica se forma um ciclo de *feedback* positivo na mucosa intestinal: a expressão aumentada do TLR4 da mucosa induz

a ativação da COX-2, que por sua vez produz a PGE2; a PGE2 por sua vez estimula a COX-2 dos macrófagos da mucosa, o que induz ainda uma maior produção de PGE2. [59] Por conseguinte, a ação contínua do eixo TLR4-COX-2-PGE2 durante a fase crónica da colite pode ser o fator chave na patogénese do CAC. [59] O outro mecanismo subjacente à proliferação epitelial mediada pelo TLR4 corresponde à via TLR4-AR-EGFR. [59] Na mucosa, a expressão dos ligandos do EGFR, anfiregulina e epirregulina, é regulada pelos TLR4 durante a colite. [59] Uma vez que a epirregulina é expressa durante a fase aguda da colite e a anfiregulina é sobre-expressa no período crónico da colite, são apontados diferentes papéis para estes ligandos na reparação da mucosa. [59] Pensa-se que a produção de AR pela mucosa seja mais responsável pela tumorigénese intestinal do que epirregulina, embora ambos os ligandos induzam a ativação do mesmo recetor. [59]

Para demonstrar o papel da sinalização pelo TLR4 na tumorigénese, Wang *et al* examinaram a expressão do TLR4 e do MyD88 no CCR, e verificaram a existência de uma associação entre a alta expressão de TLR4/MyD88 e a presença de CCR com metástases hepáticas. [57] Desta forma, concluíram que a sinalização por TLR4/MyD88 promove a progressão do CCR pela sua contribuição para a formação de metástases no fígado. [59] Para além disso, as suas descobertas sugeriram também que a sinalização desencadeada por TLR4/MyD88 contribui para a tumorigénese não só do CCR associado a colite, mas também do CCR esporádico. [57] Por último, os resultados obtidos permitiram também demonstrar que a sobre-expressão de TLR4/MyD88 é um fator de prognóstico independente e significativo da sobrevida livre de doença para cinco anos e da sobrevida geral. [57] De um modo análogo, também noutros estudos, usando modelos animais, se verificou que o silenciamento da via de sinalização TLR4/MyD88 em células tumorais resulta não só na redução formação de tumores, mas também no prolongamento da sobrevivência. [57]

3.1.4.3 Recetor *Toll-like* 9

O TLR9 é preferencialmente expresso nas membranas endossomais de LB e de pCDs e é ainda conhecido pela sua capacidade de estimular reações imunitárias específicas através da ativação de respostas inatas do tipo inflamatório. [60] Após a ativação, outras células imunitárias adicionais expressam também este recetor, nomeadamente os neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos T CD4+. [60] Tem também sido relatada a expressão de TLR9 em células epiteliais normais, incluindo as

células epiteliais intestinais, bem como em células e tecidos tumorais. [60] Nas células epiteliais intestinais, a expressão deste recetor é verificada tanto na membrana apical como na membrana basolateral. [61]

Os TLRs9 podem ser ativados por fragmentos de DNA bacterianos ou virais, por complexos de DNA-imunoglobulina ou por oligonucleótidos sintéticos, sendo que todos contêm sequências de nucleótidos de citosina-guanina (CpGs) não metilados. [62]

A ativação das pDCs, mediada pelos TLRs9, conduz à produção de IFN- α e de INF- β , que por sua vez atuam em diferentes tipo de células, tais como as células NK, os LT e as cDCs. [38] Estas células NK produzem IFN- γ que por sua vez ativa as cDCs. [38] A ativação das cDCs promove sua maturação, traduzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12 e IL-18, de moléculas coestimuladoras, tais como CD80, CD86 e CD40, e de moléculas do MHC. [5][38][47] As moléculas coestimuladoras e as moléculas de MHC são essenciais para a apresentação de antígenos aos LT *naive*, enquanto que as citocinas pró-inflamatórias são requeridas para a resposta imunitária mediada pelos linfócitos T_{H1}. [38][60]. A diferenciação das T_{H1} pode promover tanto a atividade dos linfócitos T_C como dos LB e diminuir a atividade dos linfócitos T_{H2}. [38]

Tem sido descrito que a ativação epitelial apical dos TLRs9 por DNA contribui para a manutenção da homeostase do cólon. [61] De facto, verifica-se que ratinhos deficientes em TLR9 apresentam maior suscetibilidade para o desenvolvimento de colite e que polimorfismos genéticos do TLR9 estão associados a um risco acrescido de desenvolvimento de DIIs. [61]

Estudos acerca da localização dos TLR9 nas células epiteliais intestinais sugeriram que a ativação pode ocorrer tanto através da superfície apical como da basolateral e a sinalização desencadeada em cada uma das situações determina se a resposta é tolerogénica ou inflamatória, respetivamente. [47] A ativação apical de TLR9 não induz a via de sinalização do NF- κ B. [47] Em contraste, a ativação basolateral do TLR9 ativa a sinalização pelo NF- κ B que, por sua vez, irá induzir a produção de IL-8. [47] Na ausência de TLR9, há um aumento de linfócitos Treg do intestino delgado, o que leva a uma incapacidade para proteger contra a infeção. [47]

Num modelo animal em que utilizou DSS para indução de colite, O'Hara *et al* demonstraram que a infeção por *Campylobacter jejuni*, uma das principais causas de gastroenterite, atenua o reforço da função barreira do epitélio mediado pelos TLRs9. [61] Verificaram que os ratinhos infetados com esta bactéria, nos quais se observaram níveis epiteliais reduzidos de TLR9, apresentaram maior sensibilidade a estímulos químicos,

exibindo sinais de inflamação significativamente mais graves. [61] Desta forma, postularam que a exacerbação dos sintomas de DIIs após uma infecção bacteriana pode ser explicada pela diminuição da função dos TLR9. [61] Estes investigadores demonstraram também que, em oposição à ativação apical dos TLRs9, a ativação basolateral não induz um aumento da função barreira epitelial. [61] A ativação basolateral destes recetores foi antes associada a indução da secreção de IL-8. [61]

O STAT3 parece desempenhar um papel crucial na regulação de processos inflamatórios induzidos pelos TLR na cicatrização de feridas e na tumorigénese. [63] Estudos revelaram que o STAT3, por um mecanismo de *feedback* negativo, atua inibindo a sinalização pró-inflamatória do TLR-9 nas células mieloides. [63] Para além disso, demonstraram também que a ativação do STAT3 promove a atividade angiogénicas das células mieloides, limitando, simultaneamente, a apresentação de antigénios. [63] A constante atividade do STAT3 no microambiente tumoral resulta da estimulação por citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas libertadas pelas células tumorais. [63]

A radioterapia no cancro pode ser imunogénica, no entanto, ainda não se encontram totalmente esclarecidos os motivos pelos quais os seus efeitos imunogénicos raramente são suficientes para evitar a reincidência tumoral. [63] Neste âmbito, um mecanismo dependente do TLR9 foi estudado. [63] Verificou-se que o TLR9, pela via MyD88/NF- κ B, desencadeia a expressão da IL-6, que por sua vez induz nas células mieloides, recentemente recrutadas em resposta à radioterapia, processos de sinalização pró-tumorigénicos. [63] Estes processos são caracterizados pela ativação de um conjunto de genes. [63] Pela comparação da expressão genética global em células mieloides *wild type*, em células mieloides deficientes em TLR9 e em células mieloides deficientes em STAT3, provenientes de tumores sujeitos a irradiação, foi identificado um conjunto único de genes que regulam o TLR9/STAT3 e que estão envolvidos na promoção da inflamação e da revascularização. [63]

3.1.5 NF- κ B

O NF- κ B é um fator de transcrição pleiotrópico que é codificado por uma família de cinco genes principais: RelA (p65), RelB, c-Rel (REL), NF- κ B1 (P100) e NF- κ B2 (P102). [64] Os genes NF- κ B1 (P100) e NF- κ B2 (P102) são processados para produzir

p52 e p50, respetivamente. [64] O domínio comum a todas as correspondentes proteínas é conhecido como domínio de homologia Rel (RHD). [15][64] O RHD permite a homo e heterodimerização destas proteínas bem com a sua migração para o núcleo, a ligação ao DNA e a interação com as proteínas inibidoras do NF- κ B (I κ B). [15][64] A família das proteínas de I κ B é constituída por I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BCL-3, P100 e P105. [15]

Os homo ou heterodímeros do NF- κ B permanecem inativos no citoplasma ligados a proteínas de I κ B, que impedem a translocação do NF- κ B para o núcleo e, portanto, a transcrição dos genes alvo. [64] É através da fosforilação dependente da IKK, poliubiquitinação e subsequente degradação proteossómica de proteínas I κ B que as proteínas NF- κ B são libertadas. [64] A libertação do NF- κ B permite a translocação do dímero para o núcleo, onde pode regular a expressão de genes específicos, tipicamente envolvidos na resposta imunitária e inflamatória e no controlo do crescimento celular. [63] A família IKK consiste em duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , complexadas com a subunidade reguladora IKK γ /NEMO (NF- κ B *essential modulator*). [64]

A regulação e ativação rigorosas do NF- κ B são controladas por duas principais vias de sinalização, moduladas por estímulos específicos, mas divergentes: a via clássica ou canónica e a via alternativa. [64]

Na via clássica, após estimulação por várias moléculas inflamatórias, incluindo certos membros da família do TNF α , IL-1 e ligandos dos TLR, as moléculas de I κ B são fosforiladas pelo complexo IKK, o que leva a sua degradação proteossómica. [15] Esta via tem como principais alvos os dímeros p50: RelA e p50:c-Rel, que sofrem translocação para o núcleo e, posteriormente, ativam a transcrição de vários genes alvo. [15]

