

Universidade do Algarve

Utilização de anti-inflamatórios não esteróides no
tratamento de neoplasias

Daniela Botelho da Silva

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor Hélder Mota-Filipe
Professora Doutora Custódia Fonseca (co-orientadora)

2013

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Utilização de anti-inflamatórios não esteróides no
tratamento de neoplasias

Daniela Botelho da Silva

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor Hélder Mota-Filipe
Professora Doutora Custódia Fonseca (co-orientadora)

Faro
2013

Utilização de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento de neoplasias

“Declaração de autoria do 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.”

“Copyright”© Daniela Botelho da Silva

“A Universidade do Algarve tem o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por outro qualquer 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.”

Índice

Índice de Figuras	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	iv
1. Introdução	1
2. A cascata do ácido araquidônico e o papel da prostaglandina E2 no processo inflamatório	4
3. Relação entre inflamação e carcinogênese	10
3.1. Papel das ciclooxigenases no desenvolvimento tumoral	11
3.2. Relação entre os recetores prostanoídes e a tumorigênese	12
3.3. Papel da prostaglandina E2 na inflamação e cancro	13
3.4. Papel das plaquetas na tumorigênese	14
4. Mecanismos anticarcinogénicos dos Anti-inflamatórios Não Esteróides	15
4.1. Mecanismos dependentes das ciclooxigenases	16
4.2. Mecanismos independentes das ciclooxigenases	17
4.2.1. Via do fator nuclear kappa-B	17
4.2.2. Sinalização redox	19
4.2.3. Regulação da apoptose	20
4.2.4. Sistema tiorredoxina.....	22
4.2.5. Outros mecanismos	23
5. O papel das prostaglandinas no processo de metastização.....	25
5.1. Relação entre inflamação crónica e angiogénese	26
5.2. Relação entre prostaglandinas e sinalização linfo-angiogénica	29
6. Influência dos AINEs na imunidade de tumores	33
6.1. Influência dos recetores prostanoídes no sistema imunitário	34
6.2. Papel da prostaglandina E2 na imunidade	34
7. Conclusão	38
Referências Bibliográficas	39

Índice de Figuras

Figura 1. A via do ácido araquidónico

Figura 2. A via das COX

Figura 3. Biossíntese e funções biológicas das prostaglandinas e locais de ação dos AINEs

Figura 4. Via biossintética da PGE2

Figura 5. Esquema dos mecanismos dos AINEs, dependentes e independentes das COX

Figura 6. Representação esquemática da relação entre fatores de crescimento linfo-angiogénicos, a via das prostaglandinas e o processo de metastização

Lista de Abreviaturas

13-PGR – 15-ceto-prostaglandina- Δ 13-redutase
15 -PGDH – 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase
AA – ácido araquidónico
AINEs – anti-inflamatórios não esteróides
CCR – cancro colorretal
CLX - celecoxibe
COX – ciclooxigenase
cPGES - prostaglandina E sintase citosólica
CTL – linfócitos T citotóxicos
DMH – dimetil hidantoína
DNA - ácido desoxirribonucleico
EC – células endoteliais
ECM – matriz extra-celular
GI – gastrointestinal
IAP – proteínas inibidoras da apoptose
IFN - interferão
IL-2 – interleucina 2
IL-1 β – interleucina 1-beta
iNOS – óxido nítrico sintase
Jak3 – janus kinase 3
KO - knockout
LGR5 – recetores acoplados a proteína G que contém domínios ricos em repetições de leucina
LOX – lipoxigenase
M-CSF – fator estimulador de colónias de macrófagos
MDSC – células supressoras derivadas da linhagem mielóide
MMP - metaloproteinases
mPGES – prostaglandina E sintase-1 microsomal
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
NF- κ B – fator nuclear kappa-B
NK – células exterminadoras naturais
NL – nódulos linfáticos
PARP – poli (ADP-ribose) polimerase
PPAR – recetor ativado por proliferador do peroxissomo
PCNA – antigénio nuclear de proliferação celular
PGs – prostaglandinas
PLA₂ - fosfolipase A₂
RE – retículo endoplasmático
RONS – espécies reativas de oxigénio e azoto
ROS – espécies reativas de oxigénio
Stat 3 – transdutores de sinal e ativadores da transcrição
TGF – fator de crescimento tumoral
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
Tregs – células T reguladoras
Trx – tioredoxina
TrxR – tioredoxina redutase
TXA2 – tromboxano A2
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

Este trabalho pretende ser uma revisão exaustiva da literatura sobre o papel dos anti-inflamatórios não esteróides no tratamento de neoplasias.

Os anti-inflamatórios não esteróides têm sido utilizados ao longo dos tempos para o tratamento da dor e da febre sendo que às propriedades analgésicas e anti-piréticas acrescenta-se um marcado efeito anti-inflamatório. Estas características resultaram na ampla utilização dos fármacos desta classe.

Têm sido descritos, para além daqueles efeitos terapêuticos mais comuns associados aos anti-inflamatórios não esteróides, outros que apontam para que possam exercer um papel importante no tratamento de neoplasias.

É hoje conhecido que diversos tipos de tumores expressam ciclooxigenase-2 em quantidade significativa, o que aponta para um papel potencial desta enzima no desenvolvimento tumoral. Além disso, níveis elevados de prostaglandina E2 parecem poder contribuir para o crescimento dos tumores. Apesar do grande desenvolvimento do conhecimento nesta área, muito há ainda por esclarecer.

Assim, neste trabalho pretende-se analisar a relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de neoplasias e de que forma a utilização de anti-inflamatórios pode constituir uma estratégia terapêutica (preventiva ou curativa) e mais especificamente o papel da cascata do ácido araquidónico.

Pretende-se ainda rever estratégias terapêuticas alternativas, envolvendo outros alvos terapêuticos e refletir sobre o valor clínico das mesmas.

Palavras-chave: anti-inflamatórios não esteróides, cancro, ciclooxigenase 2, inflamação, prostaglandinas

Abstract

This dissertation is intended to be an exhaustive review of the literature about the role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of neoplasms.

Non-steroidal anti-inflammatory drugs have been widely used throughout history for the treatment of pain and fever considering that allied to the analgesic and antipyretic effects this class of drugs are potent anti-inflammatories.

It has been considered that beyond their more usual therapeutical effects this drugs could potentially be used to combat neoplasms. It is known that different types of tumors highly express

the cyclooxygenase-2 which has led to believe that this enzyme plays a key role in tumor development. Furthermore, elevated levels of prostaglandin E2 may enhance tumor growth. Although the knowledge in this area is already abundant there is still much more to be discovered and clarified.

Therefore, this work intends to analyze the connection between the inflammatory process and the development of neoplasms and how the use of anti-inflammatory drugs can work as a therapeutic strategy and more specifically the role of the araquidonic acid pathway.

One of the goals of this work is also to review and reflect about the value of alternative therapeutic strategies, involving different targets.

Keywords: non-steroidal anti-inflammatory drugs, cancer, cyclooxygenase-2, inflammation, prostaglandin

Introdução

O processo inflamatório é uma resposta natural do organismo face a um estímulo nocivo, sendo que se divide em 3 fases: fase aguda, que se caracteriza por uma vasodilatação local passageira e aumento da permeabilidade capilar; fase subaguda onde se dá a infiltração de leucócitos e células fagocíticas; e, fase proliferativa crónica em que ocorre degeneração tecidual e consequente fibrose [1].

Como resposta a um determinado estímulo pode haver ativação de uma enzima existente na membrana celular, a fosfolipase A2 [2]. Esta enzima liberta o ácido araquidónico (AA) da membrana fosfolipídica que é depois metabolizado em eicosanoides. A síntese de prostanóides – prostaciclina, prostaglandinas e tromboxanos – é conseguida através de um complexo de enzimas microssomais geralmente conhecidas como ciclooxigenases [1].

Existem duas isoformas principais desta enzima. A COX-1 que é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos e a COX-2 cuja expressão é induzida por citocinas, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. Enquanto que a COX-1 é responsável pela manutenção da homeostase fisiológica de diferentes órgãos e tecidos como por exemplo a citoproteção do epitélio gástrico a COX-2 aparece como fonte de prostanóides formados durante o processo inflamatório [3].

As prostaglandinas são libertadas como resposta a uma agressão das células e os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) normalmente inibem a sua síntese em todos os tipos de células. No entanto a aspirina e os AINEs tradicionais geralmente não inibem a formação de outros mediadores pró-inflamatórios como os leucotrienos que resultam da ação da lipoxigenase sobre o ácido araquidónico [1].

Os AINEs são uma classe de fármacos extremamente heterogénea e diversificada sendo que as únicas características que possuem em comum são: a ausência de uma estrutura esteróide e as suas propriedades farmacológicas enquanto analgésicos, anti-piréticos e anti-inflamatórios [4]. Este grupo de fármacos pode ser dividido em 2 grandes grupos que incluem um grupo de compostos não selectivos e os inibidores selectivos da COX-2 [1].

Os AINEs têm sido utilizados ao longo dos tempos tradicionalmente devido às suas inequívocas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. No entanto, nos últimos anos têm vindo a aparecer inúmeros estudos que apontam para um papel potencial dos AINEs enquanto antineoplásicos e como agentes quimiopreventivos [5]. Esta propriedade parece estar aliada a um papel importante de enzimas envolvidas na cascata do ácido araquidónico e com o envolvimento de prostaglandinas (PGs) no desenvolvimento tumoral. Estas evidências apontam para uma provável relação entre o processo inflamatório e a progressão de neoplasias, sendo que a PGE2 é a

prostaglandina que está associada com inflamação, crescimento tumoral e metastização [6].

A tumorigênese é um processo sequencial e multifactorial. Até à data o grande desafio no tratamento e prevenção do cancro consiste em identificar as múltiplas interações celulares das vias responsáveis pela proliferação de células malignas, sobrevivência celular, metastização do tumor e neo-angiogênese. Dentre os inúmeros fatores envolvidos na progressão tumoral, o AA e os seus metabolitos têm recentemente gerado um interesse devido às evidências do seu papel de destaque na biologia de tumores. A ideia de que a inflamação desempenha um papel a nível da carcinogênese advém de estudos epidemiológicos, indicando que o tratamento com AINEs reduz a incidência e progressão do cancro [7].

Todos estes estudos assentam na premissa de que, sendo que os AINEs atuam em pontos-chave da cascata do ácido araquidónico, bloqueando a produção de prostaglandinas, é possível que esta classe de fármacos possa ser utilizada enquanto anti-cancerígenos.

A pertinência deste trabalho centra-se no facto de que apesar da intensa investigação realizada nesta área e dos inúmeros recursos já aplicados o cancro continua a ser a segunda causa de morte prematura no mundo e são diagnosticados 5 milhões de casos novos todos os anos só na europa e Estados Unidos da América. Há uma tendência para a incidência de certos tipos de cancro aumentar devido ao aumento da esperança média de vida e conseqüente envelhecimento da população. Por isso é cada vez mais premente a necessidade de se encontrar estratégias eficazes e de baixo custo para a prevenção do cancro [8]. O cancro constitui uma doença com um impacto económico incrível a nível dos sistemas de saúde sem falar no custo emocional desta doença tanto a nível do próprio doente bem como da família. Tendo em conta que certos AINEs têm sido utilizados já há mais de um século para o tratamento de afeções mais comuns como a febre e a inflamação seria interessante pensar que fármacos que têm estado disponíveis há tanto tempo possam agora ser usados para o combate a uma doença que apesar de intensamente investigada continua a afetar milhões de pessoas no mundo inteiro.

O intuito deste trabalho prende-se então com analisar qual a relação entra a inflamação, e mais especificamente o papel da cascata do ácido araquidónico, no processo da carcinogênese. Esclarecendo quais os diferentes mecanismos envolvidos no efeito anti carcinogénico dos AINEs. Sendo que a metastização continua a ser uma das conseqüências mais graves da progressão tumoral é também de interesse analisar de que forma as prostaglandinas servem de mediadores neste fenómeno e de que forma se pode recorrer aos AINEs com o intuito de bloquear a propagação de metástases. O sistema imunitário continua a constituir um dos mecanismos de defesa mais eficazes que o nosso organismo possui no combate ao cancro. Como tal, um dos primeiros passos da progressão tumoral centra-se na inutilização das nossas células de defesa. Seguindo esta linha de pensamento, têm vindo a surgir inúmeros estudos que apontam para um papel potencial dos AINEs

na imunidade de tumores. É possível que estes possam ser utilizados de forma a estimular o nosso sistema imunitário de forma a combater a progressão das células malignas.

A cascata do ácido araquidônico e o papel da prostaglandina E2 no processo inflamatório

No ser humano, o ácido araquidônico (AA) é libertado na sua maioria a partir das membranas fosfolipídicas, pela ação de pelo menos uma destas enzimas: fosfolipase A₂ (PLA₂), fosfolipase C e fosfolipase D [7]. Esta família de enzimas catalisa a hidrólise dos fosfolípidos da membrana, libertando ácidos gordos livres, incluindo o ácido araquidônico, dos lípidos membranares [9]. No entanto, destas enzimas, a PLA₂ parece ser a única fosfolipase capaz de libertar o AA numa reação direta e por isso, é considerada como sendo a enzima de maior relevância, no que diz respeito ao metabolismo do AA [9]. Após ser mobilizado a partir dos fosfolípidos da membrana celular, o ácido araquidônico pode ser metabolizado em várias classes de lípidos biologicamente ativos, chamados de eicosanóides, por diferentes enzimas tais como, a ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) ou epoxigenase P450 (Figura 1). O AA também pode ser obtido a partir da clivagem do diacilglicerol que é um produto minoritário do metabolismo do ácido linoleico [9].