A via alternativa é ativada por um subconjunto de membros da superfamília de recetores do TNF, que incluem o recetor do fator ativador de LB (BAFFR), o CD40, o recetor ativador do NF- κ B (RANK) e o recetor da linfotoxina β (LT β R). [17][63] Esta via é caracterizada pela sua independência em relação à IKK β e ao NEMO e pela dependência em relação à IKK α . [64] Esta ativação é mediada pela cinase indutora do NF- κ B (NIK) que sinaliza a IKK α para a fosforilação de NF- κ B2/p100:RelB que se encontra complexado com I κ B. [15][64] Subsequentemente, o complexo sofre ubiquitinação, o que conduz processamento proteossómico do inibidor de RelB, NF- κ B2 p100, resultando na libertação e translocação do heterodímero RelB-p52 para o núcleo e ligação ao DNA. [15][64]

Deve notar-se que uma das primeiras proteínas transcritas em ambos os processos é a I κ B α , que, em seguida, migra para o núcleo e estabelece ligação com o dímero de

forma a terminar a atividade de transcrição. [14][64] A via clássica está associada à prevenção da apoptose, à imunidade inata e à inflamação, em resposta a infecções ou a exposição a citocinas pró-inflamatórias. [15][64] A via alternativa desempenha um papel crucial na organogênese linfóide secundária e na maturação e sobrevivência de LB. [15][64] Assim, ambas são responsáveis pela sobrevivência das células e, em última análise, desempenham um papel na carcinogênese. [64]

Hanahan e Weinberg postularam que cada etapa da tumorigênese inclui autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento, capacidade de evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese assegurada e capacidade de invasão e metástase de tecidos. [65] O NF- κ B pode exercer efeito sobre cada um destes aspectos da tumorigênese através da indução da expressão de proteínas, podendo desta forma ser considerado como base de transição de um estado de inflamação para o crescimento de cancro. [64]

3.1.5.1 NF- κ B na carcinogênese

A ativação de oncogenes, tais como o K-Ras, tem demonstrado acionar a via de sinalização do NF- κ B em células tumorais. [14]

O NF- κ B exerce uma função regulatória sobre vários genes implicados na proliferação celular, tumorigênese e metástase. [15] A ciclina D1 e o c-Myc são dois genes alvo do NF- κ B que têm um papel importante no crescimento e proliferação celular, e a sua expressão é direta ou indiretamente aumentada pela ativação do NF- κ B. [15][64] Numerosos estudos atribuem ao NF- κ B a capacidade de inibição da morte celular programada através da regulação dos genes que codificam proteínas antiapoptóticas, tais como o cIAPs, o Bcl-XL e a survivina. [15] Outro mecanismo pelo qual o NF- κ B pode inibir a apoptose é através da sua capacidade de inibir a ativação prolongada das JNKs e a da acumulação de ROS. [15]

A formação de novos vasos sanguíneos é essencial para a progressão do tumor e é dependente de fatores de crescimento, tais como TNF e VEGF, e de quimiocinas, tais como a MCP-1 e a IL-8, que são regulados positivamente pela via de sinalização do NF- κ B. [15] O gene que codifica a COX-2, uma proteína envolvida na inflamação, está sobre o controlo direto do NF- κ B, encontrando-se intimamente envolvido no processo de carcinogênese. [15][64] A expressão desta proteína encontra-se aumentada em formas mais agressivas de CCR, sendo conhecida por promover a angiogênese. [64]

O papel do NF- κ B como elo de ligação mecânico entre a inflamação e o cancro tem sido intensamente investigado em relação à atividade constitutiva do NF- κ B tanto nas DIIs como no CAC. [64] Tanto as ROS como as citocinas produzidas no decorrer destas patologias promovem a ativação da via do NF- κ B. [64] Estas citocinas ativam o STAT3 em IEC. [64] Este, por sua vez, contribui para promover a inflamação, perpetuando estímulos nocivos e, posteriormente, criando um ciclo de *feedback* positivo. [64] A combinação de agentes que danificam o DNA e de citocinas inflamatórias resulta na ativação constante da via NF- κ B, estabelecendo-se o ambiente necessário para a progressão da carcinogénese. [64]

Encontra-se demonstrada a sobre-expressão do NF- κ B em linhas de células de cancro do cólon e em amostras de tumores humanos, incluindo o CCR esporádico e o CAC, bem como em síndromes genéticas, incluindo a PAF e a síndrome de Lynch. [17] Considerando a sequência inflamação-adenocarcinoma, foram determinados níveis significativamente elevados da expressão do NF- κ B no tecido de adenocarcinoma em comparação com amostras de tecido no início da sequência. [17] Ademais, evidências têm demonstrado que a atividade do NF- κ B aumenta em associação com a progressão histológica do tumor. [17] Estes dados sugerem que a atividade do NF- κ B aumenta do início da inflamação até à proliferação maligna. [17] Desta forma, pode concluir-se que a ativação do NF- κ B no CCR funciona como um indicador de mau prognóstico. [17]

3.1.5.2 IKK na carcinogénese

Num estudo em que se utilizou um modelo de CAC em ratinhos, observou-se que a inibição da ativação do NF- κ B pela utilização de inibidores da IKK suprimiu significativamente a tumorigénese. [59]

De acordo com o tipo de célula em que se encontram, as proteínas IKK β contribuem para a promoção de tumores através de mecanismos diferentes. [66] Resultados de uma investigação, em que se utilizou um modelo AOM/DSS, sugeriram que as IKK β presentes em células epiteliais contribuem para a promoção tumoral através da supressão da apoptose pela via mitocondrial. [66] Nestas células, a IKK β é necessária para a indução do Bcl-XL, que é um dos genes alvo do NF- κ B. [66] A ausência de IKK β nos enterócitos previne a indução do Bcl-XL e conduz a um aumento da apoptose das células expostas ao agente carcinogénico. [66] Os resultados revelaram que, nos ratinhos *knockout* para a IKK β , a redução da incidência de tumores não se deveu a um decréscimo

da resposta inflamatória. [66] Desta forma, nos enterócitos, a IKK β desempenha um papel crítico e direto na promoção tumoral, o qual é distinto do seu papel na expressão de mediadores inflamatórios, uma função exercida principalmente nas células mieloides. [66] Uma redução mais modesta na incidência tumoral, mas ainda assim significativa, foi obtida pela deleção de IKK β em células mieloides. [66] Esta deleção não teve efeito nem na expressão do Bcl-XL, nem na resposta apoptótica das células expostas ao carcinogéneo. [66] Em vez disso, a deleção de IKK β em células mieloides resultou numa acentuada diminuição da proliferação da inflamação induzida dos enterócitos e do tamanho do tumor, efeitos indiretos que não foram observados com a deleção específica dos enterócitos. [66] De forma congruente, verifica-se que a IKK β presente nas células mieloides é essencial para a expressão de fatores pró-inflamatórios, como por exemplo a COX-2 e a MMP-9, os quais se acredita que contribuem para o crescimento tumoral. [66] Também num outro estudo, desenvolvido por Karin *et al*, foi demonstrado que a ativação do NF- κ B nas células epiteliais aumentou o número de tumores desenvolvidos e que, por outro lado, a ativação do NF- κ B nas células mieloides apresentou maior correlação com o tamanho do tumor. [67]

Num outro estudo, em que se utilizaram modelos com a administração de DSS em ratinhos, verificou-se que a inibição da ativação da via do NF- κ B dependente da IKK β exacerba a inflamação aguda, mas atenua a doença inflamatória crónica no trato intestinal. [68] A inflamação ulcerativa aguda é agravada em resultado da diminuição da proteção mediada pelo NF- κ B contra a apoptose de células epiteliais e do atraso na regeneração da mucosa, secundário à diminuição do recrutamento de células inflamatórias que segregam fatores citoprotetores. [68] Em contraste, nos ratinhos deficientes em IL-10, que servem como um modelo de colite crónica, a deleção da IKK β no epitélio intestinal não teve qualquer impacto. [68] Por outro lado, a deficiência de IKK β nas células mieloides atenua a inflamação e prolonga a sobrevivência. [68] Estes resultados destacam a dependência em relação aos tecidos das funções pró-inflamatórias e antiapoptóticas do NF- κ B. [68]

IV. PROCESSOS INFLAMATÓRIOS

A inflamação, um processo fisiológico fundamental, pode apresentar tanto um papel benéfico como prejudicial para o hospedeiro, durante a carcinogénese. [68][69] Sob

condições inflamatórias específicas, as células do sistema imunológico podem aumentar a resposta imunitária antitumoral induzindo a subsequente eliminação de células displásicas e de células cancerosas. [69] No entanto, a ativação inadequada ou excessiva do processo inflamatório pode causar grandes danos, sendo considerada um fator de risco para muitas doenças malignas comuns, incluindo o CCR. [46][68]

A promoção do cancro pela inflamação crónica pode dar-se através de vários mecanismos. [70] A instabilidade genómica e danos no DNA, mediados em parte pelas ROS libertadas durante a inflamação crónica, podem provocar mutações genéticas e epigenéticas que iniciam o processo de transformação celular. [70][15] Para além disso, a inflamação pode promover esta progressão tumoral pela indução da remodelação de tecidos, pelo suporte da angiogénese e pelo fornecimento de fatores de crescimento. [70]

Pelo facto de a maioria das células imunitárias intratumorais serem recrutadas após a formação do tumor, admite-se que é improvável que a inflamação inicie o CCR esporádico. [71] Assim, neste caso, a inflamação crónica não precede mas sucede o desenvolvimento do tumor. [71] No entanto, após o estabelecimento do tumor, o microambiente inflamatório localizado pode promover a acumulação de mutações e de modificações epigenética. [71]

O local de inflamação é caracterizado pela atividade contínua de diversas citocinas, quimiocinas e enzimas, pela produção de ROS e de RNS e pela ativação de vias de sinalização específicas e de fatores de crescimento. [69] Estes processos podem ser despoletados tanto pelas células tumorais como pelas células imunológicas recrutadas para o ambiente tumoral inflamatório. [14]

Estes mecanismos interrelacionam-se funcionalmente de forma a alterarem vias importantes envolvidas na função celular normal e, portanto, aceleram o desenvolvimento do cancro associado a inflamação. [69]

4.1 Ácidos gordos polinsaturados

O teor quantitativo e qualitativo dos ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) essenciais incluídos na dieta tem elevada importância, interferindo com mecanismos fisiológicos. [69] Uma vez que os PUFAs não podem ser sintetizados por mamíferos, a sua disponibilidade depende da sua inclusão na dieta. [69]

Estes ácidos, normalmente, são classificados em dois tipos principais: n-3 (ω -3) e n-6 (ω -6). [69] O ácido linoleico, n-6, encontrado em muitos óleos vegetais, é o precursor de vários outros tipos de ácidos, principalmente do AA. [69] O ácido α -linolénico, n-3, é um precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docosahexaenoico (DHA), que podem ser encontrados em óleos de peixe ou de algas. [69] Quantidades excessivas de ingestão de PUFA n-6 e um rácio elevado n-6/n-3, encontrados em dietas ocidentais, podem promover a patogénese de muitas doenças, tais como as doenças cardiovasculares, a obesidade, a diabetes, as doenças autoimunes, a inflamação e o cancro. [69]

A ingestão de PUFA conduz à sua distribuição a praticamente todas as células do organismo humano e influencia o perfil lipídico e a composição em ácidos gordos das membranas celulares que envolvem o plasma, o núcleo e as mitocôndrias. [69] Isto, por conseguinte, afeta a estrutura e a fluidez dessas membranas, as funções das proteínas ligadas às membranas e a sinalização mediada pelos lípidos. [69]

Normalmente, o AA encontra-se esterificado no esqueleto de glicerol da membrana fosfolipídica, sendo que nesta forma não pode ser metabolizado a prostaglandinas. [72] Após a hidrólise pela fosfolipase A2, o AA torna-se um substrato para a oxidação enzimática conduzida por diferentes sistemas enzimáticos, incluindo as COXs, as lipo-oxigenases (LOX) e o citocromo P450. [72]

Em indivíduos com DIIs ou com CCR foram detetadas atividades alteradas das enzimas que metabolizam o AA endógeno, nomeadamente da COX-2 e da 5-LOX. [9][69] Tanto o EPA como o DHA competem com o AA para estas enzimas e, desta forma, são capazes de inibir a formação de eicosanóides pró-inflamatórios e imunossuppressores derivados do AA. [69] Para além disso, verifica-se que o EPA e o DHA conduzem à formação de vários mediadores anti-inflamatórios, tais como as resolvinas, as lipoxinas e as protectinas. [69][73]

Estes mediadores fornecem sinais que param a infiltração por neutrófilos e eosinófilos, que estimulam o recrutamento não flogístico de monócitos (isto é, sem elaborar mediadores pró-inflamatórios), que promovem a absorção e eliminação de células apoptóticas e de microrganismos pelos macrófagos, que promovem a saída dos fagócitos do local de inflamação através dos vasos linfáticos e que estimulam a expressão de moléculas envolvidas na defesa antimicrobiana. [9] Assim, este processo conduz à restauração da homeostase do tecido inflamado. [73]

4.2 Lipo-oxigenase

Entre as vias de sinalização da LOX, as vias da 5-LOX e da 12-LOX destacam-se por estarem intimamente relacionadas com a promoção da inflamação e da carcinogénese; por outro lado, os metabolitos resultantes da via 15-LOX têm demonstrado exercer um efeito oposto. [74]

A 15-LOX destaca-se quanto à sua importância na resolução da inflamação e na diferenciação terminal de células normais. [9] Esta enzima é preferencialmente expressa em tecidos normais e em lesões benignas. [9] Em contraste, a 5-LOX e a 12-LOX geralmente estão ausentes no epitélio normal, podendo ser induzidas por estímulos pró-inflamatórios, e são constitutivamente expressas em vários cancros epiteliais, incluindo os do cólon. [9]

Uma série de evidências sugerem o envolvimento da 5-LOX em estádios iniciais do CRC. [74] A 5-LOX é altamente expressa em neutrófilos e monócitos e é estimulada pela ação da IL-4 e da IL-13. [9] O AA libertado da membrana é convertido pela 5-LOX em leucotrienos, nomeadamente o leucotrieno B₄ (LTB₄) e o leucotrieno C₄ (LTC₄). [9][74] São conhecidos dois tipos de recetores do LTB₄, o recetor 1 (BLT1) e recetor 2 (BLT2), sendo que o BLT1 está essencialmente envolvido em respostas inflamatórias. [9] A alta expressão da 5-LOX e dos seus recetores foi observada em indivíduos com CCR estando associada a um mau prognóstico. [74] Evidências reportam para a superprodução de LTB₄ em tecidos de CCR bem como para a proliferação das células cancerosas mediada pelo LTB₄. [9] Foi demonstrada uma forte expressão do BLT1 em regiões de tecidos carcinomatosos de cólon humano, mas não nas regiões normais. [9] Para além disso, o LTB₄ tem sido implicado na patogénese das DIIs. [9]

As vias da COX e da LOX estão intimamente inter-relacionadas, o que se reflete no facto de a perturbação de uma via poder conduzir à sobre-expressão da outra via. [74] Vários estudos revelaram que a deleção da 5-LOX e da sua proteína de ativação (FLAP) resultam no aumento da expressão de metabolitos resultantes da atividade da COX. [74] Desta forma, um equilíbrio na atividade destas duas vias deve ser considerado para uma abordagem preventiva do CRC. [74]

4.3 Ciclo-oxigenase

Essencialmente são reconhecidas duas isoformas da COX, às quais são atribuídas diferentes atividades biológicas. [72] A COX-1, expressa constitutivamente, é responsável pela manutenção da homeostase da mucosa gastrointestinal e por processos relacionados com a contração do músculo liso. [72] A COX-2, por outro lado, corresponde à isoforma indutível, e medeia a síntese de prostaglandinas relacionadas com funções pró-inflamatórias. [74][21] Em tumores com localização intestinal, a COX-2 encontra-se sobre-expressa em células epiteliais e em células do estroma e é geralmente induzida pela IL-1 β , pelo TNF α e pelo IFN- γ . [21][74][75]

Resultados de diferentes investigações confirmaram a interveniência da COX-2 no processo de carcinogênese. [74] Num modelo de indução da formação de tumores pela exposição a AOM, verificou-se uma sobre-expressão da COX-2; por outro lado, a deficiência em COX-2 diminuiu significativamente a tumorigênese num modelo de CCR. [74]

No CCR, os efeitos pró-inflamatórios e pró-tumorigênicos da COX-2 são mediados pelo seu principal produto final, a PGE2. [74] A PGE2 pode atuar por vários mecanismos, nomeadamente pela inibição da apoptose através do aumento da expressão de Bcl-2 pela via de sinalização da MAPK ou da fosfatidilinositol 3-cinase-Akt; pela ativação da via de sinalização dependente da catenina, a qual promove a sobrevivência e proliferação das células tumorais; pela indução da produção de VEGF e do FGF básico, que estimulam a angiogênese; pelo aumento da metastização do tumor através da alteração das propriedades adesivas das células e do aumento da atividade das MMPs; pela diminuição da vigilância imunológica conseguida pela redução da produção de citocinas e pela redução da atividade das células NK; [76] pela redução da expressão de IL-12, antitumorigénica, e do aumento da expressão da IL-23, pró-tumorigénica, em células mieloides; e pela ativação da via de sinalização Wnt. [9][71][74][76] Para além disso, a COX-2 pode provocar a oxidação do DNA induzindo o aparecimento de mutações. [76]

4.4 ROS e RNS

As células fagocíticas inflamatórias produzem uma variedade de espécies reativas de oxigénio e de espécies reativas de azoto. [23]

Após uma sequência de alterações metabólicas, a partir da espécie inicial anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são produzidas outras espécies, tais como o hidróxido (OH), o anião hipoclorito (ClO^-) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). [23] Normalmente, estas espécies conduzem a mutações genéticas e a danos no DNA, contribuindo, desta forma, para o processo carcinogénico. [16][23] Num modelo de indução de CAC em ratos pela exposição a AOM/DSS, os ratos com danos no DNA devidos a inflamação e que eram deficientes em enzimas de reparação de excisão de bases apresentaram um aumento na multiplicidade tumoral; estes resultados indicaram que a inflamação pode induzir danos no DNA que, por sua vez, contribuem para a carcinogénese do cólon. [16] Genotoxicidade direta foi documentada em modelos de inflamação intestinal em ratos, que foi correlacionada com o grau de inflamação sistémica e local e foi associada a evidências de *stress* oxidativo, mediado por ROS, e a danos no DNA. [16]

As NADPH-oxidases (NOX) consistem numa família de sete enzimas, as NOX1-5 e as DUOX1-2. [77][78] Em resposta a mediadores inflamatórios, tais como citocinas e fatores de crescimento, as NOX são uma das principais fontes de geração de ROS. [46] Estas enzimas encontram-se expressas em células de cancro e sabe-se que as ROS derivadas da sua expressão facilitam o processo metastático destas células. [77] No cancro do colón, a ativação da NOX1 tem demonstrado funcionar como um mediador importante na formação de *invadopodia*, que pode facilitar a invasão pelas células cancerosas. [77] Constatou-se também que a NOX1 é necessária para a expressão do VEGF mediada pela Ras, uma proteína transdutora de sinal, estando por isso associada ao processo de angiogénese no cancro do cólon. [77] Para além disso, verifica-se que nas células cancerígenas do colón, a produção de ROS pelas NOX é dependente da atividade do NF- κ B. [77] Evidências recentes sugerem que os efeitos de sinalização da produção de ROS pelas NOX são dependentes do contexto, uma vez que para além de conferirem efeitos pró-inflamatórios, podem também desempenhar funções nos mecanismos anti-inflamatórios. [77]