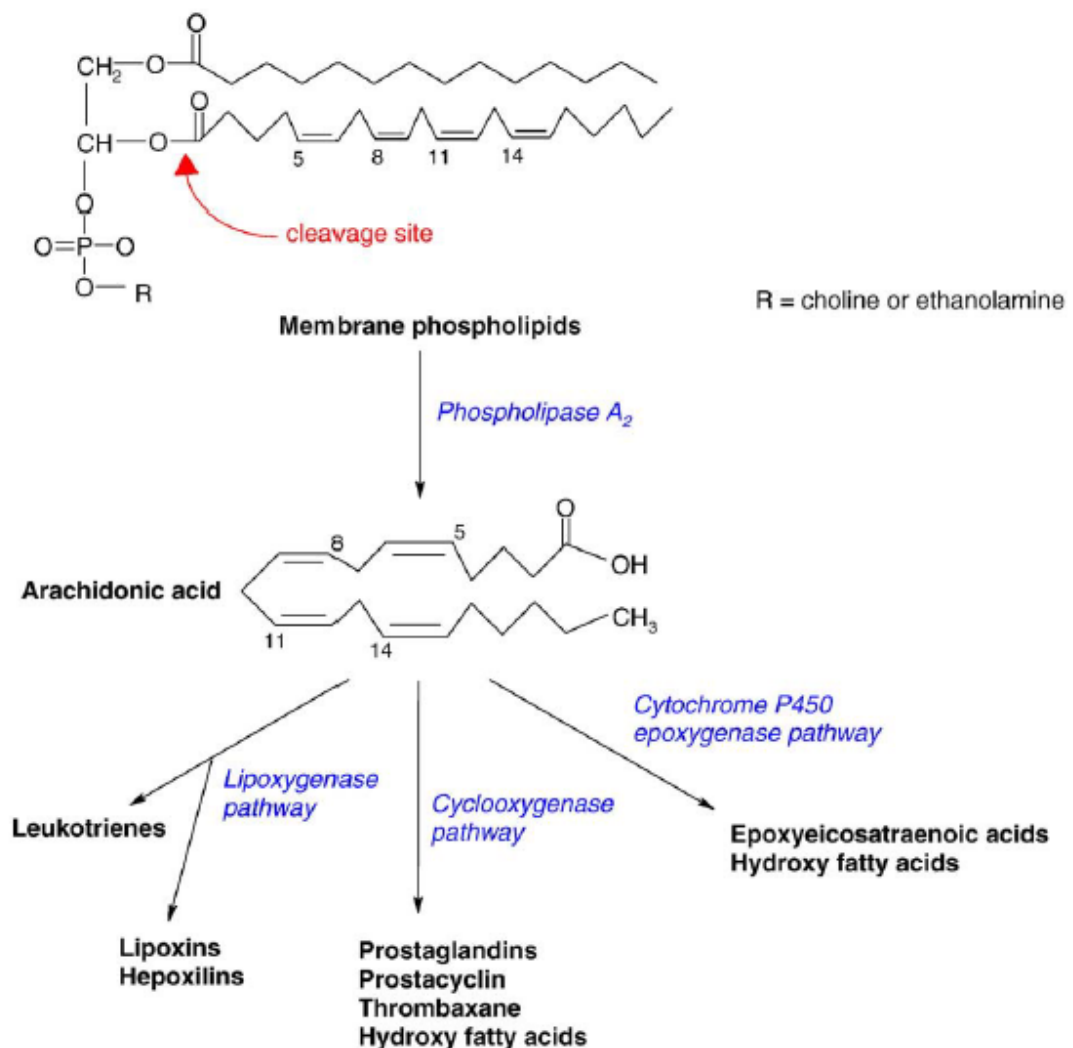


Figura 1 – A via do ácido araquidônico [7]

Da via das LOX obtém-se diversos metabolitos que incluem, os leucotrienos, as lipoxinas e as epoxinas [10]. A via das COX produz prostaglandinas G2 e H2, sendo que esta última é posteriormente convertida noutras prostaglandinas (PGs) [11]. A partir da via das COX obtém-se uma variedade de prostanoides, incluindo: prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaciclina I2 (PGI2), prostaglandina F2 α (PGF2 α) e tromboxano A2 (TXA2) [12]. Os prostanoides têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido ao seu papel numa série de condições patológicas, incluindo, inflamação, trombose, artrite, aterosclerose e cancro [13].

Atualmente conhecem-se 3 isoformas da COX: COX-1, COX-2 e COX-3 [14]. As COX-1 e COX-2 são responsáveis pela síntese de PGs e por isso também são conhecidas como prostaglandina-endoperóxido sintase ou prostaglandina H sintase [15]. A COX-1, codificada pelo gene PTGS1, é expressa de forma constitutiva na maior parte dos tecidos dos mamíferos e parece ser responsável por regular funções fisiológicas normais, incluindo a manutenção da homeostasia vascular, mediador de respostas alérgicas e imunológicas, e estimulação da produção de mucosa gástrica [16]. A COX-2, codificada pelo gene PTGS2, cuja expressão constitutiva é largamente restrita aos rins bem como a áreas do sistema nervoso central, pode ser induzida de forma transitória por estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas, e promotores tumorais, de forma a aumentar a taxa de formação de PGs como resposta a estes estímulos [17]. O gene PTSG2 encontra-se frequentemente sobre-expresso em células cancerígenas, e tem-se observado que existe uma relação entre níveis elevados de expressão da COX-2 e os processos de mutagénese e angiogénese [18]. A COX-3 é uma variante da COX-1 que é obtida por *splicing* alternativo¹ [9]. Também codificadas pelo gene PTSG1, as proteínas COX-3 retém um intrão e uma mutação *frameshift*, o que faz com que estas proteínas sejam não funcionais no humano e nos ratos [9]. Apesar de a COX-3 estar maioritariamente presente no cérebro e medula espinal, as suas funções precisas ainda estão por esclarecer [11].

Tanto a COX-1 como a COX-2 têm a capacidade de oxidar AA em PGG2, um endoperóxido relativamente instável, que é subseqüentemente reduzido em PGH2 [20]. Uma vez sintetizada, a PGH2, é rapidamente convertida em prostanoides através da ação de diferentes sintases (PGDS, PGES, PGFS, PGIS e TXAS, respetivamente) (Figura 2). A PGH2 é então convertida em diferentes prostaglandinas, incluindo PGE2, que induz a febre e estimula a produção de muco gástrico, reabsorção óssea e contrações uterinas; a PGD2 que medeia vasodilatação, resposta alérgica, e diminuição da temperatura corporal; prostaciclina (PGI2), que induz vasodilatação e inibe ativação das plaquetas; e tromboxano (TXA2) que funciona em contraste à PGI2 e induz vasoconstrição e agregação das plaquetas [16].

[1] *Splicing*: processo biológico no qual pre-mRNA é convertido em mRNA funcional, ao haver excisão dos intrões e junção dos exões. *Splicing* alternativo: variação na composição dos exões do mRNA final [19].

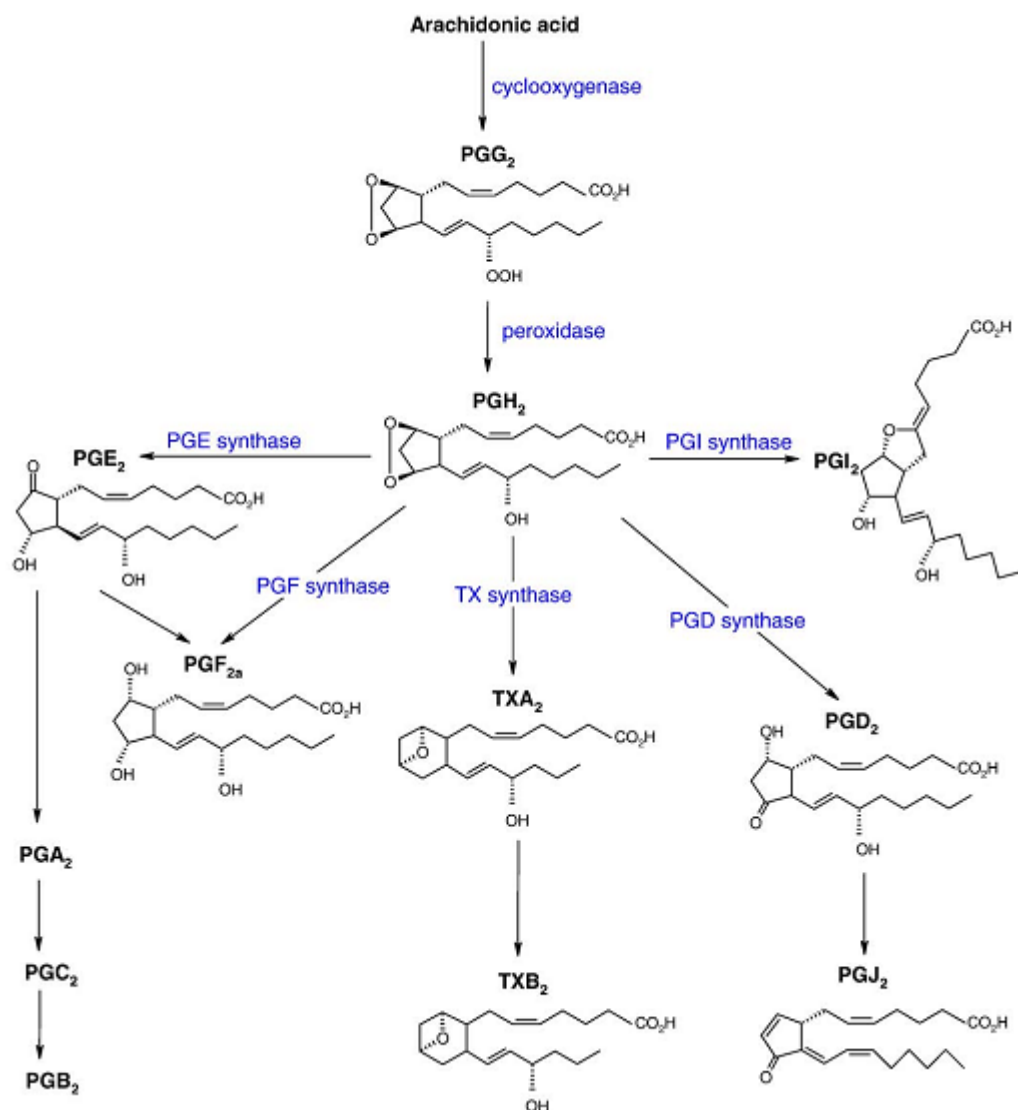


Figura 2 – A via das COX [7]

As enzimas COX são o alvo principal dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs). Ao inibirem a produção de PGs estes fármacos suprimem as vias que medeiam a inflamação, dor e febre [9].

Os prostanoides normalmente atuam ao nível do tecido onde são sintetizados, por um processo mediado por um transportador de forma a ativar os recetores membranares, ou nalguns casos podem interagir com recetores nucleares [9]. Existem cinco tipos de recetores membranares dos prostanoides, altamente seletivos para cada substrato, denominados recetores P: EP, FP, DP, IP, e TP (Figura 3). Os recetores membranares dos prostanoides são maioritariamente recetores acoplados a uma proteína G [12]. Cada recetor é expresso de forma específica em diferentes tipos de células o que permite um controlo apertado das suas funções fisiológicas [21].

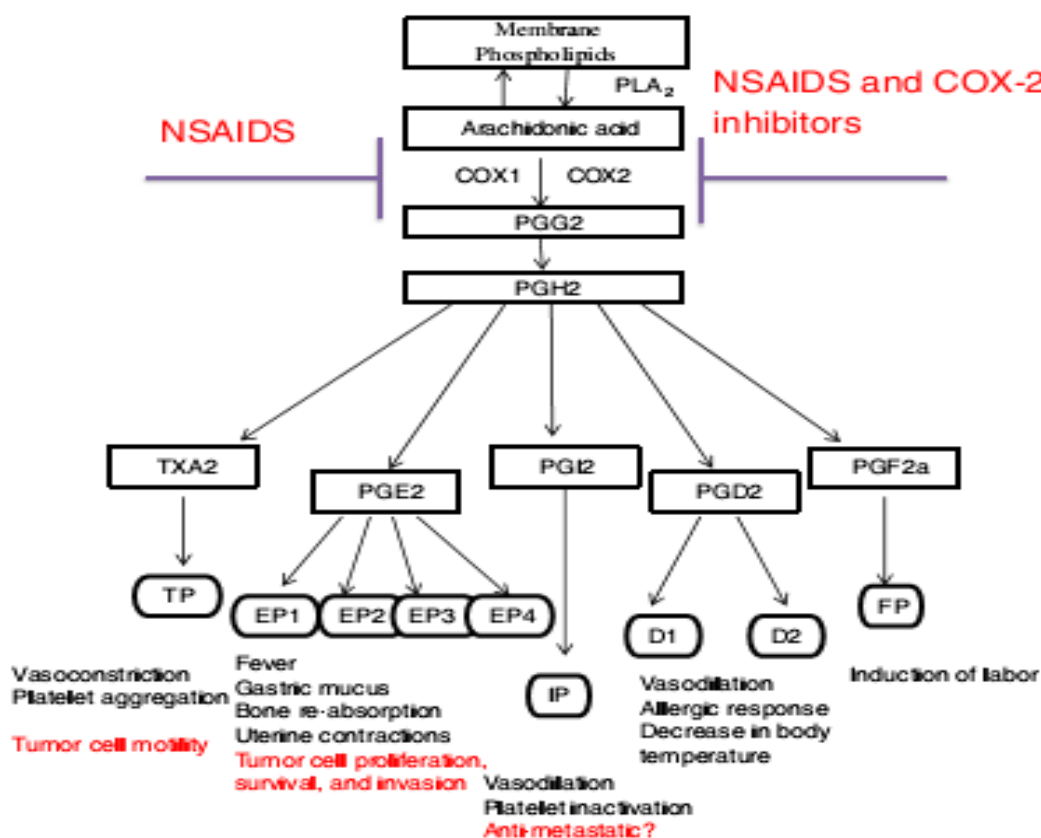


Figura 3 – Biossíntese e funções biológicas das prostaglandinas e locais de ação dos AINEs [9]

Das várias funções de cada recetor, é de realçar o recetor EP2 que tem um papel importante a nível da tumorigénese e inflamação. A PGE2 liga-se aos membros da família de recetores EP, que consistem em quatro isoformas (EP1-4) [22]. Os recetores EP são expressos de forma ubíqua na maioria dos sistemas de órgãos [21]. Após ligação aos recetores dá-se uma cascata de transdução de sinais que modulam níveis intracelulares de cAMP e cálcio que têm efeitos a vários níveis da biologia das células [6]. Acoplado à formação ubíqua de PGE2, a ativação de recetores EP é responsável pela capacidade pleiotrópica da PGE2 potencialmente ativar diversos efeitos biológicos importantes para o desenvolvimento tumoral, incluindo proliferação celular, apoptose, angiogénese, inflamação, e vigilância imunológica em diferentes tipos celulares dentro de uma série de tecidos [21]. Modelos animais KO demonstram que estes recetores têm um papel importante a nível de promoverem tumorigénese, angiogénese e linfangiogénese em vários tumores e por isso podem ser alvos farmacológicos interessantes [6].

A PGE2 é um lípido bioativo que está envolvido numa série de efeitos biológicos diretamente relacionados com cancro e inflamação [15]. A PGE2 pertence à família prostanóide dos lípidos da subclasse dos eicosanóides produzidos pela oxidação de ácidos gordos essenciais de 20 carbonos que são normalmente incorporados na membrana dos fosfolípidos (Figura 4).