O monóxido de azoto (NO) é produzido por três isoformas da sintase do monóxido de azoto (NOS), nomeadamente a sintase neuronal do monóxido de azoto (nNOS), a sintase endotelial do monóxido de azoto (eNOS) e a sintase indutível do monóxido de azoto (iNOS). [74] A nNOS e a eNOS são isoformas constitutivas da NOS, enquanto que a iNOS é induzida após exposição a um estímulo inflamatório. [74] A iNOS é expressa em várias células, tais como macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e células

parenquimatosas, incluindo o epitélio intestinal. [74] A sua produção é estimulada por LPS, pelo TNF α e pela IL-1 β . [74]

A descoberta do NO como um produto de células do sistema imunitário apontou a sua interveniência no mecanismo da carcinogénese. [74] No entanto, o seu papel é menos claro, verificando-se que tanto a expressão aumentada como a expressão diminuída de NO podem refletir-se em efeitos benéficos no CCR. [74][16]

Ratinhos com um défice de iNOS (ratinhos iNOS^{-/-}), quando cruzados com ratinhos IL-10^{-/-}, apresentaram um maior número de pólipos em comparação com ratinhos com genótipo IL-10^{-/-}, sugerindo que o NO pode desempenhar uma função de proteção. [16] Um papel inibitório da iNOS no crescimento tumoral foi também sugerido pela elevada expressão desta enzima em xenoinxertos de CCR. [74] Por outro lado, estudos com ratinhos *knockout* para a iNOS sugeriram um papel positivo desta enzima na indução da formação de pólipos na PAF. [74]

De uma forma geral, considera-se que o aumento da produção de NO por um período de tempo limitado apresenta resultados positivos na inibição do CCR, enquanto que a produção contínua e crónica de NO está associada à indução da transformação neoplásica. [74]

O NO pode reagir com o O₂⁻ originando a formação de uma espécie altamente reativa, o peroxinitrito. [74] O peroxinitrito reage com todas as classes de biomoléculas e, assim, pensa-se estar envolvido em muitos fenómenos patológicos. [74] De facto, concentrações elevadas de NO e de peroxinitrito foram observadas em amostras cancerosas. [74]

Por último, verifica-se também que o aumento da produção ROS e de RNS podem resultar na ativação de oncogenes ou na inativação de genes supressores de tumores pela indução de mutações em genes reguladores críticos. [16]

V. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

5.1 Imunoterapia

Um grande número das abordagens terapêuticas imunológicas direcionadas ao cancro tem como base a ativação das respostas imunes inata e adaptativa. [25] Neste

âmbito, surge uma nova área de desenvolvimento relacionada com as evidências da intervenção dos TLRs no processo do crescimento e proliferação tumoral. [25][55]

O processo de desenvolvimento de compostos direcionados aos TLRs no cancro não é simples e alguns dos resultados revelaram-se decepcionantes. [91] Atualmente, várias moléculas encontram-se em diferentes fases de desenvolvimento de ensaios clínicos. [79] Um dos primeiros tratamentos bem-sucedidos para o cancro resultou da observação de que doentes com sarcoma inoperável com infeções concomitantes por estreptococos exibiam efeitos antitumorais sistémicos. [79] O mecanismo para este efeito terapêutico foi atribuído à ativação de TLRs por endotoxinas e fragmentos de DNA não metilado das bactérias. [79] Atualmente, existem duas classes de agonistas de TLRs autorizados para utilização clínica como monoterapia ou como adjuvantes de vacinas no cancro: *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) e imidazoquinolinas. [79] A BCG é uma preparação viva atenuada das bactérias envolvidas na tuberculose e foi originalmente desenvolvida como uma vacina para essa doença. [79] No entanto, também se verificou que exibia atividade anticancerígena através da ativação dos TLRs 2, 4 e 9. [79] O seu uso encontra-se autorizado no tratamento de algumas formas de cancro da bexiga e tem também sido avaliada como uma vacina adjuvante no tratamento de outros tipos de cancro. [79] O imiquimod, uma imidazoquinolina sintética, tem como alvo o TLR7 e é administrado na forma de um creme para o tratamento de verrugas genitais e de doenças malignas primárias da pele ou condições pré-malignas. [79]

Verifica-se que várias moléculas, tais como compostos bacterianos, agentes virais e pequenos compostos sintéticos, têm sido utilizadas como adjuvantes no tratamento do cancro devido à sua capacidade em favorecer a imunoterapia pela estimulação das vias de sinalização dos TLRs e pela conseqüente ativação da resposta inata e adaptativa. [55][79] No entanto, os resultados de investigações acerca da utilização de agonistas dos TLRs como adjuvantes em tratamentos de cancro não são congruentes e exigem uma análise mais aprofundada. [55]

5.1.1 Agonistas do TLR2

Várias evidências apontam para que o TLR2 seja detentor de um papel particularmente importante na manutenção da homeostase intestinal. [56]

Num modelo de colite induzida por DSS, a administração de agonistas do TLR2 demonstrou efeitos benéficos na redução da severidade da colite pelo melhoramento na integridade das *tight junctions*. [56]

A atividade supressora dos linfócitos Treg tem vindo a ser estabelecida como um fator limitante da destruição das células tumorais pela resposta imunitária. [80] A ação de agonistas dos TLRs em linfócitos Treg, bem como o perfil de expressão de TLRs por estas células permanecem controversos. [53] Quanto aos efeitos da ativação dos TLRs2 sobre os linfócitos Treg, os resultados parecem depender dos estudos. [56]

Da combinação de resultados obtidos numa investigação em que se utilizaram ratinhos, verificou-se que a utilização de agonistas dos TLRs2 quando combinada com a estimulação dos TCR, resultou num aumento da proliferação dos linfócitos Treg *in vitro* e *in vivo* e numa perda transitória da função supressora dos linfócitos Treg *in vitro*, recuperada após a retirada do agonista. [81]

Foi sugerido que os linfócitos Treg poderiam ser diretamente afetados por agonistas dos TLR. [53] No entanto, os resultados obtidos por Olivier *et al*, relativos a modelos em que se utilizaram ratinhos, sugerem que a ativação dos linfócitos Treg *in vivo*, subsequente à injeção de TLRs, é provavelmente uma consequência de *cross-talk* entre os linfócitos Treg e outras células do microambiente e não o resultado de um impacto direto de agonistas dos TLRs. [53] Os mesmos investigadores observaram que a modulação negativa de linfócitos efetores T CD4+ exercida pelos linfócitos Treg não pode ser contornada, qualquer que seja o agonista TLR utilizado como adjuvante. [53] Concluíram que os agonistas dos TLR só por si não são capazes de ativar diretamente os linfócitos Treg. [53]

Vários estudos mostraram que, em ratos, os linfócitos Treg expressam TLR2 e afirmam que agonistas sintéticos destes recetores inverteram a função supressora destas células. [52] Por outro lado, verificaram que em humanos, após a ativação dos TLRs2 nos linfócitos Treg, a sua função supressora foi aumentada. [52]

Chen *et al* demonstraram que o aumento da expressão dos TLR2 em linfócitos Treg é dependente da estimulação dos TCR e esta expressão pode ainda ser aumentada pela ligação aos TLR2. [52] Assim, a expressão do TLR2 foi reportada ser positivamente regulada nos linfócitos Treg por um mecanismo de *feedback* positivo, subsequente à estimulação com agonista TLR2. [52]

Por outro lado, a outros agonistas dos TLRs2 foi associada uma diminuição da resposta adaptativa pela estimulação da atividade dos linfócitos Treg; para além disso, em ratinhos com genótipo TLR2^{-/-}, agonistas dos TLR2 foram associados a uma baixa expressão de linfócitos Treg. [52][56]

Evidências de alguns estudos associam uma expressão elevada de TLR2 ao CCR, por isso, para alguns autores a utilização de agonistas para o seu tratamento não é indicada. [55]

Sob diferentes condições experimentais, os sinais despoletados pelos TLRs2 podem agravar ou atenuar a inflamação intestinal. [56] Desta forma, estas observações devem ser consideradas de forma a serem possíveis novas abordagens profiláticas e de tratamento para o cancro. [54]

Embora os agonistas dos TLR tenham numerosas aplicações como adjuvantes na vacinação profilática contra doenças infecciosas e na imunoterapia do cancro, o forte ambiente imunossupressivo dos doentes com cancro ou com infeções crónicas pode limitar o desenvolvimento de tais imunoterapias. [53] Conformemente, a depleção de linfócitos Treg em ratinhos aumenta a imunidade específica tumoral e melhora a sobrevivência após a indução do tumor. [53] Assim, a modulação dos linfócitos Treg pode representar uma estratégia atrativa para reforçar a eficácia da vacinação contra agentes patogénicos ou contra células cancerosas. [53]

5.1.2 Agonistas do TLR4

Os agonistas dos TLR4 podem ter aplicações imunorreguladoras como adjuvantes em vacinas e no tratamento de infeções virais crónicas e na terapia do cancro. [45] Existem vários ensaios clínicos com ligandos dos TLRs4 entre os quais se encontram os direcionados à terapêutica do CCR. [45]

Os LPS foram o primeiro produto microbiano identificado como um potencial agonista dos TLRs4 e o primeiro a ser implementado em aplicações terapêuticas. [46] Os LPS apresentam elevada toxicidade uma vez que induzem a produção excessiva de citocinas inflamatórias. [45] No entanto, foi provada a segurança da administração de doses reduzidas de LPS combinadas com ibuprofeno, evidenciando-se níveis mais elevados de TNF- α e de IL-1 em todos os indivíduos. [45] Resultados positivos foram

também observados quando se combinaram LPS de *Salmonella abortus equi* com ibuprofeno em indivíduos com CCR. [45]

No entanto é necessário ter em atenção que nem todos os agonistas podem ser aplicados no mesmo tipo de cancro. [45] Um dos agonistas do TLR4 aumenta o comportamento inflamatório de células imunitárias, que demonstram utilidade numa variedade de cancros em que se pretende ultrapassar a supressão imunológica induzida pelo cancro. [46] No entanto, isto pode não ser útil no caso do CRC, onde se pretende que o TLR induza a sobre-ativação do sistema imunitário. [45]

Diversos aspetos da tumorigénese mediada pelo TLR4 necessitam de ser esclarecidos antes de estabelecerem estratégias clínicas eficazes para prevenção do CAC. [59] Para além da contribuição direta da sinalização do TLR4 epitelial para o desenvolvimento neoplásico, a contribuição da sinalização do TLR4 para a imunidade antitumoral precisa também de ser avaliada, a fim de se estabelecer o tratamento para o CAC. [59]

O tratamento direcionado à colite ulcerosa, uma estratégia de combinação de compostos de aminossalicilatos, esteroides e agentes biológicos, tem revelado induzir a sua remissão. [59] No entanto, não apresenta eficácia quanto à diminuição do risco de desenvolvimento de CCR. [59]

Estudos apontam para que o bloqueamento de algumas das etapas da ativação do TLR4 mediada pelos eixos COX-2-PGE2 e AR-EGFR possa ser vantajoso. [59] No entanto, potenciais efeitos adversos devem ser tidos em conta uma vez que estas vias são indispensáveis para o processo de reparação após uma lesão da mucosa. [59] A utilização de antagonistas do TLR4 poderia reduzir a incidência do CAC em doentes com UC; contudo, no caso de a colite se encontrar numa fase ativa, o processo de cura iria ser atrasado. [59] Apenas uma profunda compreensão dos mecanismos exatos que regulam a integridade da mucosa durante a colite poderá garantir o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento do cancro. [59]

5.1.3 Agonistas do TLR9

Pelo seu efeito na indução de mecanismos que, por sua vez, induzem a resposta do hospedeiro contra o cancro, foi considerada a utilização de agonistas sintéticos para ativação do TLR-9. [60] Assim, muitos agonistas do TLR-9, principalmente sob a forma

de oligonucleotídeos (ODNs) CpG, moléculas que mimizam as CpGs naturais, têm sido desenvolvidos e explorados para o tratamento de tumores. [60]

Os ODNs-CpG de primeira geração podem ser subdivididos em três classes distintas com diferentes características estruturais e com capacidades diferentes quanto à indução de respostas imunes. [25] Os agonistas da classe A são fortes indutores da secreção de IFN α pelas pDCs, mas fracos estimuladores dos LB. [25] Os agonistas da classe B induzem uma forte ativação dos LB e das células NK e a secreção de várias citocinas, mas apresentam uma fraca estimulação da produção de IFN α pelas pDCs. [25][60] Os agonistas da classe C são capazes de induzir uma forte ativação dos LB, bem como uma elevada secreção de IFN α pelas pDCs. [60]

Para além destes compostos, foram também desenvolvidos ODNs-CpG de segunda geração. [60] Entre estes agonistas dos TLRs9, os oligonucleotídeos imunomoduladores (IMOs) destacam-se devido ao seu potencial em induzir respostas imunes antitumorais. [60] De facto, são capazes de ativar diretamente as células efetoras, tais como as células NK, e indiretamente, através dos linfócitos T_{H1}, os linfócitos T_C. [60] Para além disso, os IMOs aumentam a produção de citocinas antitumorais e melhoram a ADCC através da ativação de populações de células efetoras. [60]

A contribuição da sinalização desencadeada pelo TLR9 para a imunidade antitumoral encontra-se bem estabelecida. [60] O microambiente tumoral é caracterizado pela presença de vários tipos de células imunossupressoras, entre as quais se destacam as células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs). [60] Níveis elevados de MDSCs acumulam-se no tumor e nas suas proximidades, inibindo a atividade de LT e de células NK. [60] Estudos recentes indicam que a administração direta nos tecidos tumorais de ODNs-CpG pode reduzir a atividade imunossupressora das MDSCs monocíticas, pela diminuição da sua capacidade em suprimir a função dos LT e pela indução da sua diferenciação em macrófagos com capacidade tumoricida. [60]

Por outro lado, há um crescente conjunto de dados que demonstram que a atividade agonista antitumoral do TLR9 não está apenas relacionada com a modulação da resposta imune. [60] Nos últimos anos, demonstrou-se que a sua atividade antitumoral é também atribuível aos seus efeitos diretos sobre o comportamento de células de cancro. [60] Num estudo verificou-se que o TLR9 interage fisicamente com o EGFR e que o tratamento com IMOs foi capaz de interromper esta interação, interferindo assim com a sinalização do EGFR e, subsequentemente, com o VEGF. [60] Uma combinação de inibidores do EGFR com IMOs resultou numa inibição sinérgica da fosforilação da Akt

e da MAPK, afetando assim as vias de sobrevivência e de proliferação em modelos de cancro do cólon e de cancro pancreático. [60] Verificou-se também que atividade antitumoral dos anticorpos monoclonais cetuximab e trastuzumab foi potenciada pela capacidade do IMO em impulsionar a ADCC. [60]

Uma vez que os linfócitos Treg podem ser um obstáculo importante para a imunoterapia antitumoral, tem surgido um grande interesse nos possíveis efeitos da ativação de TLRs sobre a função dos linfócitos Treg. [82] As interações *in vivo* entre a ativação do TLR9 e os linfócitos Treg são extremamente complexas. [82] Para além disso, são necessários mais estudos sobre os efeitos que as diferentes vias de administração de ligandos dos TLRs9 têm sobre os linfócitos Treg em humanos. [82] Em conjunto com as evidências que sugerem que os linfócitos Treg contribuem para a supressão imune observada em indivíduos com cancro, é também sugerido que a eficácia da terapia do cancro com ODNs-CpG pode ser aumentada pela depleção ou inativação prévia de linfócitos Treg. [82]

Os estudos realizados demonstram que é promissora a aplicação clínica da ativação dos TLRs9 com ODNs-CpG para melhorar os resultados clínicos de vacinação contra o cancro, da quimioterapia convencional, e de outras modalidades terapêuticas. [82] A segurança desta abordagem tem sido muito bom: a dose máxima humana tolerada ainda não foi identificada, não foi reportado um aumento clinicamente significativo na toxicidade relacionada com a quimioterapia pela adição de ativação TLR9, e não houve relatos definitivos a data de indução da doença auto-imune sistémica de tratamento de vários milhares de seres humanos com agonistas de TLR9. [82]

No entanto, os tumores dispõem de vários mecanismos de supressão ou evasão da imunidade antitumoral induzida pelas vacinas e ainda não se encontra esclarecido até que ponto a ativação dos TLRs9 será capaz de superar essas defesas. [82] Muito provavelmente, será necessária a combinação de terapias sinérgicas de forma a ser alcançado o potencial clínico completo desta abordagem. [82]

5.2 Fármacos anti-inflamatórios

Em resultado das evidências que apontam a inflamação como um contribuinte significativo para o desenvolvimento do CCR, os fármacos anti-inflamatórios, tanto de

origem natural como sintética, têm vindo a adquirir importância tanto no âmbito da prevenção como no âmbito do tratamento desta patologia. [74]

De facto, um número substancial de resultados provenientes de estudos epidemiológicos, estudos de intervenção e estudos em modelos animais indica que a utilização de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) pode resultar a inibição do desenvolvimento do CRC. [74][83] Os inibidores da iNOS têm também adquirido importância como fármacos anti-inflamatórios no CRC e noutros tipos de cancro. [74]

O desenvolvimento do CRC está associado a um reduzido consumo de frutas e de legumes e a um elevado consumo de alimentos ricos em gordura. [74] Evidências epidemiológicas apontam que alterações nos padrões alimentares e nos padrões de atividade física induzem benefícios na prevenção de CRC. [74]

5.2.1 Fármacos anti-inflamatórios sintéticos

5.2.1.1 Anti-inflamatórios não esteroides

Todos os AINEs, incluindo os tradicionais fármacos não-seletivos e a subclasse dos inibidores seletivos da COX-2, apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. [84] Os AINEs são um grupo quimicamente heterogéneo de ácidos orgânicos que compartilham determinadas ações terapêuticas e efeitos adversos. [84]

Os mecanismos pelos quais os AINEs exercem o seu efeito quimiopreventivo não se encontram totalmente esclarecidos; no entanto, é postulado que atuam tanto em vias dependentes da COX como em vias independentes da COX. [85] Nos mecanismos dependentes da COX, a inibição da COX produz uma diminuição dos níveis de prostaglandinas e dos seus derivados (prostaciclina e tromboxano), levando a uma diminuição dos processos envolvidos na proliferação celular. [85] Para além disso, estes mecanismos também conduzem a um aumento no nível de AA, o qual promove a apoptose. [85] Por outro lado, evidências da existência de mecanismos independentes da COX surgem, por exemplo, de estudos que demonstraram que os AINEs induzem a apoptose em tecidos que não expressam esta enzima. [85] Estes mecanismos encontram-se ainda sob estudo admitindo-se que podem envolver diferentes vias tais como a do NF- κ B, a via do recetor ativado por proliferadores do peroxissoma γ (PPAR), a via da transdução de sinal Delta1/Notch1 e a via que envolve a regulação positiva do gene NAG-1, um membro da superfamília do TGF- β . [83][85]