Três sintases distintas contribuem para a síntese de PGE2 [23]. Estas enzimas compreendem 3 isoformas que são fortemente reguladas sob várias condições e incluem duas isoformas microsossomais, a prostaglandina E sintase-1 microsossomal (mPGES-1) e a prostaglandina E sintase-2 microsossomal (mPGES-2), e uma isoforma citosólica, prostaglandina E sintase citosólica (cPGES) [20]. A mPGES-1 é induzível por citocinas pró-inflamatórias, e parece ser a isoenzima principal envolvida na biossíntese de PGE2 sob condições inflamatórias [20]. Adicionalmente, a mPGES1 tem sido relatada como estando sobre-expressa em vários tipos de tumores e parece ser fundamental

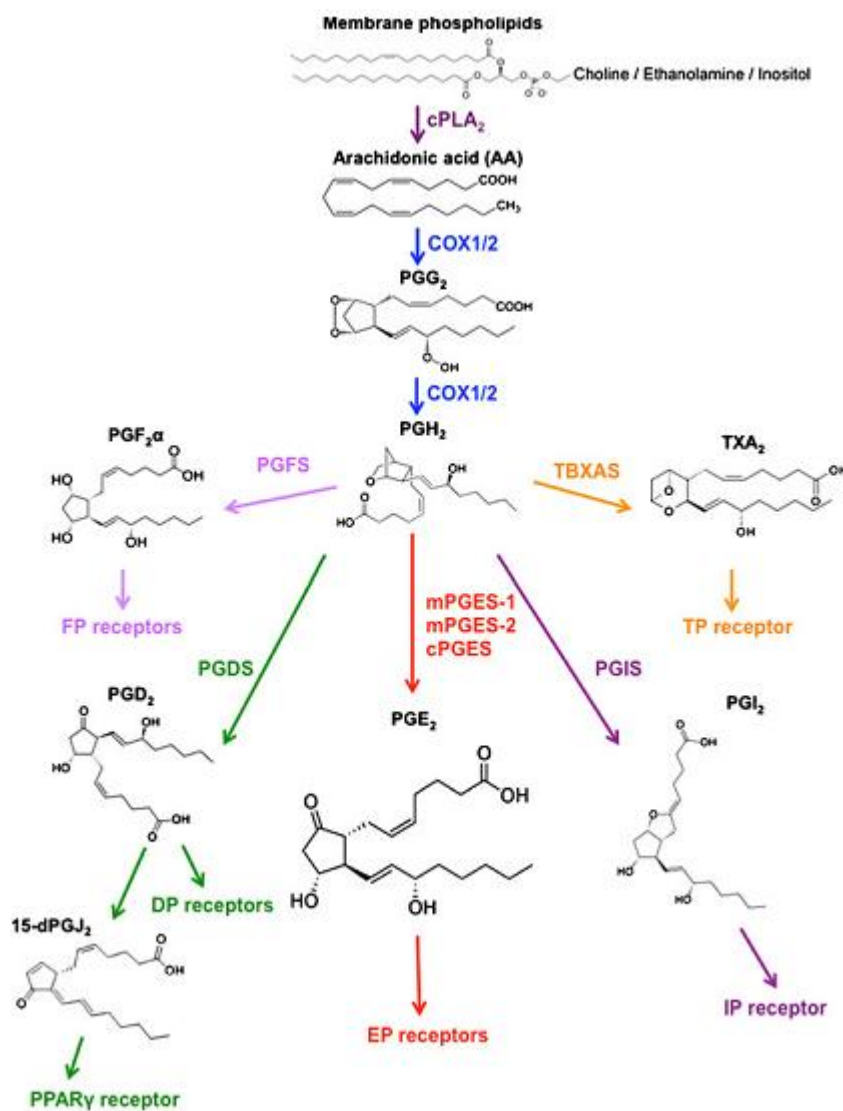


Figura 4 – Via biossintética da PGE2 [21]

para a angiogênese tumoral [20]. Observa-se frequentemente que a mPGES-1 e a COX-2 são induzidas concomitantemente como resposta a vários estímulos pró-inflamatórios originando uma elevação transitória dos níveis de PGE2 [21]. Por outro lado, a mPGES-2 e a cPGES são expressas de forma constitutiva e funcionalmente agrupadas com a COX-1 de forma a manter níveis basais de PGE2 [21].

Por outro lado, os níveis de PGE2, também podem ser regulados pelo seu *turnover* metabólico [21]. Existem duas enzimas chave no catabolismo da PGE2. A 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase (15-PGDH) e a 15-ceto-prostaglandina- Δ 13-redutase (13-PGR), que podem essencialmente anular a atividade biológica da PGE2 [12]. Pensa-se que especialmente, a 15-PGDH, possa desempenhar um papel importante na carcinogénese, uma vez que se observa uma redução significativa da expressão desta enzima em muitos cancros humanos, sugerindo um papel provável desta enzima enquanto supressor de tumores [21]. A resposta inflamatória é um processo complexo que envolve diferentes tipos de células e mediadores inflamatórios, no qual a PGE2 tem um papel de destaque. No entanto, a PGE2 também possui propriedades imunossupressoras que contribuem para a fase aguda da inflamação, facilita a regeneração tecidual e o retorno à homeostasia. O que leva a pensar que as funções biológicas da PGE2 são específicas do tipo de célula onde é expressa e do contexto no qual é produzida [21].

Durante a fase inicial da resposta inflamatória, a PGE2 e outros prostanoides relacionados, tais como a PGI2, atuam como vasodilatadores para facilitar o influxo de neutrófilos, macrófagos, e mastócitos através da corrente sanguínea levando ao inchaço e edema no sítio da infeção ou dano tecidual. Além disso, a PGE2 estimula os nervos sensoriais de forma a aumentar a resposta à dor e atua nos neurónios na área pré-óptica de forma a promover efeitos pirogénicos [21].

De forma paradoxal, a PGE2 exerce controlo sobre uma série de mecanismos que levam à resolução da inflamação e subsequente reparo tecidual. De facto, tem sido demonstrado que a inibição farmacológica da COX-2 nas fases tardias da resposta inflamatória interfere com a recuperação total a nível dos tecidos no fígado, pulmão e cólon [21].

Relação entre inflamação e carcinogénese

Rudolf Virchow, no século 19, foi um dos primeiros a propor o papel da inflamação na carcinogénese ao observar a presença de infiltração de leucócitos em tecidos neoplásicos [24]. Seguindo essa linha de pensamento, nos últimos anos surgiram evidências que suportam a ideia de que a inflamação é um componente importante na progressão tumoral uma vez que muitos cancros têm origem a partir de locais de infeção, irritação crónica e inflamação [17].

A carcinogénese ocorre em três fases: iniciação, promoção, e progressão. A iniciação é um processo irreversível no qual ocorrem danos ao nível do DNA, em células normais, após estas serem expostas a carcinogénios. A promoção é um processo reversível que pode prolongar-se por várias décadas, durante as quais se dá a expansão clonal duma célula iniciada de forma a originar uma lesão focal pré-neoplásica. A progressão representa a última fase da carcinogénese e é irreversível. Esta fase caracteriza-se pela acumulação de mutações que levam à transformação dos clones pré-malignos em lesões malignas que possuem capacidades proliferativas, invasivas e metastáticas [25].

Os eicosanoides, derivados dos ácidos gordos insaturados, são mediadores solúveis que exercem um papel chave na fisiopatologia de várias condições patológicas, incluindo inflamação, trombose e cancro. Sendo que os prostanoídes derivados do AA através da via das COX assumem um papel preponderante [23]. O aumento no interesse do papel dos prostanoídes no contexto do cancro advém de extensos ensaios epidemiológicos que demonstram que a inibição das COX pelos AINEs pode ser benéfica contra o desenvolvimento de neoplasias [26]. Sendo que a inflamação crónica tem sido relacionada com processos de transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogénese e metastização [26]. A verdade é que tem sido observada uma sobre-expressão de COX-2 juntamente com a elevada concentração de prostaglandinas, especialmente a PGE₂, em várias doenças com uma componente inflamatória bem como no cancro [26,27].

Vários fatores físicos e químicos interagem com recetores presentes no exterior da membrana plasmática das células de forma a transmitir sinais para a sobrevivência, proliferação ou morte celular. A transmissão intracelular de tais sinais é mediada por várias biomoléculas que funcionam de forma sequencial sendo que se pensa que a desregulação dessas vias de sinalização intracelular possa promover o desenvolvimento de tumores [12]. A inflamação é um mecanismo fisiológico responsável pela reparação dos tecidos e por isso parece ser contra-intuitivo considerá-la como responsável pela oncogénese. No entanto, a inflamação possui esta dupla natureza com uma vertente patológica que pode promover vários aspetos da tumorigénese tais como proliferação celular, migração, angiogénese e apoptose [15].

Papel das ciclooxigenases no desenvolvimento tumoral

Existem inúmeras evidências que relacionam a COX-2 com a promoção e progressão de tumores, verificando-se um aumento da expressão desta enzima em tecidos tumorais, tanto em modelos animais como em humanos, quando comparados com os restantes tecidos [28]. A PGE2 parece ter um papel especialmente relevante a nível da carcinogénese uma vez que estimula a proliferação, inibe a apoptose, e promove motilidade, invasão e angiogénese das células tumorais [28]. Apesar do papel de destaque da COX-2 parece que a COX-1 também participa no desenvolvimento dos tumores [16]. Usando modelos animais e amostras de adenomas colorretais humanos verificou-se que a COX-2 só é expressa em pólipos com mais de 1 mm enquanto que a COX-1 é expressa em pólipos de qualquer tamanho, dando a indicar de que a COX-1 pode desempenhar um papel importante a nível dos estadios mais iniciais do cancro enquanto que a COX-2 parece ser essencial no desenvolvimento mais tardio [16]. Devido a estas evidências, tem-se então sugerido que a inibição da expressão da COX-2 provoque um efeito anti-cancerígeno, suprimindo o desenvolvimento e invasão das neoplasias [28]. Embora existam fortes evidências sugerindo o envolvimento da COX-2 na iniciação tumoral, o papel da COX-1 ao nível da carcinogénese permanece pouco claro [9].

No contexto da carcinogénese a maior parte da atenção recai sobre a COX-2 porque ao contrário da COX-1, que é amplamente expressa, a sua presença é restrita, em contexto não patológico a um número restrito de tipos celulares e tecidos, mas cuja expressão se torna evidente numa variedade de tipos celulares em tumores e tecidos inflamados [20]. São numerosos os estímulos que têm a capacidade de induzir a COX-2 incluindo citocinas pró-inflamatórias, promotores de tumores, fatores de crescimento, e hormonas [20]. Sabe-se que a sobre-expressão de COX-2 em células malignas está relacionado diretamente com sinais ligados com a sobrevivência celular tais como as funções autócrinas ou parácrinas² de várias citocinas pró-inflamatórias para ativar fatores de transcrição tais como Jak3 (Janus kinase 3), transdutor de sinal e ativação da transcrição 3 (Stat3), fator nuclear kappa b (NF-κB), que funcionam como reguladores positivos da progressão das células cancerígenas [26]. Estas observações levaram então à ideia de que a expressão de COX-2 está associada a situações patológicas tais como o cancro [20].

[2] Sinalização parácrina: tem como alvo apenas as células que estão na vizinhança da célula emissora do sinal. Os neurotransmissores são um exemplo [29].

Sinalização autócrina: apenas afeta as células que são do mesmo tipo celular que a célula emissora. Um exemplo são as células do sistema imunitário [29].

É pouco provável que, apenas a expressão aberrante das COX seja suficiente para iniciar um tumor só por si, no entanto uma sobre-expressão destas enzimas é frequentemente associado com alterações pré-malignas em vários tecidos [9]. Adicionalmente ao seu papel no processo de inflamação crónica, estudos imunológicos demonstraram que as PGs, produtos da via das COX, especialmente a PGE2, interferem com mecanismos anti-tumorais do sistema imunitário, especialmente ao nível dos linfócitos T, controlando o crescimento de células com um potente efeito supressor ao nível do sistema imunitário [21]. Além disso, em tecidos onde a expressão do citocromo P450 é baixa, as enzimas COX têm capacidade de oxidar uma quantidade significativa de xenobióticos, produzindo mutagénios como produtos secundários da síntese das PGs [9]. Estes mutagénios endógenos podem causar danos no DNA das células e atuar como iniciadores de tumores [9].

Ao que parece a COX-2 não só promove o crescimento do tumor, mas pode também provocar outras mudanças no tecido hospedeiro, tal como neovascularização, de forma a auxiliar o crescimento tumoral e conseqüente progressão para outros órgãos [9]. O microambiente tumoral é constituído por um grupo complexo de células, componentes da matriz extracelular, e moléculas sinalizadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas [21]. À medida que o tumor cresce, este recruta diversos fatores que podem alterar a resposta imunitária do hospedeiro em parte explorando as propriedades imunomoduladoras da PGE2 [21]. Por exemplo, Holt et al., demonstraram que em ratos que apresentam tumores, a PGE2 suprime a citotoxicidade e produção de citocinas das células NK através da ativação de recetores EP4 [21]. Estes resultados são suportados pela observação de que a inativação genética ou farmacológica da COX-2 reduz a neovascularização induzida pelo tumor [20].

Relação entre os recetores prostanoídes e a tumorigénese

Pensa-se que os prostanoídes também possam ser essenciais para a progressão do cancro, e concentrações anormalmente altas de prostanoídes, no microambiente celular, tal como PGE2, produzido por tecidos não ou pré-malignos que sobre-expressam enzimas COX, pode afetar a progressão do cancro e os resultados clínicos, tanto quanto uma sobre-expressão endógena de COX [9]. Os recetores dos prostanoídes estão envolvidos em muitos processos patofisiológicos, e têm sido ligados a várias doenças tais como inflamação, aterosclerose e cancro [9]. Por exemplo, sabe-se que a PGE2 tem a capacidade de induzir o EP4, o que resulta numa metastização das células de cancro da mama que envolve um mecanismo que requer células exterminadoras naturais (NK) [9]. Tem sido demonstrado que as células NK expressam os quatro recetores EP, mas a ativação preferencial do EP4 pela PGE2 é responsável pela inibição da migração destas células e secreção de

citocinas, o que compromete as suas funções ao nível do controlo da metastização [9].

Estudos recentes têm demonstrado que a ligação da PGD2 ao recetor DP promove efeitos inibitórios nas funções das células NK [9]. A importância clínica considerável desta prostaglandina no cancro deriva do facto de que o DP é expresso em células NK humanas e a ativação deste recetor pela PGD2 leva à inibição dos efeitos citotóxicos e quimiotáticos e também a uma diminuição da acumulação de citocinas de tipo 1 [9].

Apesar dos diversos estudos que apontam para o papel potencial dos recetores prostanoídes no cancro, ainda está por esclarecer quando e de que forma estes recetores prostanoídes são recrutados durante a formação do tumor e consequente progressão das células cancerígenas, e se estes recetores podem ser um alvo de intervenção para a prevenção e tratamento do cancro [9].

Em combinação com a estimulação da formação de PGE2, os recetores EP são expressos de forma aberrante em múltiplos cancros gastrointestinais (GI) [21]. No cancro colorretal, por exemplo, o EP4 é o subtipo de recetores EP expresso de forma mais abundante nas células cancerígenas, e os seus níveis costumam estar elevados durante a carcinogénese do cólon [21].

É importante realçar que os recetores EP apresentam atividades funcionais altamente específicas do tecido onde são expressas [21]. Por exemplo, tem sido demonstrado que o EP3 induz a expressão da metaloproteinase-9 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células de carcinoma de Lewis no pulmão, sugerindo a sua participação na angiogénese e metástase tumoral [21].

As vias de sinalização *downstream* dos recetores EP consistem de moléculas de sinalização canónicas acopladas a proteínas G tais como cálcio, AMP cíclico, PI3K, vias de sobrevivência celular, e reguladores de transcrição (AKT, ERK, NF- κ B, e beta-catenina) [30]. Vários estudos recentes sugerem que os recetores EP possam estar ligados às principais vias envolvidas no desenvolvimento de cancro tal como angiogénese, apoptose, proliferação celular, metastização, e supressão imune. Levando a indicar que os recetores EP são vitais na inflamação e oncogénese mediadas pelo eixo COX-2/PGE2 [30].

Papel da prostaglandina E2 na inflamação e cancro

A prostaglandina E2 (PGE2) é um lípido bioativo que exerce uma panóplia de efeitos biológicos associados com inflamação e cancro, incluindo proliferação celular, apoptose, angiogénese e vigilância imunológica [21]. Assim sendo, a PGE2 é um fator relevante na biologia tumoral [20].

Parece ser claro a relação entre a PGE2 e o processo inflamatório crónico e patogénese do cancro [21]. O papel da PGE2 no desenvolvimento do cancro GI é mais proeminente,

provavelmente devido à exposição constante a danos alimentares e ambientais e ao papel intrínseco da PGE2 na homeostase tecidual gástrica [21].

No contexto do desenvolvimento do cancro, a PGE2 é geralmente considerada como possuindo uma potente atividade promotora de tumores, promovendo o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas [21]. O efeito protetor da aspirina e outros AINEs na formação de tumores deve-se provavelmente devido à inibição de enzimas COX, o que se traduz numa redução da síntese de metabolitos prostanoídes, especificamente a PGE2 [21].