Não obstante, a ação anticancerígena da maioria destes fármacos baseia-se na inibição seletiva da atividade da COX-2, que, como referido anteriormente, está associada ao desenvolvimento e progressão do CCR. [83] Algumas evidências indicam que a utilização regular dos AINEs diminui em cerca de 40% a 50% o risco de desenvolvimento de CRC em doentes com DIIs. [21] Para além disso, o facto de se verificar que a utilização de AINEs resulta na redução da mortalidade relacionada com o CCR esporádico e na regressão de adenomas na FAP, contribui para a teoria de que os cancros do colón que não resultam de uma complicação de DIIs são também despoletados por um processo inflamatório. [14][69]

Utilizando modelos animais de CCR pela administração de AOM, vários investigadores demonstraram que diversos inibidores da COX, tais como a indometacina, o piroxicam, o ácido acetilsalicílico (AAS), o ibuprofeno, o sulindac e o celecoxib suprimem a carcinogénese. [74] No entanto, é de destacar que o efeito protetor dos AINEs na progressão do CCR parece ser também influenciado por características moleculares específicas de cada indivíduo. [17]

5.2.1.1.1 Ácido acetilsalicílico

Vários estudos confirmam que a utilização regular de AAS, durante um período de dez a quinze anos, reduz, em cerca de 40% a 50%, o risco relativo de desenvolvimento de cancro do cólon. [14][64] Novas evidências indicam que o AAS melhora a sobrevivência de doentes com CCR em fase I, II e III, o que permite estabelecer os AINEs como agentes terapêuticos e não apenas como agentes preventivos. [14]

O AAS difere dos outros AINEs devido à sua capacidade em acetilar de forma irreversível a COX-2 e direcionar a atividade desta enzima para a produção de ácido 15R hidroieicosatetraenoico (15R-HETE), um substrato para a 5-LOX. [86] Este processo resulta na síntese de 15-epi-lipoxina A₄ (15-epiLXA₄), também conhecida como lipoxina desencadeada pelo AAS (ATL). [86] A 15-epiLXA₄ apresenta funções semelhantes às lipoxinas produzidas naturalmente pela 5-LOX. [74]

Pelo facto de o AAS ser um dos AINEs mais comumente consumidos, representando um dos fármacos mais utilizados no mundo, muitos dos potenciais participantes nos ensaios podem já estar sob um plano terapêutico que inclui o AAS, como é o caso da prevenção de eventos cardiovasculares. [72][87] É em consequência de dados

controversos quanto à relação entre a eficácia, dose e duração da exposição ao AAS que se torna bastante difícil a o estabelecimento de determinada terapêutica. [72]

O celecoxib e rofecoxib possuem capacidade de inibição da atividade da COX-2 acetilada e da síntese da molécula anti-inflamatória 15-epiLXA₄; por conseguinte, quando combinados com o AAS, o risco de ocorrência de danos na mucosa gástrica é significativamente aumentado. [86] Estas interações não foram observadas após a administração do celecoxib e do rofecoxib com um novo derivado de ácido acetilsalicílico, o NCX 4016. [86]

5.2.1.1.2 Indometacina

Uma vez que a indometacina apresenta toxicidade gastrointestinal, num modelo de carcinoma induzido por AOM, foi desenvolvido e testado um derivado potencialmente menos tóxico, a NO-indometacina. [74] Em oposição aos AINEs convencionais, os AINEs que libertam o monóxido de azoto (NO-AINEs) parecem estar isentos de efeitos adversos apreciáveis, retendo os benefícios originais. [74] Verificou-se que a NO-indometacina suprimiu significativamente a multiplicidade e incidência de tumores induzidos pelo AOM, sendo que esta capacidade foi relacionada com a supressão da COX, da iNOS e dos níveis de β -catenina. [74] Desta forma, os NO-AINEs parecem ser agentes promissores na quimioprevenção. [74]

5.2.1.1.3 Sulindac

A maioria dos ensaios clínicos relativos a um tratamento de longa duração com sulindac em doentes com PAF revelou uma redução no número e no tamanho dos adenomas. [74] Num estudo em que se utilizou um modelo animal, verificou-se que o sulindac desempenhou uma função inibitória da formação de cancro do cólon, tanto na fase de iniciação como na fase pós-iniciação. [74] Estes dados sugeriram que esta inibição se deveu a efeitos moduladores sobre o metabolismo do AA. [74]

5.2.1.1.4 Celecoxib

A inibição seletiva da COX-2 pelos coxibes tornou-os alvo de investigação para aplicação na terapêutica preventiva por minimizarem os efeitos secundários, tais como a

toxicidade gastrointestinal, observada pela inibição da COX-1. [85] Vários estudos em que se utilizaram modelos de FAP ou modelos de cancro do cólon em ratos *knockout* para a COX-2, indicaram que os inibidores seletivos da COX-2 impediram a formação de adenomas intestinais. [74]

Embora a introdução dos coxibes tenha revelado sucesso quanto à redução da toxicidade gastrointestinal, devido à sua alta seletividade para a COX-2, foram associados efeitos negativos no sistema cardiovascular, tais como o aumento do risco de ataque cardíaco e o aumento do risco de acidentes vasculares cerebrais. [74][14]

Pelo facto de estar menos associado a efeitos cardiovasculares adversos, o celecoxib foi apontado como o mais adequado a ser objeto de estudo para a prevenção e tratamento do cancro. [74] Em adição, surgem também evidências de que a utilização de pró-farmacos do celecoxib com ativação específica no cólon pode ser uma estratégia para reduzir os efeitos tóxicos e melhorar as propriedades farmacológicas. [87]

5.2.1.2 Inibidores da iNOS

Uma vez que se considera que a produção contínua e crónica de NO está associada à indução do CCR, foi proposto o estudo da utilização de agentes inibidores da iNOS como agentes anti-tumorigénicos. [74] De facto, vários estudos em modelos animais revelaram que os inibidores da iNOS desempenharam um papel na inibição do CCR. [74] Para além de terem sido avaliados individualmente, verificou-se que a combinação de inibidores da iNOS com inibidores seletivos da COX-2 permitiu uma redução das doses a utilizar para obtenção dos efeitos protetores. [74]

No entanto, investigações mais detalhadas são necessárias tanto para uma melhor compreensão do papel do NO durante a inflamação, como também para o subsequente desenvolvimento de inibidores da iNOS para a prevenção e tratamento do CCR. [74]

5.2.2 Fármacos anti-inflamatórios naturais

5.2.2.1 Curcumina

A curcumina é um dos curcuminoides extraídos do açafrão. [74] Admite-se que esta molécula atua pela regulação negativa da COX-2, da 5-LOX, da iNOS e da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , a IL-1, a IL-2, a IL-6, a IL-8 e a IL-12, pela inativação da via do NF- κ B. [74][83] É também atribuída a esta molécula a

capacidade de modificar a atividade dos LT e dos LB. [83] Embora em modelos animais sejam bastante evidentes as propriedades anti-inflamatórias e antitumorígenicas da curcumina, os resultados dos ensaios clínicos de avaliação da farmacocinética, do metabolismo e da biodisponibilidade sistêmica em indivíduos com cancro são inconclusivos. [74] Desta forma, estudos em desenvolvimento pretendem sintetizar compostos análogos à curcumina que apresentem maior eficiência e menor toxicidade de forma a possibilitar a aplicação no tratamento e prevenção do CCR. [83]

5.2.2.2 Resveratrol

O resveratrol, um composto fenólico presente nas uvas e nas suas sementes, tem sido também associado a um papel quimiopreventivo no cancro. [83] Vários estudos apontam para uma função de inibição de mecanismos celulares, tais como a produção de PGE2, associados à iniciação, promoção e progressão do desenvolvimento do cancro. [74] No entanto, apesar das evidências apontarem que o resveratrol tem propriedades potencialmente preventivas e terapêuticas, uma avaliação mais aprofundada sobre tanto a dose como a eficácia clínica no CCR é necessária. [74]

5.2.2.3 Diosgenina

A diosgenina, uma saponina esteroide natural, apresenta diversas propriedades biológicas. [74] Diferentes estudos em modelos animais sugerem que esta molécula é detentora de marcadas propriedades anti-inflamatórias e antitumorígenicas que a tornam ideal para uma investigação mais aprofundada das suas funções moleculares em ensaios clínicos humanos. [74]

5.2.2.4 Triterpenóides

Os triterpenóides, isolados a partir de várias plantas medicinais, têm sido estudados pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais e imunomoduladoras. [74] No intestino, estes compostos são convertidos em metabolitos que são integrados nas membranas das células intestinais, são absorvidos e levam à modulação de vias de sinalização. [74] Estas moléculas inibem a expressão de genes inflamatórios tais como os que codificam a COX-2, a iNOS e várias citocinas inflamatórias. [74] Os resultados de

vários estudos suportam os efeitos quimiopreventivos dos triterpenoides no CRC e sugerem que deve ser realizada uma análise aprofundada destes agentes em ensaios clínicos de forma a avaliar a farmacocinética, biodisponibilidade e funções antineoplásicas. [74]

5.2.2.5 PUFAs ω -3

Estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos fornecem evidências que suportam que os PUFAs ω -3 podem desempenhar um papel inibitório durante as diferentes fases do CCR. [74]

Em geral, três mecanismos principais são associados ao papel desempenhado pelos PUFAs ω -3: alteração da composição fosfolipídica da membrana celular e da funcionalidade do microdomínio lipídico; competição com os PUFAs ω -6 para as enzimas de metabolização e subsequente produção de mediadores eicosanóides bioativos; e, por último, modulação da sinalização intracelular e a ativação do NF- κ B. [69]

De um conjunto de oito estudos clínicos de suplementação com PUFAs ω -3, seis relataram efeitos protetores. [74] Verificou-se que a suplementação oral com PUFA ω -3 de indivíduos com história prévia de adenomas colorretais esporádicos resultou numa redução de 13% a 70% na proliferação de células epiteliais do intestino em relação ao grupo placebo. [74] Estudos de xenoenxertos de cancro do cólon revelaram efeitos protetores consistentes (40% a 60% de redução no tamanho de xenoenxerto) em ratinhos suplementados com PUFAs ω -3, em comparação com ratinhos não tratados. [74] Resultados semelhantes foram também relatados em estudos com aloenxertos de CRC. [74]