Papel das plaquetas na tumorigénese

Vários ensaios clínicos randomizados, demonstram que baixas doses de aspirina dadas diariamente causam um efeito de quimioprevenção contra aterotrombose e cancro colorretal (CCR), o que sugere que um aumento da ativação das plaquetas possa estar envolvido no desenvolvimento das duas condições patológicas [31]. Estas observações são consistentes com um efeito inibitório seletivo da aspirina na atividade da COX-1, presente nas plaquetas, e no funcionamento das plaquetas dependente de TXA2 [31].

Sabe-se que as plaquetas representam um elo importante entre a disfunção e/ou danos nos tecidos e a resposta inflamatória inicial, no entanto, uma ativação descontrolada das plaquetas poderá traduzir-se em condições patológicas, tais como aterotrombose e cancro [31]. As plaquetas ativadas podem ter um papel importante na progressão do tumor e metastização por libertarem vários fatores que regulam o processo angiogénico e o crescimento celular [31]. Por exemplo, foi demonstrado que, a Interleucina-1 β (IL-1 β) produzida pela interação das plaquetas com monócitos, contribui para a indução da COX-2 nestas células através dum mecanismo pós-transcrição que estabiliza o mRNA da COX-2 [31]. A formação de TXA2, um produto maioritário da COX-1 nas plaquetas, promove a agregação plaquetária e vasoconstrição, representando um outro mecanismo importante pelo qual as plaquetas podem afetar a tumorigénese [31].

Mecanismos anticarcinogénicos dos Anti-inflamatórios Não Esteróides

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o uso regular de AINEs está associado com um risco reduzido de vários câncros, e por isso tem-se relacionado o uso a longo prazo de certos AINEs com uma diminuição na incidência e mortalidade de muitos câncros [32]. Pensa-se que os AINEs possam ser agentes terapêuticos eficazes contra o cancro, no entanto, um uso regular de AINEs pode levar a efeitos secundários sérios a nível dos sistemas GI, renal e CV o que limita o seu uso difundido com esta finalidade [23]. Vários ensaios *in vitro* e em animais têm demonstrado que os AINEs podem diminuir a iniciação e/ou progressão de vários câncros e pensa-se que este efeito se deva à sua capacidade de inibirem a síntese de PGs a partir do AA pelas enzimas COX [32].

A base biológica que explica o efeito anticarcinogénico dos AINEs ocorre principalmente por 2 mecanismos: a sua capacidade de induzir apoptose aumentando substancialmente os níveis de ácido araquidónico, precursor das PGs; e a sua ação inibitória ao nível das COX, enzima com papel relevante no desenvolvimento de tumores (Figura 5).

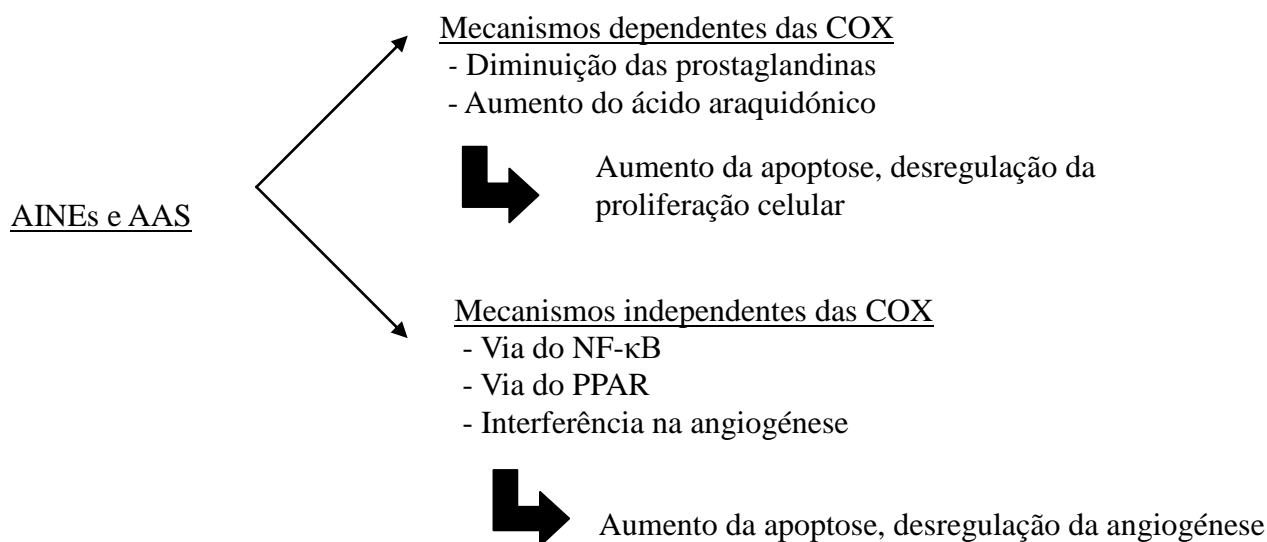


Figura 5 – Esquema dos mecanismos dos AINES, dependentes e independentes das COX [33]

Ainda não se percebe muito bem de que forma é que os AINEs atuam a nível da prevenção do desenvolvimento de tumores no entanto, sabe-se que atuam através de mecanismos tanto dependentes como independentes das COX [33].

Nos mecanismos dependentes das COX, a inibição destas enzimas leva a uma diminuição nos níveis de PGs e outros prostanoides (prostaciclina e tromboxano), o que se reflete numa diminuição dos processos envolvidos na proliferação celular. Consequentemente, estes mecanismos levam a um aumento do nível de ácido araquidónico, o que promove apoptose. Sendo assim, é provável que os AINEs exerçam um efeito pró-apoptótico nas células cancerígenas [33]. A

desregulação da apoptose (morte celular programada) é um passo importante no desenvolvimento de neoplasias uma vez que provoca uma disrupção no equilíbrio entre o crescimento e a morte celular [34].

Além disso, estudos experimentais têm demonstrado que os AINEs conseguem induzir apoptose em tecidos que não expressam as COX dando a indicação que esta classe de fármacos tem a capacidade de atuar através de mecanismos independente das COX. Ainda não se percebe muito bem de que forma estes mecanismos se processam mas pensa-se que possam envolver diferentes vias biológicas incluindo fatores de necrose tumoral (NF-κB), os recetores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR) e seus respetivos ligandos e pensa-se que também possam interferir com o processo da angiogénese, mediada pela PGE₂, fundamental para a progressão do tumor [33].

Apesar de todas as evidências disponíveis sobre o efeito dos AINEs a nível do desenvolvimento tumoral, o uso de AINEs em profilaxia não é utilizado de forma disseminada devido ao risco de ocorrência de efeitos secundários graves como por exemplo, hemorragia gastrointestinal (aspirina) e efeitos cardiovasculares (coxibes) [33]. Uma alternativa para contornar este problema seria a utilização de outros compostos em combinação com os AINEs de forma a obter-se uma maximização do efeito com uma redução da taxa de incidência de efeitos adversos. Adicionalmente ainda se tem de estabelecer a dose e a duração do tratamento. Falta no fundo avaliar a relação risco/benefício do uso de AINEs na profilaxia e tratamento das neoplasias e perceber se a sua utilização em doentes assintomáticos é ou não viável [3].

Tem sido relatada uma maior eficácia na regressão de tumores com a utilização coxibes quando comparados com AINEs não seletivos, isto deve-se provavelmente à sua maior afinidade para a COX-2 uma vez que esta tem maior expressão no desenvolvimento de tumores quando comparada com a COX-1 [34].

Mecanismos dependentes das ciclooxigenases

Os AINEs inibem competitivamente as enzimas COX bloqueando a síntese de prostaglandinas. Estes fármacos podem ser divididos em anti-inflamatórios não-esteróides tradicionais e inibidores seletivos da COX-2. Até agora, os inibidores da COX têm demonstrado não só inibir a iniciação tumoral e progressão acelerada, como também afetam preferencialmente as células cancerígenas [9]. Uma vez que os resultados clínicos continuam a ser pouco claros e nalguns casos até contraditórios é necessário esclarecer qual o mecanismo que faz com que os AINEs sejam capazes de reduzir a incidência e/ou mortalidade do cancro de forma a que seja possível identificar os pacientes que poderiam potencialmente beneficiar desta terapia. Ou seja, em que casos os benefícios desta terapia se sobrepõem ao risco de efeitos secundários [9].

Os AINEs diminuem a síntese de PGs que são modeladores do crescimento celular, pela inibição das COX que catalisam a conversão do AA em PGs e outros eicosanóides [5]. As propriedades anti-cancerígenas dos AINEs são atribuídas principalmente ao bloqueio de mecanismos pró-inflamatórios mediados pela COX-2, que incluem os seus metabolitos tais como a PGE2 [35].

Estudos recentes têm analisado o potencial dos efeitos antiproliferativos decorrentes da inibição da função da PGE2, considerado o metabolito oncogénico da COX-2, através do bloqueio dos recetores eicosanóides (EP) [30]. Uma vez que a inibição das COX acarreta sérios efeitos adversos, começa-se a investigar o potencial de se desenvolver antagonistas dos recetores prostanoídes. Uma vez que se atua a *downstream* das COX, na cascata inflamatória, é possível que se consiga obter os mesmos efeitos benéficos no que diz respeito à intervenção no processo cancerígeno sem se desencadear os efeitos secundários típicos de uma inibição direta ao nível das COX [9].

Mecanismos independentes das ciclooxigenases

Os alvos principais dos AINEs são as enzimas COX que são responsáveis pela produção de PGs e desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostasia, sendo mediadores de reações inflamatórias, e promovendo tumorigénese [17]. No entanto, é possível que efeitos independentes das COX também possam desempenhar um papel importante na inibição do desenvolvimento de cancro pelos AINEs, tais como indução da apoptose e supressão da proliferação [17]. Devido à intensa investigação nesta área, nos últimos anos tem surgido imensa informação que aponta para a existência de múltiplos mecanismos pelos quais os AINEs exercem o seu efeito anticarcinogénico. No entanto, certos mecanismos têm sido apontados como tendo maior relevância no que diz respeito ao efeito desta classe de fármacos na prevenção e tratamento do cancro. Dentre estes mecanismos incluem-se o papel dos radicais livres a nível da sinalização redox e a inativação do fator nuclear kappa-B.

Via do Fator Nuclear Kappa-B

Em células eucarióticas, o NF- κ B atua como um regulador da transcrição de genes que controlam a proliferação celular bem como a sobrevivência, sendo considerado um fator de transcrição anti-apoptótico. Tem sido encontrado uma sobre-expressão deste fator na inflamação e cancro, considerando-se a ativação do NF- κ B um fenómeno característico de uma variedade de tumores, sendo que a ativação desta via está envolvida na etiologia da carcinogénese [36].

A maior parte dos estudos apontam para a inibição das COX na via da síntese das PGs como sendo o principal mecanismo pelo qual os AINEs reduzem a inflamação e risco de cancro. Mas existem evidências de que vários AINEs incluindo a aspirina, também inibem a ativação do NF- κ B e induzem a apoptose de células cancerígenas através dum mecanismo dependente deste fator [27]. A ativação do NF- κ B é um mecanismo de sobrevivência chave das células pré-malignas uma vez que pode bloquear a apoptose pela regulação de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, o fator de transcrição NF- κ B induz a expressão de citocinas e quimiocinas que ajuda a manter um estado inflamatório conhecido por contribuir para a iniciação da carcinogénese. Assim sendo, estudos recentes apontam para a inibição deste via de sinalização como sendo um mecanismo através do qual os AINEs reduzem o risco de cancro por reduzirem inflamação e promoverem apoptose [27].

Num estado inativo, o inibidor do κ B (I κ B) mascara os sinais de localização nuclear das proteínas NF- κ B e mantém-nas isoladas no citoplasma [36]. Em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, há a degradação do I κ B primeiro pela fosforilação mediada pelo aumento da atividade dum cinase I κ B (IKK) e depois por ubiquitinação [36]. Uma vez ativado, o NF- κ B sofre uma translocação para o núcleo onde se liga à região promotora dos seus genes alvo, envolvidos na inflamação, proliferação celular e apoptose o que leva ao desencadear de certas respostas fisiológicas, como por exemplo, uma resposta imune ou inflamatória [36]. Sabe-se que o celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2 induz efeitos anti-tumorais em vários tipos de cancros pela inibição da translocação nuclear do NF- κ B [14].

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) tem sido descrito como funcionando tanto como promotor de tumores, quando expresso em quantidades razoáveis, mas podendo tornar-se num supressor de tumores se presente em quantidades elevadas [24]. A sinalização do TNF α é regulada pela ativação do NF- κ B, que serve como um fator de transcrição para mais de 200 proteínas oncogénicas e relacionadas com a sobrevivência celular [24]. Também se tem observado que quando se bloqueia a ativação do NF- κ B, o TNF α aumentado funciona como uma citocina anti-tumoral e ajuda a induzir apoptose entre as células [24]. Um estudo de Vaish et al. apoia o papel do sulindac enquanto bloqueador da transcrição nuclear do NF- κ B e também propõe o celecoxibe como inibidor da sinalização do NF- κ B [24]. Com a supressão da ativação do NF- κ B nos grupos onde houve co-administração de AINEs, os níveis elevados de TNF α atuam como supressores de tumor. Esta inativação do NF- κ B também poderá ser atingida pelo aumento da ativação do PPAR γ como tem sido observado noutros estudos [24]. Uma diminuição da sinalização do NF- κ B não só regula a expressão genética de vários fatores pró-inflamatórios mas também regula de forma positiva a transcrição de quimiocinas que desempenham um papel importante na sustentação da resposta inflamatória crónica ao recrutarem neutrófilos ao local da lesão [24].

Um dos genes regulados pelo NF- κ B é o gene responsável pela expressão do iNOS [17].

Esta enzima catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina com a produção de NO. O NO é a espécie reativa de azoto responsável por causar alterações na célula relacionadas com reações redox [17]. O NO é um radical livre reativo que forma o radical nitroxilo com aniões superóxido que podem danificar várias biomoléculas, como lípidos, proteínas e DNA levando a toxicidade celular [17]. No entanto, baixas quantidades de NO podem estimular o crescimento celular e prevenir apoptose, sendo que o NO também é um dos sinais extra celulares que regula a apoptose [17]. No entanto, apoptose excessiva, causa atrofia nos tecidos, enquanto que uma quantidade insuficiente resulta numa proliferação celular incontrolada, levando ao desenvolvimento de cancro [17]. Isto pode ser fundamentado por agentes proliferativos como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), que se sabe que é altamente expresso durante a carcinogénese [17]. O PCNA é considerado um marcador positivo para a proliferação celular uma vez que é expresso no núcleo das células durante a fase de síntese de DNA no ciclo celular [17].

Setia et Sanyal, realizaram um estudo onde exploraram os efeitos da indometacina e etoricoxibe contra carcinogénese pulmonar em ratos, induzida por DMBA. Tentando estabelecer a relação entre as COX, NF- κ B, proliferação celular e apoptose. Tendo sido obtidos os seguintes resultados no grupo DMBA: 1) expressão elevada de COX-2, NF- κ B e PCNA e níveis de ROS diminuídos; 2) encontram-se alterados os parâmetros de stress oxidativo e potencial de membrana mitocondrial; 3) aumento da proliferação e diminuição da apoptose, que pode ser explicado por níveis baixos de ROS, iNOS e NO; 4) níveis de COX-1 equivalentes ao do grupo controlo [17].