As resolvinas, as lipoxinas e as protectinas, mediadores lipídicos anti-inflamatórios derivados do EPA e do DHA, têm vindo a adquirir importância pelas suas funções antineoplásicas. [74] A acetilação da COX-2 pelo AAS na presença de EPA resulta na formação de 5,12,18R-tri-hidroxi-EPA (18R-*RvE1*). [74] Vários são os estudos que apontam para o papel anti-inflamatório desta resolvina. [74]

Num modelo de colite induzida por DSS foi evidenciada a diminuição da expressão de lipoxina A₄ (LXA₄). [74] Efeitos protetores de análogos da LXA₄ foram observados em modelos de colite induzida por DSS e por outros agentes químicos em animais. [9][74] Os efeitos protetores destes análogos são atribuídos aos efeitos inibitórios sobre as vias de sinalização pró-inflamatórias mediadas pela ligação aos

receptores da LXA₄. [74] A 15-epi-LXA₄, formada na presença de ácido acetilsalicílico, representa um dos mecanismos dos efeitos terapêuticos do AAS. [74] As funções anti-inflamatórias destes mediadores lipídicos sugerem uma potencial estratégia terapêutica quimiopreventiva para doenças relacionadas com a inflamação, como o CCR. [74]

Atualmente, a dieta ocidental típica apresenta um rácio de PUFAs n-6/n-3 de 15:1, em vez do recomendado 3:1. [86] O aumento do consumo de alimentos ricos em EPA e DHA, tais como o peixe e os óleos de peixe e de algas, podem reduzir a inflamação e, por conseguinte, o desenvolvimento de CRC. [74][69] Surgem também evidências de que alterações nutricionais relativas à composição dos ácidos gordos podem resultar num aumento da sensibilidade à quimioterapia e radioterapia e à diminuição dos efeitos colaterais indesejáveis. [69]

VI. CONCLUSÃO

A existência de uma relação entre a inflamação e o desenvolvimento de cancro encontra-se claramente estabelecida, verificando-se que mesmo a progressão do CCR associado a mutações genéticas é afetada pela inflamação. Inúmeros dados epidemiológicos, clínicos e experimentais suportam esta associação. No entanto, os mecanismos responsáveis por essa associação não estão totalmente esclarecidos.

O desenvolvimento de uma resposta imune eficaz implica que as células do sistema imunitário comuniquem entre si através da secreção de mediadores solúveis e da interação célula-célula direta. No entanto, embora certas respostas imunes possam proteger o hospedeiro, outras podem promover a iniciação ou progressão do cancro.

Considerando a heterogeneidade do comportamento do CRC existente nos diferentes indivíduos e as complexas interações entre as células tumorais e as células do sistema imunológico no microambiente tumoral, torna-se um desafio definir o papel de cada tipo de célula imune e de cada mediador inflamatório na promoção ou eliminação do cancro. Assim, é necessária precaução ao avaliar a contribuição de cada um destes componentes para a biologia do cancro, uma vez que estes podem mesmo desempenhar funções diferentes durante diferentes estádios de desenvolvimento tumoral.

Das evidências do envolvimento dos TLRs no processo de crescimento e progressão tumoral impôs-se uma nova abordagem imunoterapêutica. Atualmente vários análogos dos TLRs encontram-se sob investigação para aplicação no tratamento do CCR. No entanto, em resultado do incompleto esclarecimento de todos os mecanismos que são inerentes a estas vias, não existe coerência quanto à sua verdadeira contribuição para terapêutica.

A quimioprevenção, uma abordagem que corresponde à utilização de agentes químicos de forma a bloquear, inverter ou retardar o desenvolvimento do cancro, tem sido alvo de investigação quanto à sua utilização em situações de CCR.

Evidências de vários estudos sustentam o papel positivo dos fármacos anti-inflamatórios, particularmente os AINEs, como inibidores do desenvolvimento do CRC. No entanto, dados concretos em relação ao seu impacto na mortalidade associada ao CCR são ainda desconhecidos. Tanto a duração do tratamento como a posologia a instituir para se verificarem os efeitos terapêuticos desejados permanecem desconhecidos; para além disso, o perfil de segurança destes fármacos precisa de ser avaliado uma vez que lhes estão associados alguns efeitos adversos consideráveis. Deste modo, emerge a

necessidade da realização de investigações que permitam o desenvolvimento de análogos ou derivados destes fármacos que proporcionem um melhor perfil de segurança, sem detrimento das propriedades benéficas, e que permitam o estabelecimento de planos de terapêuticos bem definidos.

Para além destes agentes sintéticos, outras moléculas bioativas naturais têm sido estudadas quanto ao seu potencial contra o CCR. Muitos destes agentes são bem tolerados e podem funcionar como alternativa ou como adjuvantes a compostos sintéticos.

A cada investigação que se realiza acerca desta temática, novas condicionantes parecem surgir. De facto, verifica-se que existe uma necessidade em esclarecer quais os mecanismos que estão por trás de alguns dos resultados que se obtêm. Em todo o caso, a combinação de diferentes terapias parece ser a abordagem mais promissora para que sejam atingidos os benefícios pretendidos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinto A. Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações. 1 ed. Lisboa: LIDEL, 2007.
2. Ogino S, Galon J, Fuchs C. Cancer Immunology - Analysis of Host and Tumor Factors for Personalized Medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8(12): 711-719.
3. Baba A, Cătoi C. Comparative Oncology. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007 [citado em abril de 2015]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9561/>
4. Pierotti M, Schichman S, Sozzi G, Croce C. Holland-Frei Cancer Medicine. Hamilton: BC Decker; 2000 [citado em abril de 2015] Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20806/#A1032>
5. Vasen H, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie J, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. 13 de fevereiro 2013; 62(6): 812-823.
6. Saxena A, Baliga M, Ponemone V, Kaur K, Larsen B, Fletcher E, et al. Mucus and adiponectin deficiency: role in chronic inflammation-induced colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. Setembro 2013; 28(9): 1267-1279.
7. Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(2): 174-184.
8. Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 7 de agosto de 2014; 20(29): 9828-9849.
9. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 7 de agosto de 2014; 20(29): 9716-9731.
10. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O, et al. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*. 23 de março 2015; 5: 63-64.
11. Henry C, Sedjo R, Rozhok A, Salstrom J, Ahnen D, Levin T, et al. Lack of significant association between serum inflammatory cytokine profiles and the presence of colorectal adenoma. *BMC Cancer*. 2015; 15(1): 1115-1124.
12. Lochhead P, Chan A, Giovannucci E, Fuchs C, Wu K, Nishihara R, O'Brien M, Ogino S. Progress and Opportunities in Molecular Pathological Epidemiology of Colorectal Premalignant Lesions. *Am J Gastroenterol*. Agosto de 2014; 109(8): 1205-1214.
13. Markowitz S, Bertagnoli M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 17 de dezembro de 2009; 361(25): 2449-60.

14. Klampfer L. Cytokines, Inflammation And Colon Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. Maio de 2011; 11(4): 451-464.
15. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF- κ B Signaling Pathway, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cellular & Molecular Immunology*. Outubro de 2009; 6(5): 327-334.
16. Rubin D, Shaker A, Levin M. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Frontiers in Immunology*. 8 de maio de 2012; 3: 107-117.
17. Di Caro G, Marchesi F, Laghi L, Grizzi F. Immune cells: plastic players along colorectal cancer Progression. *J. Cell. Mol. Med*. 2013; 17(9): 1088-1095.
18. Garziera M, Toffoli G. Inhibition of host immune response in colorectal cancer: Human leukocyte antigen-G and beyond. *World J Gastroenterol*. 14 de abril de 2014; 20(14): 3778-3794.
19. Formica V, Cereda V, Nardecchia A, Tesauro M, Roseli M. Immune reaction and colorectal cancer: Friends or foes?. *World J Gastroenterol*. 21 de setembro de 2014; 20(35): 12407-12419.
20. Armelao F, de Pretis G. Familial colorectal cancer: A review. *World J Gastroenterol*. 28 de julho de 2014; 20(28): 9292-9298.
21. Kim E, Chang D. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol*. 7 de agosto de 2014; 20(29): 9872-9881.
22. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 12 de outubro de 2009; 4: 22-45.
23. Luddy K, Robertson-Tessi M, Tafreshi N, Soliman H, Morse D. The role of toll-like receptors in colorectal cancer progression: evidence for epithelial to leucocytic transition. *Frontiers in Immunology*. 20 de outubro de 2014; 5: 429-435.
24. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Imunologia de Kuby*. 6 ed. Artmed Editora, 2008.
25. Wittig B, Schmidt M, Scheithauer W, Schmoll H. MGN1703, an immunomodulator and toll-like receptor 9 (TLR-9)agonist: From bench to bedside. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015; 94(1): 31-44.
26. Markman J, Shiao S. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2014; 6(2): 208-23.
27. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and Perspectives. *World J Gastroenterol*. 14 de abril de 2014; 20(14): 3738-3750.