Observou-se também que o tratamento com os AINEs referidos, tanto pré como pós indução dos tumores, melhorava estes efeitos repondo os níveis dos diferentes marcadores para valores semelhantes aos do controlo e eliminavam a incidência dos tumores. Isto implica para a possível utilidade dos AINEs para a quimioprevenção na tumorigénese pulmonar e a sua inibição e um possível uso de AINEs na prática clínica [17].

Sinalização redox

De uma forma geral, dentre as vias não relacionadas com as PGs tem-se discutido o envolvimento de radicais livres em processos de sinalização celular, chamados de sinalização redox [17]. Estes podem danificar biomoléculas e levar à morte celular quando presentes em altas concentrações, enquanto que em baixas quantidades podem reagir com o DNA, resultando em mutações que podem afetar adversamente o ciclo celular e potencialmente levar ao desenvolvimento de malignidades [17].

Nestes radicais livres incluem-se espécies reativas de oxigénio e azoto (RONS), que levam a stress oxidativo e são mediadores importantes do mecanismo anticarcinogénico dos AINEs.

Enquanto que uma oxidação moderada pode provocar apoptose, um stress mais intenso pode causar necrose [17].

Nomeadamente os ROS possuem um papel importante no que diz respeito à sinalização celular e homeostase, regulando diversos eventos envolvidos na apoptose, diferenciação e ciclo celular [37]. Também se sabe que conseguem acelerar a disfunção e despolarização mitocondrial e tem-se demonstrado que tumores resistentes à quimioterapia têm níveis diminuídos de ROS. Todos estes dados são indicadores de que o stress oxidativo é um mecanismo de ação chave para vários agentes anti-cancerígenos incluindo os AINEs, devido à sua capacidade de induzir apoptose [38].

No entanto, um nível moderadamente elevado de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode iniciar uma sinalização redox num *crossstalk*³ molecular com os seus alvos, tais como a COX-2, NF-κB, e iNOS, o que pode levar à morte celular [17].

Os ROS podem interagir com a via de sinalização do NF-κB de várias formas. De facto, a transcrição de genes dependentes do NF-κB influencia o nível de ROS na célula, e por sua vez, os níveis de atividade do NF-κB também são regulados por níveis de ROS. Dependentes do contexto, os ROS podem tanto ativar como inibir a sinalização NF-κB. Curiosamente, pensa-se que células transformadas usem sinais ROS para estimular a proliferação celular e a progressão tumoral. No entanto, níveis altos de ROS para lá de um certo limiar aumenta a vulnerabilidade das células cancerígenas sofrerem apoptose [14]. Assim sendo, agentes que promovam a formação de ROS ou diminuam o nível de anti-oxidantes têm o potencial de matar células cancerígenas com poucos efeitos associados para as células normais [14].

Diferentes células cancerígenas possuem diferentes níveis basais de ROS e antioxidantes endógenos. Células com características mais agressivas possuem níveis mais elevados de ROS endógenos e precisam desses níveis elevados de ROS de forma a sofrerem apoptose. O stress oxidativo pode desencadear uma resposta pelo reticulo endoplasmático (RE) que através da regulação positiva de genes associados ao stress no RE: CHOP, TRB3 e XBP1 podem promover apoptose. A resposta ao stress pelo RE é um mecanismo importante que medeia a morte celular apoptótica e é usado como estratégia anti-cancerígena. Tem sido reportado por diferentes autores que a resposta ao stress pelo RE pode ser induzida pela produção de ROS [14].

Regulação da apoptose

A apoptose ou morte celular programada pode ser desencadeada por vários estímulos e desempenha um papel fundamental a nível do crescimento celular e regulação da homeostase.

[3] – *Crosstalk*: refere-se ao processo pelo qual um ou mais componentes numa via de transdução de sinais afeta outra [39]

A apoptose é caracterizada por mudanças características a nível da estrutura celular incluindo uma diminuição do tamanho da célula, condensação da cromatina e fragmentação do DNA [40].

A formação de tumores pode dever-se a uma destabilização no balanço entre a morte celular e proliferação, havendo um favorecimento de sobrevivência celular. Pensa-se que os AINEs possam ativar alguns elementos chave das vias apoptóticas. A nível molecular, existem inúmeros genes, moléculas e sinais que estão frequentemente alterados no cancro e alguns destes elementos possuem um papel chave a nível da regulação da apoptose, como é o caso da COX-2. Consequentemente, promover a expressão de proteínas pró-apoptóticas, tais como as caspases e Poli(ADP-Ribose) Polimerase (PARP), e diminuindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a survivina e Bcl poderá ser uma estratégia interessante no que diz respeito ao tratamento do cancro. Existem duas vias apoptóticas: recetores de morte celular (extrínseca) e via mitocondrial (intrínseca) [41].

Inúmeras evidências sugerem que os coxibes inibem a proliferação celular através de um mecanismo independente da COX-2. O mecanismo molecular subjacente à apoptose mediada pelo celecoxibe (clx) parece estar associado com a indução da resposta ao stress pelo RE através do cálcio e com a regulação negativa da proteína anti-apoptótica, survivina. O clx induz a expressão de recetores de morte celular tais como o CD95, sugerindo que há ativação de vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas no desenvolvimento de carcinogénese. A ligação aos recetores de morte celular, desencadeia a via apoptótica ligada a recetores de morte celular. A ativação da via apoptótica mitocondrial depende da libertação do citocromo c e consequente ativação das caspases, que por sua vez cliva o PARP e inibe proteínas anti-apoptóticas, tais como a survivina [14].

Jia-Jun et al. demonstraram recorrendo a células de carcinoma da hipofaringe (FaDu) que a nimesulida, um inibidor seletivo da COX-2, tem a capacidade de *in vitro* inibir o crescimento destas células, por um mecanismo dependente da survivina. A survivina, é um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAP) que é altamente expressa na maioria dos cancros humanos mas não em tecido normal. Esta proteína possibilita que a mitose se desenvolva de forma normal e também está envolvida no processo de apoptose, sendo que a sua função anti-apoptótica é executada pela prevenção da ativação das caspases. Quando comparado com o controlo, os níveis de mRNA e proteínas tanto da survivina como da COX-2 encontravam-se suprimidos após o tratamento com nimesulida. Pelo que se coloca a hipótese de que a nimesulida possa reduzir o crescimento de células FaDu, pela indução da apoptose [28].

Valle et al. investigaram os efeitos dos AINEs diclofenac e indometacina em 3 linhas celulares de cancro do ovário: HEY, OVCAR5, e UCI-101. Documentaram que estes fármacos reduzem de forma significativa o crescimento de células de cancro do ovário tanto *in vitro* como *in vivo*, e identificaram o fator de transcrição E2F1 como um mediador deste efeito, em parte por

provocar a paragem do ciclo celular e consequentemente induzindo apoptose. O diclofenac e a indometacina tinham efeitos diferentes a nível do ciclo celular. Enquanto a indometacina induz uma paragem na fase G1, o diclofenac induz uma acumulação de células na fase S e paragem na fase G2. Observou-se também que o tratamento das células com indometacina e diclofenac regula de forma negativa o E2F1. O E2F1 é um fator de transcrição que controla o ciclo celular, pela regulação da expressão de genes necessários para a entrada em fase S. O E2F1 encontra-se sobre-expresso em diferentes cancros e a sua sobre-expressão tem sido normalmente associada com um mau prognóstico. Concluindo, este grupo demonstrou que o diclofenac e a indometacina inibem o crescimento de células de cancro do ovário *in vitro* por pararem o ciclo celular e induzirem apoptose. Pensa-se por isso que os efeitos inibitórios dos AINEs ao nível do crescimento celular sejam mediados em parte por um mecanismo que envolve a regulação negativa do E2F1 [32].

Sistema tiorredoxina

A tiorredoxina (Trx), a tiorredoxina redutase (TrxR), e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato constituem o sistema Trx, que é essencial para a homeostase redox das células por reduzirem proteínas oxidadas; tal oxidação de proteínas pode ocorrer durante o stress oxidativo [38]. O sistema Trx possui uma variedade de funções incluindo a remoção intracelular de espécies reativas de oxigénio (ROS) e atuam de forma a prevenir a morte celular por necrose [38].

A isoforma da Trx, a tiorredoxina-1 (Trx-1) a principal oxirredutase antioxidante intracelular, encontra-se normalmente no seu estado reduzido [39]. Quando uma das suas proteínas substrato é oxidada, a Trx reduz-as, enquanto que no processo ela própria se oxida [39]. Normalmente, a Trx é rapidamente restaurada à sua forma reduzida funcional pela ação da TrxR e de NAD⁺ [39]. Ainda não se percebe muito bem o papel da Trx-1 no desenvolvimento do cancro apesar de se saber que o stress oxidativo e a ativação de vias de sinalização redox são responsáveis por processos de carcinogénese, incluindo o desenvolvimento de cancro da mama [39].

Sendo uma molécula de resposta rápida ao stress oxidativo, a Trx-1 modula vias de sinalização redox com moléculas que sejam sensíveis a processos redox, tais como os fatores de transcrição Ref-1 e NF- κ B, entre outras. O NF- κ B é particularmente sensível a mudanças no sistema Trx cuja oxidação torna o NF- κ B incapaz de se ligar ao DNA [38].

O resultado final destas reações é a inibição do crescimento celular e/ou indução da apoptose [39]. Outra consequência do stress oxidativo é a indução de stress ao nível do retículo endoplasmático, que o liga à inflamação, com implicações significativas para várias patologias incluindo o cancro [40]. Sabe-se que o nível de Trx-1 está sobre-expresso no carcinoma da mama nos humanos quando comparado com tecido mamário normal e tem sido associado com a progressão deste tipo de cancro [38]. Além disso, a sobre-expressão de Trx-1 ou TrxR tem sido

relacionada com resistência à quimioterapia. O que leva a concluir que o sistema Trx é fundamental para a sobrevivência da célula relacionada com o stress oxidativo [38].

Outros mecanismos

Apesar dos inúmeros estudos já realizados o mecanismo específico pelo qual os AINEs exercem o seu efeito anticarcinogénico continua por ser esclarecido. O mais provável é que estes fármacos exerçam as suas propriedades utilizando simultaneamente diversas vias biológicas. No entanto, diferentes mecanismos de ação têm sido associados a certos AINEs em particular.

Para além de uma sobre-expressão de COX-2, a maioria dos cancros demonstram uma ativação aberrante da via de sinalização Wnt/ β -catenina. Tendo em conta o papel fundamental que tanto a PGE2 como a via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenham na carcinogénese colorretal, é dum interesse significativo que estudos recentes tenham demonstrado que a PGE2 aumenta a sinalização Wnt/ β -catenina tanto em células de carcinoma colorretal bem como em células estaminais hematopoiéticas. Até recentemente, estudos a nível de células estaminais do intestino têm sido dificultados pela falta de marcadores. Estudos recentes identificaram uma população de células estaminais marcadas pela expressão de um gene alvo da via Wnt/ β -catenina, o LGR5 – recetores acoplados a proteína G que contém domínios ricos em repetições de leucina. O LGR5 é uma proteína transmembranar com a função de aumentar a capacidade de resposta do Wnt. Al-Kharusi et al. investigaram se a PGE2 poderia regular a expressão de LGR5 em células de adenoma colorretal e se a LGR5 é ou não relevante para a sobrevivência das células do adenoma. Demonstraram assim que a LGR5 tem um papel ao nível da promoção da sobrevivência das células cancerígenas e que a PGE2 tem a capacidade de aumentar a expressão da LGR5. Demonstraram também que a β -catenina pode reprimir a expressão da 15-pgdh, essencial para o catabolismo das prostaglandinas, em linhas celulares de tumores colorretal e que diminuindo a expressão de β -catenina diminui-se os níveis de PGE2. Este grupo sugere que a PGE2 possa estar elevada logo nos estadios iniciais na neoplasia colorretal, quando a β -catenina é primeiramente ativada, ainda mesmo antes da COX-2 estar sobre-expressa, nas células epiteliais, o que poderia explicar o efeito quimiopreventivo de AINEs não seletivos. Pode-se assim especular que os AINEs possam causar a regressão do tumor, pelo menos nalguns adenomas, por bloquearem o efeito de promoção da sobrevivência da PGE2 nas células que expressam LGR5 [41].

Estudos in vitro indicam que os AINEs podem bloquear a proliferação celular resultando na inibição do crescimento celular. A indometacina, um dos AINEs mais comuns, possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e anti-piréticas por inibir de forma não seletiva as duas COX. Apesar de vários estudos terem demonstrado o efeito protetor dos AINEs ao nível do desenvolvimento e

progressão tumoral, o mecanismo molecular pelo qual os AINEs estão envolvidos na inibição da adesão focal e posterior migração das células cancerígenas é ainda pouco claro. Guo et al., desenvolveram um estudo para clarificar o mecanismo molecular pelo qual a indometacina influencia a migração celular em células cancerígenas. Este grupo colocou a hipótese de que a indometacina poderia interferir com vias metabólicas dependentes de cálcio, o que por sua vez, contribuía para bloquear a migração das células cancerígenas. Para testar esta hipótese, examinaram a interação entre a migração celular, mobilização de cálcio, e vinculina (complexos focais) em células cancerígenas. Os resultados obtidos revelam que a indometacina pode de fato inibir a migração de células cancerígenas por influenciarem a mobilização de cálcio e formação de complexos focais [18].

O papel das prostaglandinas no processo de metastização

As metástases, ou seja, a propagação de células malignas a partir dum tumor primário para uma localização distante, posa o maior problema no tratamento do cancro e é maior causa de morte entre os doentes com esta patologia [42,43]. A patogénese do processo metastático é complexa e envolve diferentes processos celulares, tais como, invasão do estroma envolvente e dos vasos sanguíneos do órgão alvo, sobrevivência na circulação, invasão da matriz e, proliferação no interior do parenquima [42]. Recentemente, tem-se enfatizado a importância de mudanças micro ambientais nas células ao redor do tumor para o desenvolvimento metastático [42]. O sucesso do processo de metastização depende da interação favorável das células metastáticas com os mecanismos de homeostasia do hospedeiro [42]. Recentemente, foi proposto um novo mecanismo para a iniciação metastática, que envolve mobilização de progenitores hematopoiéticos da medula óssea via circulação e para os locais alvo da colonização metastática em resposta a fatores hormonais emitidos a partir do tumor primário [42].

Han et al., usando um modelo animal de carcinoma do pulmão, demonstrou que comparado com o controlo, os animais portadores de tumores apresentavam um aumento significativo nos níveis de VEGF, fator estimulante de colónia de macrófagos (M-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF-alfa). Sabe-se que o VEGF desempenha um papel crítico na vasculogénese, angiogénese e metastização e por isso, a sobre-expressão destas citocinas pode portanto ser responsável pelo aumento de metástases. Sabe-se que níveis séricos elevados de M-CSF são um mau prognóstico da taxa de sobrevivência em pacientes de cancro da mama metastático e que o TNF-alfa é uma citocina inflamatória. Os resultados deste estudo são consistentes com estas descobertas sugerindo que a resposta inflamatória pode ser fundamental não só para a iniciação mas também para a manutenção e crescimento de metástases tumorais, sendo que parece que o tumor primário pode alterar o microambiente que o envolve desencadeando uma resposta inflamatória no hospedeiro e depois usando este microambiente alterado para facilitar a metastização. Concluindo, os fatores pró-inflamatórios, recrutados pelo tumor principal possibilitam um ambiente ideal para o desenvolvimento de metástases. O tratamento com celecoxibe, um anti-inflamatório inibidor seletivo da COX-2, neste mesmo estudo, teve efeitos na resposta inflamatória e consequentemente redução nas metástases [42].