28. Pedroza-Pacheco I, Madrigal A, Saudemont A. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013; 10(3): 229-229.
29. Disis M. Immune Regulation of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 10 de outubro de 2010; 28(29): 4531-4538.
30. Dey A, Allen J, Hankey-Giblin P. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Frontiers in Immunology*. 22 de janeiro de 2015; 5: 683-698.
31. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell*. 8 de maio de 2014; 157(4): 832–844.
32. Hume D. The many alternative faces of macrophage activation. *Frontiers in Immunology*. Julho de 2015; 6: 370.
33. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 25 de setembro de 2014; 513(7519): 559–563.
34. Pancione M, Giordano G, Remo A, Febbraro A, Sabatino L, Manfrin E, et al. Immune Escape Mechanisms in Colorectal Cancer Pathogenesis and Liver Metastasis. *Journal of Immunology Research*. 16 de janeiro de 2014; 2014: 686879.
35. Gri G, Frossi B, D’Inca F, Danelli L, Betto E, Mion F, et al. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Front. Immunol*. 25 de maio de 2012; 3:120.
36. Marech I, Ammendola M, Gadaleta C, Zizzo N, Oakley C, Damiano C, et al. Possible biological and translational significance of mast cells density in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 21 julho de 2014; 20(27): 8910-8920.
37. Dalton D, Noelle RJ. The roles of mast cells in anticancer immunity. *Cancer Immunol Immunother*. Setembro de 2012; 61(9): 1511-1520.
38. Huang X, Yang Y. Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin Ther Targets*. Agosto de 2010; 14(8): 787–796.
39. Koido S, Ohkusa T, Homma S, Namiki Y, Takakura K, Saito K, et al. Immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 14 de dezembro 2013; 19(46): 8531-8542.
40. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Seminars in Cancer Biology*. 2013; 23: 200-207.

41. Maeda K, Shibutani M, Otani H, Nagahara H, Ikeya T, Iseki Y. Inflammation-based factors and prognosis in patients with colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 15 de agosto de 2015; 7(8): 11-117.
42. Iodice V, Laganà B, Lauri C, Capriotti G, Germano V, D'Amelio R. Imaging B lymphocytes in autoimmune inflammatory diseases. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* Setembro de 2014; 58(2): 258-268.
43. Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Frontiers in Immunology.* Julho de 2014; 5: 367.
44. Fan Y, Liu B. Expression of Toll-like receptors in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Experimental and Therapeutic Medicines.* 2015; 9: 1455-1459.
45. Yesudhas D, Gosu V, Anwar MA, Choi S. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Frontiers in Immunology.* Julho de 2014; 5:334.
46. Li TT, Ogino S, Qian ZR. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 21 de dezembro de 2014; 20(47): 17699-17708.
47. Frosali S, Pagliari D, Gambassi G, Landolfi R, Pandolfi F, Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *Journal of Immunology Research.* 2015; 2015: 489821.
48. BroglieP, Matsumoto K, Akira S, Brautigan DL, Ninomiya-Tsuji J. Transforming Growth Factor β -activated Kinase 1 (TAK1) Kinase Adaptor, TAK1-binding Protein 2, Plays Dual Roles in TAK1 Signaling by Recruiting Both an Activator and an Inhibitor of TAK1 Kinase in Tumor Necrosis Factor Signaling Pathway. *J Biol Chem.* 22 de janeiro de 2010; 285(4): 2333-2339.
49. Lu CC, Kuo HC, Wang FS, Jou MH, Lee KC, Chuang JH. Upregulation of TLRs and IL-6 as a Marker in Human Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 159-177.
50. Klimosch SN, Försti A, Eckert J, Knezevic J, Bevier M, Schönfels W, et al. Functional TLR5 Genetic Variants Affect Human Colorectal Cancer Survival. *Cancer Res.* 15 de dezembro de 2013; 73(24): 7232-7242.
51. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer. *Oncogene.* 3 de julho de 2014; 33(27): 3485–3495.
52. Chen Q, Davidson TS, Huter EN, Shevach EM. Engagement of TLR2 Does not Reverse the Suppressor Function of Mouse Regulatory T Cells, but Promotes Their Survival. *J Immunol.* 1 de outubro de 2009; 183(7): 4458–4466.

53. Olivier A, Sainz-Perez A, Dong H, Sparwasser T, Majlessi L, Leclerc C. The adjuvant effect of TLR agonists on CD41 effector T cells is under the indirect control of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41: 2303–2313.
54. Lowe EL, Crother TR, Rabizadeh S, Hu B, Wang H, Chen S, et al. Toll-Like Receptor 2 Signaling Protects Mice from Tumor Development in a Mouse Model of Colitis-Induced Cancer. *PLoS ONE*. Setembro de 2010; 5(9): e13027.
55. Guo H, Chen Y, Hu X, Qian G, Ge S, Zhang J. The regulation of toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells. *Molecular Cancer*. 2013; 12:77.
56. Boulard O, Asquith MJ, Powrie F, Maloy KJ. TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 516–524.
57. Wang EL, Qian ZR, Nakasono M, Tanahashi T, Yoshimoto K, Bando Y, et al. High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2010; 102: 908 – 915.
58. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. Toll-like receptor-4 (TLR4) promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. Dezembro 2007; 133(6): 1869–1881.
59. Hernandez Y, Sotolongo J, Fukata M. Toll-Like Receptor 4 Signaling Integrates Intestinal Inflammation with Tumorigenesis: Lessons from the Murine Model of Colitis-Associated Cancer. *Cancers*. 2011; 3: 3104-3113.
60. Melisi D, Frizziero M, Tamburrino A, Zanotto M, Carbone C, Piro G, et al. Toll-Like Receptor 9 Agonists for Cancer Therapy. *Biomedicines*. 4 de agosto de 2014; 2: 211-228.
61. O’Hara JR, Feener TD, Fischer CD, Buret AG. *Campylobacter jejuni* Disrupts Protective Toll-Like Receptor 9 Signaling in Colonic Epithelial Cells and Increases the Severity of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Infection and Immunity*. 6 de fevereiro de 2012; 80(4): 1563-1571.
62. Fűri I, Sipos F, Germann TM, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B, et al. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: Clinico-pathogenic aspects. *World J Gastroenterol*. 14 de julho de 2013; 19(26): 4119-4126.
63. Gao C, Kozłowska A, Nechaev S, Li H, Zhang Q, Dewan M, et al. TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiation therapy. *Cancer Res*. 15 de dezembro de 2013; 73(24): 7211-7221.
64. Gambhir S, Vyas D, Hollis M, Aekka A, Vyas A. Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol*. 21 de março de 2015; 21(11): 3174-3183.

65. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646-647.
66. Greten F, Eckmann L, Greten T, Park J, Li Z, Egan L, et al. IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell*. 6 de agosto de 2004; 118(3): 285-296.
67. Fukata M, Hernandez Y, Conduah D, Cohen J, Chen A, Breglio K, et al. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflamm Bowel Dis*. Julho de 2009; 15(7): 997-1006.
68. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle A, Dann S, Mages J, Lang R, et al. Opposing functions of IKK β during acute and chronic intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 20 de agosto de 2008; 105(39): 15058-15063.
69. Hofmanová J, Straková N, Vaculová A, Tylichová Z, Safaríková B, Skender B, et al. Interaction of Dietary Fatty Acids with Tumour Necrosis Factor Family Cytokines during Colon Inflammation and Cancer. *Mediators of Inflammation*. 2014; 2014: 1-17.
70. Goldszmid R, Dzutsev A, Trinchieri G. Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. *Cell Host Microbe*. Março de 2014. 15(03): 295-305.
71. Terzic J, Grivennikov, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6): 2101-2114.
72. Fischer S, Hawk E, A. Lubet R. Coxibs and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Animal Models of Cancer Chemoprevention. *Cancer Prevention Research*. Novembro de 2011. 4(11): 1728-1735.
73. Khan S, Ali A, Khan S, Zahran S, Damanhour G, Azhar E, et al. Unraveling the Complex Relationship Triad between Lipids, Obesity, and Inflammation. *Mediators of inflammation*. 28 de agosto de 2014; 2014: 502749-502765.
74. Janakiram N, Rao C. The Role of Inflammation in Colon Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014; 816: 25-52.
75. Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, Pozza A, Scarpa M, Kotsafti A, et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 14 de junho de 2014. 20(22): 6774-6785.

76. Front Biosci. Chu J, Chou H, Chen D. Prevention of colorectal cancer using COX-2 inhibitors: basic science and clinical applications. 1 de setembro de 2014; 1(9):2697-2713.
77. O'Leary D, Bhatt L, Woolley J, Gough D, Wang J, Cotter T, et al. TLR-4 Signalling Accelerates Colon Cancer Cell Adhesion via NF- κ B Mediated Transcriptional Up-Regulation of Nox-1. PloS one. 11 de outubro de 2012; 7(10): 44176-44188.
78. Manea S, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. Redox biology. 25 de junho de 2015; 5:358-366.
79. Holldack J. Toll-like receptors as therapeutic targets for cancer. Drug discovery today. Setembro de 2013; 19(4): 379-382.
80. Grauer O, Nierkens S, Bennink E, Toonen L, Boon L, et al. CD41FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress anti-glioma immune responses in vivo. International journal of cancer. 2007; 121(1): 95-105.
81. Suttmüller R, den Brok M, Kramer M, Bennink E, Toonen L, Kullberg B, et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. The Journal of clinical investigation. Fevereiro de 2006; 116(2): 485-494.
82. Krieg A. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. The Journal of clinical investigation. Maio de 2007; 117(5): 1184-94.
83. Djaldetti M, Bessler H. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells. World J Gastrointest Oncol. 15 de maio de 2014. 6(5): 129:138.
84. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann B. As bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12 ed. São Paulo AMGH editor, 2012.
85. Manzano A, Pérez-Segura P. Colorectal Cancer Chemoprevention: Is This the Future of Colorectal Cancer Prevention?. TheScientificWorldJournal. 2012; 2012: 327341-327349.
86. Szeffel J, Kruszewski W, Sobczak E. Factors Influencing the Eicosanoids Synthesis In Vivo. BioMed research internacional. 2015; 2015: 690692-690698.
87. Nolfo F, Rametta S, Marventano S, Grosso G, Mistretta A, Drago F. Pharmacological and dietary prevention for colorectal cancer. BMC surgery. Junho de 2013; 13 (suppl2): S16-27.