A angiogénese refere-se à formação de nova vascularização sanguínea a partir da vasculatura pré-existente e é regulada por um balanço entre fatores pró- e antiangiogénicos, que induzem e inibem a neovascularização [26]. A angiogénese desempenha um papel significante para o crescimento do tumor benigno e para o seu desenvolvimento num processo maligno, uma vez que a formação de novos vasos é fundamental para a progressão do cancro, isto porque, o potencial de

crescimento das células é limitado pela disponibilidade de nutrientes [26]. Um dos fatores principais que contribui para o crescimento tumoral é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que se tem observado que se encontra regulado positivamente em várias neoplasias e é definido como um regulador positivo do crescimento tumoral [26]. No entanto, o VEGF não é o único fator responsável pela metastização tumoral, uma vez que existem muitas outras causas, como por exemplo, desregulação de oncogenes, inflamação, citocinas, quimiocinas, ativação de fatores de transcrição e fatores de crescimento, etc., que também contribuem para a angiogénese tumoral [26]. A prevenção da angiogénese e consequentes metástases são essenciais para controlar o crescimento do tumor e a sua invasão do organismo do hospedeiro [26].

Dentre os 4 membros da família VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D), o VEGF-A desempenha um papel relevante na vasculogénese e angiogénese [26]. Tem-se observado uma expressão elevadamente aberrante de VEGF em vários cancros mas, o mecanismo de ativação de VEGF durante a carcinogénese e a sua repressão pelos AINEs ainda não é muito bem compreendida [26]. Juntamente com o VEGF-A vários outros fatores contribuem para a vascularização tumoral tais como metaloproteinases (MMPs) que são necessárias para quebrar a matriz extracelular (ECM) e também para a libertação de VEGF ligado à membrana, de forma a extrair mais células endoteliais (ECs) para a formação de novos capilares [26]. Muitos estudos têm demonstrado o papel que a ativação das MMPs tem, em aumentar o potencial metastático via angiogénese em vários cancros [26]. Vaish et Sanial, observaram um aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 num modelo de neoplasma colorretal induzido por DMH, enquanto que a sua expressão e atividade eram regulados negativamente com a administração de Sulindac e Celecoxibe sugerindo que estes AINEs podem prevenir angiogénese nos estadios iniciais de CCR através da inibição de MMPs reguladas por sinalização VEGF [26].

A sinalização a partir do VEGF induz a isoforma induzível da óxido nítrico sintase, iNOS, que também tem sido observada na neovascularização de vários tumores [26]. Sabe-se a iNOS produz grandes quantidades de NO a partir da L-arginina [26]. Várias citocinas pró-inflamatórias também podem regular a indução da expressão da iNOS e consequentemente a produção de NO durante a inflamação [26]. Vaish et Sanyal, descobriram que durante a tumorigénese juntamente com a indução de vários fatores pró-angiogénicos e NO, a expressão dos níveis de várias quimiocinas também era elevado [26].

Relação entre inflamação crónica e angiogénese

Sabe-se que estados inflamatórios prolongados nos tecidos podem regular a iniciação de vários tipos de cancro [24]. Ao contrário dos efeitos benéficos da inflamação aguda, a inflamação

crônica tem sido ligada com o desenvolvimento de várias malignidades nas quais uma inflamação localizada prolongada pode originar um aumento da sobrevivência celular, proliferação, supressão da apoptose, invasão, angiogênese e metástase [24]. No microambiente dum tumor sólido, as células tumorais e as células do hospedeiro interagem umas com as outras através da secreção de fatores de crescimento e citocinas (sinalização autócrina) que podem de alguma forma afetar indiretamente as células endoteliais e estromais vizinhas (sinalização parácrina) de forma a promover neovascularização [24]. Um tumor sólido não seria capaz de sobreviver mais de 2-3 mm³ sem um fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes, o que requer a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja angiogênese, na qual estão envolvidas várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas [24]. Tem sido documentado que um aumento da expressão e ativação da COX-2 e consequentemente um aumento da produção de PGs especialmente prostaglandina E2 (PGE2) contribuem para promover angiogênese através do VEGF [24].

Também se observou que a interleucina 1 beta, que é uma citocina pró-inflamatória, é capaz de induzir a expressão de VEGF mas através de mecanismos independentes da COX-2 [24]. Apesar da IL-1 β e da COX-2 se regularem positivamente uma à outra durante a inflamação e carcinogênese, é possível que sigam vias de sinalização diferentes de forma a induzir o mesmo alvo, neste caso o VEGF [24].

A sinalização autócrina e parácrina, de tais citocinas pro-inflamatórias, está envolvida em várias vias de sobrevivência celular que incluem localização nuclear de fatores de transcrição, proteínas anti-apoptóticas e fatores angiogénico [24]. Além das citocinas, as quimiocinas também desempenham um papel importante na manutenção da inflamação localizada através da regulação do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação [24].

Vaish et al. desenvolveram um estudo onde descrevem o papel da inflamação crônica na angiogênese durante o desenvolvimento de CCR quimicamente induzido por dimetil hidantoína (DMH). Explicitando o papel de várias citocinas pró- e anti-inflamatórias, fatores de transcrição e fatores angiogénicos. Também observaram o papel quimiopreventivo de 2 AINEs: sulindac e celecoxibe que demonstraram não só serem eficientes em reduzir a inflamação localizada associada ao adenocarcinoma colorretal bem como possuem propriedades angiostáticas [24]. O grupo DMH apresentava tumores completamente desenvolvidos juntamente com sinais claros de uma rede aberrante de vasos sanguíneos enquanto que nos grupos onde administraram AINEs, o número e tamanho dos tumores encontrava-se significativamente reduzido [24].

Tem sido documentada uma expressão aumentada da citocina pro-inflamatória IL-1 β em várias neoplasias, tais como, cancro do pulmão, carcinoma pancreático, etc., e ratos KO para a IL-1 β demonstram ausência de metastização tumoral sugerindo a sua relevância para a propagação da

inflamação e consequente carcinogénese. De acordo com esta informação verificou-se que o grupo DMH apresentava um aumento da expressão desta citocina. No entanto, a administração de AINEs reduziu de forma significativa a sua expressão. Pensa-se que a regulação negativa da IL-1 β e consequente redução na inflamação se deve à ligação dos AINEs ao recetor da IL-1 β criando um *feedback* negativo para a sua expressão [24].

Juntamente com uma diminuição da sinalização da citocina pro-inflamatória IL-1 β através da ativação do NF- κ B, a presença de iNOS, um proeminente marcador para inflamação localizada, estava aumentada nos grupos DMH, bem como o aumento da produção de NO e L-citrulina [24]. Uma expressão elevada de iNOS está relacionada com a produção de um vasodilatador muito estável, o NO, que ajuda na infiltração de neutrófilos no local da inflamação e desse modo promove neovascularização. Este NO é produzido quando a L-arginina é metabolizada pela enzima iNOS em L-citrulina. No entanto, os AINEs têm capacidade de se ligar ao local de nitrosação da enzima, que é essencial para a produção de NO, bem como a sua libertação, provocando assim uma diminuição na inflamação e suprimindo a progressão neoplásica [24].

Outro marcador importante da inflamação, a enzima COX-2 também se encontrava sobre-expressa no grupo DMH. Isto pode dever-se à regulação positiva devido à expressão elevada de IL-1 β e localização nuclear aberrante de NF- κ B [24]. Juntamente com um aumento da sua expressão também se observou que a COX-2 estava ativada de forma aberrante uma vez que se observou um aumento da produção de PGE₂, através do metabolismo do ácido araquidónico. Este aumento de PGE₂ pode possivelmente ajudar na vasodilatação e neovascularização. Ao passo que a co-administração de celecoxibe (um inibidor específico da COX-2) diminuiu de forma significativa a expressão e consequente ativação da COX-2, a co-administração de sulindac (não específico) parece ter regulado negativamente a atividade da COX-2 através de uma via independente mediada pelo PPAR γ , uma vez que não se observou uma alteração ao nível da expressão de COX-1 [24].

Observou-se um efeito evidente da colaboração da IL-1 β , NF- κ B e COX-2 de forma a aumentar significativamente a expressão de VEGF-A no grupo tratado com DMH. A administração de AINEs teve um efeito negativo ao nível do VEGF-A, ao provavelmente bloquear os seus recetores celulares, VEGFR1 e VEGFR2 [24]. O VEGF-A não é a única molécula responsável pela angiogénese. Outras moléculas tais como metaloproteinases da matriz são necessárias para quebrar a matriz extra-celular para a invasão das células através da libertação de VEGF ligado à membrana. O VEGF ajuda na libertação de NO ligado à membrana de forma a dilatar os vasos e atrair mais células endoteliais (ECs) para a formação de capilares sanguíneos [24].

As citocinas apresentam uma natureza pleiotrópica uma vez que é possível que possam regular a expressão de várias outras citocinas ex: a indução da IL-1 β poderia aparentemente induzir a expressão de IL-2 ajudando a manter o estado de inflamação [24]. No entanto, um aumento da

expressão da citocina anti-inflamatória, IL-4, tem sido associada com a diminuição da expressão da IL-2 através da indução do PPAR γ que é um fator de transcrição dependente de ligando já tendo sido reportado como tendo natureza anti-inflamatória [24].

O estudo de Vaish et al. também suporta esta hipótese uma vez que observaram um aumento da expressão da IL-2 nos grupos tratados com DMH, enquanto que os níveis de expressão de IL-4 e PPAR γ estavam mais elevados nos grupos onde co-administraram AINEs [24]. Além disso, já foi reportado que o sulindac possa ser um ativador do PPAR γ , atuando como seu ligando [24].

Tem sido previamente observado que a IL-2 e interferão (IFN) promovem a sobrevivência celular e o aumento da produção de fatores pro-inflamatórios através da ativação da via Jak/Stat em vários câncros. A ativação de Jak3 através de auto-fosforilação por sua vez ativa o Stat3 que leva à sua localização nuclear e conseqüentemente induz a expressão de vários agentes importantes para a sobrevivência celular. Observou-se uma regulação positiva aberrante das proteínas Jak3 e Stat3 durante o processo de carcinogênese induzido por DMH cuja administração de AINEs contrariava este efeito sugerindo que tanto o sulindac como o celecoxibe podem prevenir inflamação e proliferação celular aberrante como parte da quimioprevenção do cancro através da regulação negativa da ativação da via Jak3/Stat3 [24].

A inibição farmacológica das enzimas COX usando AINEs tem demonstrado diminuir os níveis séricos de VEGF-C nos pacientes [9]. Os estudos já realizados suportam de forma racional o uso de inibidores da COX-2 de forma a reduzir a invasão do tumor e metastização [9], uma vez que se pensa que a COX-2 regula de forma positiva o VEGF juntamente com a PGE2 [26]. No entanto, devido aos efeitos adversos provenientes do uso a longo prazo de inibidores da COX-2, ainda não é muito claro se existe uma janela terapêutica na qual seja possível usar inibidores da COX-2 para reduzir a invasão do tumor e metastização de uma forma segura e eficaz [9]. Além das COX, a PGE sintase tem sido extensivamente estudada pelo seu papel potencial na progressão tumoral [9]. Tal como a TX sintase, que converte PGG2 em TXA2. Pensa-se que uma sobre-expressão deste enzima possa aumentar a motilidade das células cancerígenas [9].

Relação entre prostaglandinas e sinalização linfo-angiogénica

A propagação de células tumorais para os nódulos linfáticos (NLs) é um indicador de prognóstico importante para o estadiamento da doença e assim sendo a vasculatura linfática é considerada uma via importante para a propagação metastática [43]. No entanto, é de realçar que metástases sistémicas podem ocorrer independentemente do envolvimento dos NLs destacando a natureza complexa do processo da doença sistémica [43]. Alguns tumores segregam fatores de crescimento que atuam nos vasos linfáticos de forma a facilitar o processo de metastização [43].

Estes fatores podem induzir linfoangiogénese, isto é, a formação de novos vasos linfáticos a partir de vasculatura pré-existente em regiões dentro ou imediatamente adjacentes ao tumor primário [43]. Estes podem afetar vasos para além do ambiente tumoral e podem modelar respostas imunitárias ao tumor [43]. Apesar das suas implicações clínicas os mecanismos responsáveis pela metastização via a rede linfática ainda não são bem compreendidos [43].

Os fatores de crescimento linfo-angiogénicos incluem dois membros da família de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), VEGF-C e VEGF-D, que atuam através de recetores localizados à superfície celular VEGFR-2 e VEGFR-3 [43]. Existe uma forte associação entre expressão tumoral elevada de VEGF-C ou VEGF-D, aumento da densidade dos vasos linfáticos tumorais e aumento da taxa de metastização para os NLs. Além disso, os eixos de sinalização VEGF-C ou VEGF-D são essenciais para controlar a linfoangiogénese durante o desenvolvimento tumoral [43]. Modelos tumorais demonstram que a inibição desta sinalização pode bloquear o alastramento do cancro através dos vasos linfáticos por restringirem a formação de novos vasos [43]. O fator de crescimento linfo-angiogénico, VEGF-D, promove a propagação do cancro através de rede linfática, um passo crucial na metastização [43]. Níveis elevados de VEGF-D em tumores humanos está relacionado com metástases a nível dos nodos linfáticos e um mau prognóstico, contudo os mecanismos subjacentes à propagação linfo-angiogénica para os nódulos linfáticos permanece elusiva. No entanto, pensa-se que neste processo possam estar envolvidas PGs [43].

Há uma relação estreita entre a produção de factores de crescimento vasculares e as PGs o que leva a pensar que o processo de metastização é facilitado pela presença de PGs no local de crescimento do tumor. Verifica-se que durante a progressão do cancro em certas situações à uma sobre-expressão ou desregulação das COX, o que leva a um aumento dos níveis de PGs [6]. Estudos recentes demonstram que possa haver uma interseção entre a via biológica de produção de prostaglandinas e a sinalização de fatores de crescimento linfo-angiogénicos no controlo do processo de metastização via vasculatura linfática [6]. Esta informação é coincidente com dados clínicos que demonstram que os AINEs podem aumentar a taxa de sobrevivência de doentes com cancro ao reduzirem a incidência do cancro e a proliferação de metástases [6]. Pensa-se que as prostaglandinas promovam o crescimento e dissipação das células tumorais por estarem ligadas à formação de novos vasos durante o processo de metastização (Figura 6).

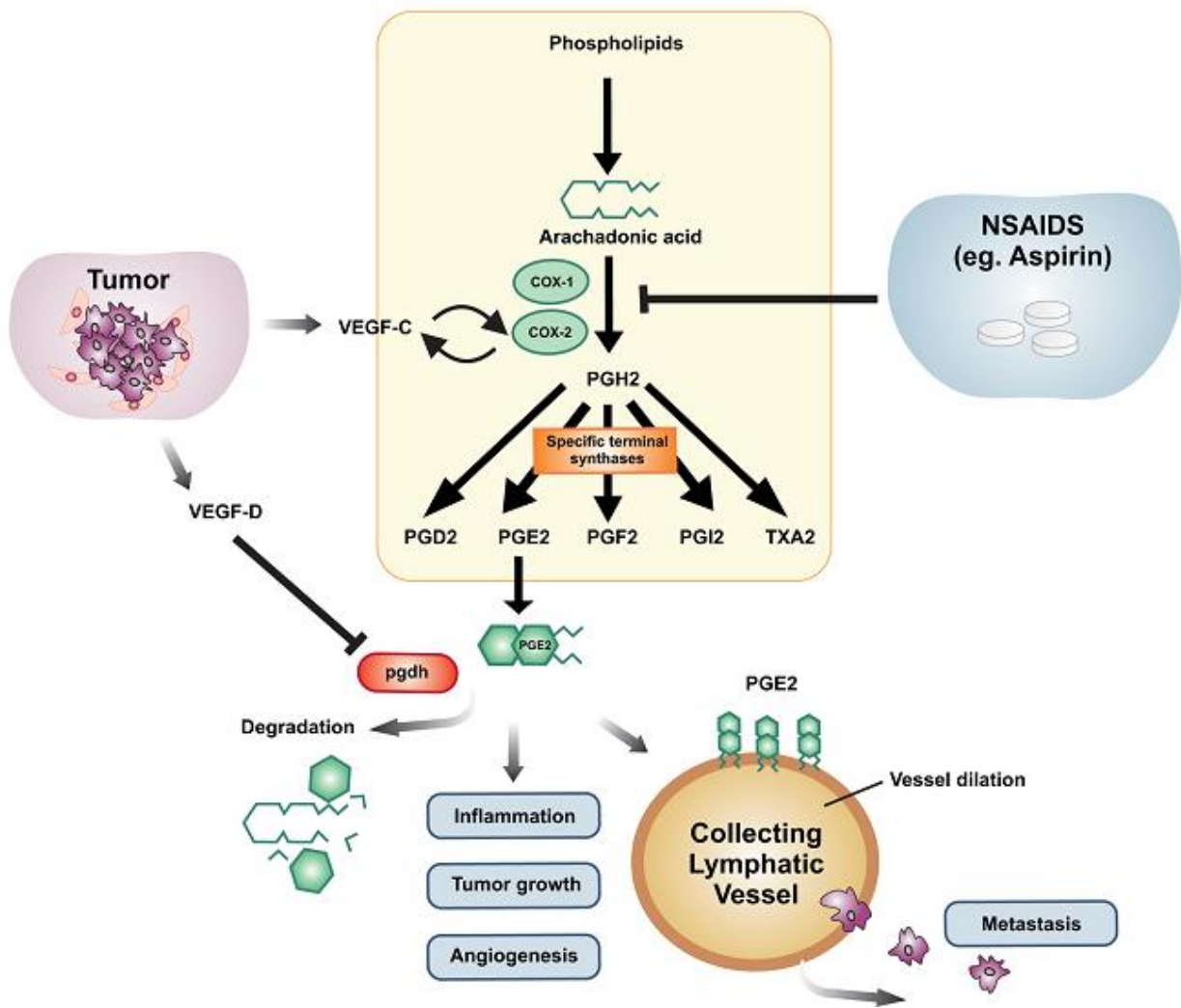


Figura 6 – Representação esquemática da relação entre fatores de crescimento linfo-angiogénicos, a via das prostaglandinas e o processo de metastização [6]

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidónico pela ação das COX sendo que o intermediário instável desta reação, a PGH2 é que posteriormente origina os diferentes tipos de prostaglandinas. A PGE2 é a prostaglandina que está associada com inflamação, crescimento tumoral e angiogénese, e é degradada pela enzima pgdh [43]. Os efeitos das PGs tal como a PGE2 são mediados pela sua ligação aos seus recetores, EP1-4, sendo que o EP3 parece contribuir para a linfoangiogénese tumoral [43].

Sabe-se que o VEGF-D reduz a expressão do gene da pgdh o que leva a uma diminuição da degradação de PGE2. Consequentemente há uma dilatação dos vasos linfáticos que expressam os recetores apropriados para esta PG. Esta dilatação dos vasos linfáticos facilita o processo de metastização [6]. Pensa-se que por isso que a pgdh possa ter um papel enquanto supressor de tumores. Tem também sido relatado que o VEGF-C possa induzir a expressão da COX-2 e vice-versa [6].

A interseção entre as vias metabólicas dos VEGFs e das prostaglandinas é suportada pela observação de inúmeros mediadores inflamatórios tais como PGs no local de crescimento de tumores [6]. A actuação terapêutica a este nível assenta na utilização de AINEs (ex: aspirina) de forma a limitar a produção de prostaglandinas e assim inibir a vasodilatação que é facilitador da progressão metastática [6]. Verificou-se que níveis elevados de COX-2 estimulam a produção de VEGF-A o que resulta na migração de células endoteliais vasculares [6]. Estudos demonstram uma correlação entre a expressão de COX-2, densidade dos vasos linfáticos e metástase nos nódulos linfáticos isto porque a COX-2 consegue de alguma forma regular os níveis de VEGF-C e VEGF-D produzidos dentro e à volta do tumor [6]. O VEGF-D modela níveis de PGs de forma a regular a dilatação dos vasos linfáticos coletores, um efeito bloqueado pelos AINEs [43]. Pensa-se então que as PGs facilitam o processo de metastização por promoverem a vasodilatação. Assim, os AINEs ao bloquearem a produção de PGs exercem um efeito ao nível de proliferação celular, migração, apoptose e angiogénese, que são fatores chave para o desenvolvimento de tumores [6].

Esta interação chave entre os fatores linfo-angiogénicos e as PGs revela um mecanismo para preparar vasos coletores para a disseminação de células tumorais, e um mecanismo através do qual os AINEs reduzem metastização linfo-angiogénica [43]. As PGs derivadas do endotélio são potentes reguladoras da vasodilatação, atenuando ou amplificando a resposta dos vasos sanguíneos de forma a modelar o tonus vascular durante estados normais e patológicos [43].

Os AINEs são normalmente usados para o tratamento da doença inflamatória e sabe-se que têm efeitos a nível do desenvolvimento e propagação de tumores, contudo o mecanismo antimetastático continua a ser pouco claro [43]. Evidências emergentes sugerem que a sobre-expressão de COX-2 e níveis elevados de PGE2 estão associados com angiogénese tumoral e processos linfo-angiogénicos cruciais para a metastização [43]. Recentemente, o efeito dos AINEs na vasculatura linfática tem sido avaliado, demonstrando-se que o tratamento com inibidores da COX-2 reduz a linfoangiogénese tumoral, que por sua vez leva a uma diminuição da metastização do tumor [43].

Influência dos AINEs na imunidade de tumores

A ideia de que o sistema imunitário poderia de alguma forma contribuir para o combate aos tumores foi primeiro sugerido por Paul Ehrlich em 1909 [44]. Desde dessa altura, o campo da imunologia de tumores tem tentado desenvolver estratégias de forma a aproveitar o próprio sistema imunitário do hospedeiro para eliminar as células cancerígenas [44].

Sabe-se que os AINEs possuem um efeito imunomodulador a nível de diferentes tipos de células envolvidas na defesa imunitária anti-tumoral. Para além disso possuem a capacidade de potenciar outras estratégias já existentes a nível da imunoterapia [4]. De facto, os tumores possuem mecanismos que atuam de forma a suprimir o sistema imunitário do doente. Pensa-se que os AINEs talvez possuam a capacidade de inverter esta imunossupressão e estimular a imunidade anti-tumoral através de mecanismos dependentes e independentes das COX [4].

Tanto a componente inata como adaptativa do sistema imunitário desempenham funções ao nível de estimular uma resposta imunitária de forma a bloquear o desenvolvimento e progressão de tumores. Como é evidente o tumor possui a capacidade de contornar estas defesas utilizando diferentes estratégias que vão desde de alterações celulares que modulam a expressão do complexo de histocompatibilidade maior até à regulação de mediadores inflamatórios, uma vez que a inflamação crónica é um cenário favorável ao desenvolvimento de tumores [4].

Tanto no processo inflamatório como na carcinogénese estão envolvidas citocinas e PGs que são resultado da indução da COX-2. Existem evidências que apontam para um papel imunomodulador dos prostanoídes derivados da COX-2 principalmente para a PGD₂ e PGE₂ [29].

A PGE₂ em especial é expressa de forma abundante pelas células tumorais e por macrófagos que se infiltram no tumor, atuando especificamente a nível das células T, suprimindo a expressão dos linfócitos T CD4⁺ o que conseqüentemente previne a activação das células CD8⁺ que possuem um efeito anti-tumoral [4].

O consenso geral é de que as células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas, têm a capacidade de sintetizar prostanoídes. No entanto, as células da imunidade adaptativa não parecem possuir esta capacidade. A única exceção parece ser as células T reguladoras que expressam a COX-2 e sintetizam altos níveis de PGE-2. Apesar de algumas células do sistema imunitário não serem capazes de sintetizar prostanoídes todas elas apresentam uma elevada expressão dos recetores prostanoídes e como tal são altamente sensíveis à presença de prostanoídes [29].

Neste contexto, os AINEs podem ter um impacto importante a nível dos diferentes elementos do sistema imunitário envolvidos na imunidade anti-tumoral especialmente devido ao seu efeito inibitório na sinalização tumoral derivado da via COX-2/PGE₂ [4]. Os AINEs podem atuar a

vários níveis com o resultado de reforçar/aumentar a imunidade anti-tumoral, atuando em sinergia com outras técnicas, como por exemplo: modelar o efeito pro-tumor ou anti-tumor de macrófagos ativados, aumentar a toxicidade das NK, e promover a proliferação/função das CD4+ e CD8+ [4].

Influência dos recetores prostanoídes no sistema imunitário

Tem sido reportado que várias células do sistema imunitário expressam diferentes recetores prostanoídes. No entanto embora quase todas as células do sistema imunitário expressem recetores prostanoídes nem todas estas células possuem a capacidade de sintetizar estes mesmos prostanoídes. Enquanto os recetores prostanoídes são expressos em células tanto do sistema inato como adaptativos (linfócitos B e T), estes apenas são sintetizados em células imunitárias que participem na inflamação (como é o caso dos fagócitos), mas não nos linfócitos B e T [29].

No local da inflamação, as células da imunidade inata vão ser estimuladas a produzir prostanoídes que por sua vez vão atuar noutras células através de sinalização autócrina. Os prostanoídes também vão contribuir, juntamente com outros mediadores inflamatórios, para a regulação da imunidade inata através do sistema adaptativo. Isto demonstra, que através da sinalização parácrina, os recetores dos prostanoídes desempenham um papel crítico em estabelecer a ligação entre a resposta imunitária inata e adaptativa [29].

Assim sendo, os recetores prostanoídes aparecem como reguladores chave ao nível do sistema imunitário. Pelo que, os prostanoídes parecem possuir a capacidade de modelar as funções das células envolvidas na resposta imunitária. Principalmente a PGE2 que é reconhecida como sendo o principal prostanoíde sintetizado pelas células do sistema imunitário.

Papel da prostaglandina E2 na imunidade

A PGE2 possui um papel crítico no controlo da imunidade anti-tumoral em parte pela regulação da ativação e propagação de células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSC) [21]. Nos últimos anos, um número de estudos têm demonstrado que a PGE2 pode modular a capacidade proliferativa e efetora das funções das Treg, que têm propriedades imunossupressoras [21]. Estes resultados estimularam a ideia de que inibidores da COX-2 possam ser usados para ultrapassar a imunossupressão induzida pelas Treg [21].

Para que as estratégias imunoterapêuticas no tratamento do cancro sejam bem-sucedidas é necessária uma infiltração eficaz de células imunitárias com atividade supressora no local do tumor [45]. As estratégias imunoterapêuticas podem ser bloqueadas por uma composição desfavorável do meio intratumoral no que diz respeito às células imunitárias: enquanto que as Tregs e MDSCs

reprimem uma intervenção imunitária eficaz e promovem a progressão tumoral, as células exterminadoras naturais (NK) e linfócitos Th CD4+/CD8+ são mediadores potentes da atividade anti-tumoral [45].

Vários fatores inflamatórios são responsáveis pela ativação da resposta imunitária contra os tumores. Por exemplo, o recetor de quimiocinas CXCR3 é expresso preferencialmente na superfície de células NK ou linfócitos Th supressores de tumores e é responsável pelo seu recrutamento quimiotático no tecido tumoral [45]. Uma estratégia de forma a tornar o microambiente tumoral mais propenso à supressão por células Th é a modulação do sistema COX [45]. No meio tumoral estão presentes as duas isoenzimas da COX: a COX-1 constitutivamente expressa e a COX-2 cuja expressão é induzida [45]. A sobre-expressão da COX-2 no local do tumor, está associada com uma diminuição da infiltração de células imunitárias com capacidades supressoras de tumores, pelo que a inibição das COX por sua vez estimula a imunovigilância [45]. Mais ainda, a prostaglandina E2 (PGE2), o produto maioritário da via das COX em tumores, promove o crescimento tumoral em parte por reduzir a atividade das células NK e expandir as MDSCs e Tregs [45].

Bronger et al., demonstraram uma ligação mecânica entre a via das COX e uma redução da infiltração de linfócitos supressores de tumor no cancro da mama através da modulação da libertação intratumoral de quimiocinas [45].

O tumor tem a capacidade de manipular o sistema imunitário de forma a criar um ambiente que promova o seu crescimento, um processo referido como imunoedição [44]. Do ponto de vista terapêutico seria interessante desenvolver abordagens que inibam a habilidade do tumor de utilizar o sistema imunitário de forma a permanecer despercebido e contornar assim as defesas do hospedeiro [44]. Numa fase inicial, as células transformadas dividem-se num tumor em crescimento que eventualmente interfere com as células estromais vizinhas, desencadeando a libertação de sinais pró-inflamatórios que recrutam mediadores do sistema imunitário inato [44]. Isto ativa as células CD4+ naive que por sua vez libertam citocinas inflamatórias, estimulando células T CD8+ naive de forma a expandirem-se em linfócitos T citotóxicos (CTLs) [44]. As células Th CD4+ que apresentam antígenos específicos do tumor e as CTLs acumulam-se no local do tumor primário, onde as CTLs específicas do tumor reconhecem e eliminam células tumorais que apresentem antígenos através da secreção de perforina⁴ e indução da apoptose, enquanto que provocam uma seleção intencional de células tumorais menos imunogénicas [44].

Um importante subconjunto de células T CD4+, as células T reguladoras (Treg), é instrumental na indução e manutenção da tolerância periférica normal e prevenção da auto imunidade.

[4] – Perforina: proteína que forma um poro na membrana plasmáticas das células cancerígenas o que possibilita a entrada de enzimas tóxica, como a granzima [46].

As Treg desempenham um papel central na imunossupressão por inibirem de forma direta muitas células incluindo as células T CD8+. As Treg podem suprimir a proliferação de células T efetoras ativadas por contacto direto e induzir a regulação negativa da transcrição da citocina proliferativa IL2, inibindo a sua expansão clonal. Adicionalmente, as Treg podem induzir a morte direta de células efetoras através da libertação de perforina e granzima. Notavelmente, as Treg podem funcionar de forma a suprimir muitas das defesas do hospedeiro, utilizadas para prevenir a proliferação e progressão do cancro, fazendo do recrutamento das Treg, por tumores em desenvolvimento, um passo crítico na evasão à resposta imune e sobrevivência das células cancerígenas. Vários estudos clínicos e modelos animais de cancro demonstraram que os tumores são capazes de recrutar Tregs, e isto está associado com a progressão da doença em vários tipos de cancro. Vários estudos clínicos e modelos animais de cancro demonstraram que os tumores são capazes de recrutar Tregs, e que este fenómeno está associado com a progressão da doença em vários tipos de cancro [44].

Apesar da relação entre a acumulação de Tregs e a progressão do cancro os mecanismos pelos quais as Tregs induzem a progressão do tumor permanecem pouco claros. Sabe-se que os tumores segregam níveis elevados de fator de crescimento tumoral (TGF-beta) , que se demonstrou *in vitro* que converte células T naive em Tregs. Adicionalmente ao TGF-beta, a COX-2, bem como os seus metabolitos principais, como a PGE2, têm a capacidade de estimular a conversão *de novo* de Tregs a partir de células T CD4+ naive. É de realçar que, têm sido encontrados níveis elevados tanto de COX-2 bem como de PGE2, no local do tumor, com níveis elevados de expressão da COX-2 a serem associados a tumores altamente agressivos. No entanto, apesar de haver estudos que relacionam um aumento da expressão de COX-2 com níveis aumentados de Tregs em cancros, não existem informações claras que providenciem evidências do mecanismo pelo qual isto ocorre [44].

Karavitis et al., providenciam evidências que a sobre-expressão de COX-2 e consequentemente níveis elevados de PGE2 numa linha de células de cancro da mama pouco agressivo, TM40D, aumenta a taxa de metástases no osso, comparáveis com as de uma linha de células de cancro da mama altamente metastática, TM40D-MB. Demonstraram que a sobre-expressão de *cox2* em tumores TM40D altera o seu perfil imune, aumentando a sua capacidade de se metastizar. Além disso, a subsequente expressão de PGE2, pode influenciar o recrutamento de Tregs, e pode explicar o aumento da apoptose de células T CD8+ nos tumores primários que expressam COX-2. Assim coloca-se a hipótese que o tumor possa adquirir uma vantagem seletiva por regular de forma positiva a expressão de COX-2, escapando desse modo a vigilância imune mediada pelas células T e promovendo a progressão metastática do cancro [44].

Um aumento da acumulação de COX-2 ou Tregs no tumor primário está relacionado tanto clinicamente como em modelos laboratoriais num aumento das metástases [44]. Adicionalmente,

vários ensaios clínicos em diversos tipos de cancro têm demonstrado uma relação entre uma sobre-expressão da COX-2 e um aumento do recrutamento de Tregs. A expressão de COX-2 tem sido ligada à progressão do cancro devido ao seu papel em facilitar a expressão de genes pró-angiogénicos e angiogénese, estimulando a proliferação celular e deprimindo o sistema imunitário. Existem evidências de que a COX-2 e subsequente sobre-expressão de PGE₂, resultam num microambiente tumoral que promove o recrutamento de Tregs e a atenuação da resposta imunitária normal. Esta resposta à PGE₂ não é surpreendente uma vez que as Treg expressam os recetores EP2 e EP4 e vários estudos demonstram que a utilização de antagonistas para estes recetores inibem a progressão do cancro. Pensa-se também, que os recetores EP possam estar envolvidos na conversão de Tregs a partir de células T naive, num processo mediado pela PGE₂ [44].

Sabe-se que a COX-2 desempenha um papel importante no que diz respeito a influenciar outras células com capacidades imunossupressoras durante a progressão tumoral incluindo MDSCs. Dados obtidos em diferentes estudos sugerem que existem inúmeras vias pelas quais o eixo COX2/PGE₂ possa influenciar o perfil imunitário do ambiente tumoral. Uma explicação para este facto pode ser devido à influência que a PGE₂ tem na produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento tanto a nível das células cancerígenas bem como nas células imunitárias [44].

Conclusão

É certo que provavelmente os AINEs não venham constituir uma resposta imediata à problemática de encontrar uma cura para o cancro. No entanto, vêm demonstrar que existem vias alternativas que ainda podem ser exploradas.

Considerando o papel central da inflamação e das prostaglandinas no desenvolvimento e propagação do cancro não é de admirar que os AINEs comecem a ser vistos como uma alternativa terapêutica válida no que diz respeito ao combate ao cancro. No entanto, apesar de toda a investigação realizada, continua a não haver um consenso quanto ao uso estabelecido desta classe de fármacos como agentes anti-cancerígenos. Os resultados obtidos em estudos epidemiológicos e em ensaios clínicos tanto em animais como em humanos são por vezes pouco claros e até contraditórios. É premente estabelecer protocolos que padronizem certas variáveis (como o tipo de AINE, a dose ou mesmo a duração do tratamento) que permitam obter resultados concisos e fidedignos que permitam tomar uma decisão racional quanto ao uso do AINEs neste campo.

Falta também definir qual o mecanismo específico pelo qual os AINEs atuam a nível das células tumorais. Sendo que o cancro é uma doença multi-factorial é provável que não exista só uma via biológica que defina o mecanismo de ação destes fármacos. É possível que os AINEs atuem de forma diferente dependendo do tipo de cancro e das células onde vão atuar.

Mais do que tornar os AINEs uma resposta única no combate ao cancro é essencial explorar a ideia de que este possa ser usado em combinação com outras terapêuticas, incluindo o nosso próprio sistema imunitário. Sabendo-se que a via das COX está envolvida na capacidade do tumor evadir as defesas do sistema imunitário seria interessante utilizar os AINEs de forma a estimular o nosso próprio organismo a combater a invasão das células cancerígenas.

Apesar da relação entre o processo inflamatório, e mais especificamente o papel das prostaglandinas, e o desenvolvimento e propagação tumoral já ser bastante claro ainda muito continua por ser esclarecido. Como por exemplo, elucidar o mecanismo específico pelo qual os AINEs são capazes de bloquear o desenvolvimento dos tumores e quais as consequências a longo prazo da sua utilização enquanto agentes antineoplásicos.

Referências Bibliográficas

1. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton, I. Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2008.
2. Mo C, Romero-Suarez S, Bonewald L, Johnson M, Brotto M. Prostaglandin E2: From clinical applications to its potential role in bone-muscle crosstalk and myogenic differentiation. *Recent Pat Biotechnol.* 2012 December ; 6(3): 223–229.
3. Fernández-Calderón M, Betés ibáñez MT. Aspirin in the primary prevention of colorectal cancer. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2012; 35 (2): 261-267.
4. Hussaina M, Javeed A, Ashraf M, Al-Zaubai N, Stewart A, Mukhtarc MM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. *Pharmacological Research* 66 (2012) 7– 18.
5. Rahman M, Selvarajan K, Hasan MR, Chan AP, Jin C, Kim J et al. Inhibition of COX-2 in Colon Cancer Modulates Tumor Growth and MDR-1 Expression to Enhance Tumor Regression in Therapy-Refractory Cancers In Vivo. *Neoplasia* (2012) 14, 624–633.
6. Karnezis T, Shayan R, Fox S, Achen MG, Stacker SA. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: A missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget*, August, Vol.3, No 8.
7. Hyde CAC, Missailidis S. Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *International Immunopharmacology* 9 (2009) 701–715.
8. Algra AM, Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Publicadp Online* Março 21, 2012 DOI:10.1016/S1470-2045(12)70112-2
9. Allaj V, Guo C, Nie D. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell & Bioscience*2013,3:8.
10. Cabral M, Martín-Venegas R, Moreno JJ. Role of arachidonic acid metabolites on the control of non-differentiated intestinal epithelial cell growth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (2013) 1620– 1628.
11. Ota Y, Imai T, Hasumura M, Cho YM, Takami S, Oyamada T et al. Prostaglandin Synthases Influence Thyroid Follicular Cell Proliferation But Not Carcinogenesis in Rats Initiated With N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *TOXICOLOGICAL SCIENCES*127(2), 339–347 (2012) doi:10.1093/toxsci/kfs097
12. Tootle TL. Genetic insights into the in vivo functions of prostaglandin signaling. *Int J Biochem Cell Biol* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.008>

13. Gomez I, Foudi N, Langrois D, Norel X. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* Volume 89, Issue 2, Pages 55-63, August 2013.
14. Lampiasi N, Azzolina A, Umezawa K, Montalto G, McCubrey JA, Cervello M. The novel NF- κ B inhibitor DHMEQ synergizes with celecoxib to exert antitumor effects on human liver cancer cells by a ROS-dependent mechanism. *Cancer Letters* 322 (2012) 35–4.
15. Paul AG, Chandran B, Sharma-Walia N. COX-2-PGE2-EP receptor inflammatory axis: a key player in KSHV associated malignancies. *Transl Res.* 2013 Aug;162(2):77-92. doi: 10.1016/j.trsl.2013.03.004
16. Ferrández A, Piazuelo E, Castells A. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26 (2012) 185–195.
17. Setia S, Sanya SN. Downregulation of NF- κ B and PCNA in the regulatory pathways of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in experimental lung cancer. *Mol Cell Biochem* (2012) 369:75–86 DOI 10.1007/s11010-012-1370-3
18. Guo Y, Chang C, Hsu W, Chiu S, Tsai Y, Chou Y et al. Indomethacin Inhibits Cancer Cell Migration via Attenuation of Cellular Calcium Mobilization. *Molecules* 2013, 18, 6584-6596; doi:10.3390/molecules18066584
19. Hartal DL, Jones Elizabeth. *Essential Genetics: A Genomic Perspective*. 5^a Edição. Jones and Bartlett Publishers; 2011.
20. Alcolea S, Antón R, Camacho M, Soler M, Alfranca A, Avilés-Jurado F. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE. *JLR Papers in Press*, February 4, 2012 DOI 10.1194/jlr.M01969
21. Nakanishi M, Rosenberg D. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* (2013) 35:123–137 DOI 10.1007/s00281-012-0342-8
22. Ikawa Y, Fujino H, Otake S, Murayama T. Indomethacin antagonizes EP2 prostanoid receptor activation in LS174T human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 680 (2012) 16–21.
23. Nathl N, Liu X, Jacobs L, Kashf K. Flurbiprofen benzyl nitrate (NBS-242) inhibits the growth of A-431 human epidermoid carcinoma cells and targets β -catenin. *Drug Design, Development and Therapy* 2013:7 389–396
24. Vaish V, Piplani H, Rana C, Sanyal SN. Angiostatic Properties of Sulindac and Celecoxib in the Experimentally Induced Inflammatory Colorectal Cancer. Publicado online 13 Novembro 2012. *Cell Biochem Biophys* DOI 10.1007/s12013-012-9469-4
25. Gan, F.-F., et al., A novel shogaol analog suppresses cancer cell invasion and inflammation, and displays cytoprotective effects through modulation of NF- κ B and Nrf2-Keap1 signaling

- pathways, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.011>
26. Vaish V, Sanyal SN. Role of Sulindac and Celecoxib in the regulation of angiogenesis during the early neoplasm of colon: Exploring PI3-K/PTEN/Akt pathway to the canonical Wnt/b-catenin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66 (2012) 354–367
 27. Seufert BL, Poole EM, Whitton J, Xiao L, Makar KW, Campbell PT. $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\beta$ and $\text{NF}\kappa\text{B1}$, NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* vol.34 no.1 pp.79–85, 2013 doi:10.1093/carcin/bgs296
 28. Jia-Junet al.: Nimesulide inhibited the growth of hypopharyngeal carcinoma cells via suppressing Survivin expression. *Head & Neck Oncology* 2012;4:7. Doi:10.1186/1758-3284-4-7
 29. Harizi H. The Immunobiology of Prostanoid Receptor Signaling in Connecting Innate and Adaptive Immunity. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 683405, 10pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/683405>
 30. Paul AG, Chandran B, Sharma-Walia N. Concurrent targeting of EP1/EP4 receptors and COX-2 induces synergistic apoptosis in KSHV and EBV associated non-Hodgkin lymphoma cell lines. *Transl Res.* 2013 Jun;161(6):447-68. doi: 10.1016/j.trsl.2013.02.008. Epub 2013 Mar 20
 31. Bruno A, PharmD, Dovizio M, PhD, Tacconelli S, PhD, Patrignani P. Mechanisms of the antitumoural effects of aspirin in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 26 (2012) e1–e13.
 32. Valle BL, D'Souza T, Becker KG, Wood III WH, Zhang Y, Wersto RP. Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs Decrease E2F1 Expression and Inhibit Cell Growth in Ovarian Cancer Cells. *PLoS One.* 2013 Apr 24;8(4):e61836. doi: 10.1371/journal.pone.0061836
 33. Manzano A, Pérez-Segura P. Colorectal Cancer Chemoprevention: Is This the Future of Colorectal Cancer Prevention? *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 327341, 8pages doi:10.1100/2012/327341
 34. Setia S, Sanyal SN. Upregulation of intrinsic apoptotic pathway in NSAIDs mediated chemoprevention of experimental lung carcinogenesis. *Pharmacological Reports* 2012, 64, 615–624
 35. De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Rui C. Effect of Aspirin on Cell Growth of Human MG-63Osteosarcoma Line. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 834246, 6pages doi:10.1100/2012/834246
 36. Jeong JB, Yang X, Clark R, Choi J, Baek S, Lee S-H. A mechanistic study of the proapoptotic effect of tolfenamic acid; involvement of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation. *Carcinogenesis.*

2013 Jul 9. [Epub ahead of print]

37. Kim M-C, Cui F-J, Kim Y. Hydrogen Peroxide Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition and Stemness in Human Malignant Mesothelioma Cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(6):3625-30
38. Yoo M-H, Carlson BA, Gladyshev VN, Hatfield DL (2013) Abrogated Thioredoxin System Causes Increased Sensitivity to TNF- α -Induced Apoptosis via Enrichment of p-ERK 1/2 in the Nucleus. *PLoS ONE* 8(9): e71427. doi:10.1371/journal.pone.007142
39. Woolston CM, Madhusudan S, Soomro IN, Lobo DN, Reece-Smith AM, Parsons SL. Thioredoxin interacting protein and its association with clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Redox Biol.* 2013; 1(1): 285–291. Published online 2013 May 23. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.006
40. el-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, Hassan M. Crosstalk Between Apoptosis and Autophagy: Molecular Mechanisms and Therapeutic strategies in cancer. *Journal of Cell Death* 2013;6 37-55 doi: 10.4137/JCD.S11034
41. Al-Kharusi MRA, Smartt HJM, Greenhough A, Collard TJ, Emery ED, Williams AC et al. LGR5 promotes survival in human colorectal adenoma cells and is upregulated by PGE2: implications for targeting adenoma stem cells with NSAIDs. *Carcinogenesis.* 2013 May;34(5):1150-7. doi: 10.1093/carcin/bgt020. Epub 2013 Jan 24.
42. Han M, Xu J, Bi Y, Jiang M, Xu X, Liu Q et al. Primary tumor regulates the pulmonary microenvironment in melanoma carcinoma model and facilitates lung metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* (2013) 139:57–65 DOI 10.1007/s00432-012-1299-7
43. Karnezis T, Shayan R, Caesar C, Roufail S, Harris NC, Ardipradja K. VEGF-D Promotes Tumor Metastasis by Regulating Prostaglandins Produced by the Collecting Lymphatic Endothelium. *Cancer Cell* 21, 181–195, February 14, 2012 DOI10.1016/j.ccr.2011.12.026
44. Karavitis J, Hix LM, Shi YH, Schultz RF, Khazaie K, et al. (2012) Regulation of COX2 Expression in Mouse Mammary Tumor Cells Controls Bone Metastasis and PGE2-Induction of Regulatory T Cell Migration. *PLoS ONE* 7(9): e46342. doi:10.1371/journal.pone.0046342
45. Cite this article as:Brongeret al.: Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 2012 14:R30
46. Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature.* 2010 Nov 18;468(7322):447-51. doi: 10.1038/nature09518. Epub 2010 Oct 31