

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MARÇO - 2010

***PAPEL DA INFLAMAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
TUMORAL***

-

***POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS INIBIDORES DA
COX-2***

DANIEL LUÍS SEBASTIÃO COSTA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMO	1
ABSTRACT	3
I – O papel da inflamação na carcinogénese	5
1 – Factores inflamatórios chave na carcinogénese	7
a) Citocinas	7
b) Quimiocinas	8
c) NF-kB	8
d) STAT3	10
e) HIF-1 α	10
II – O papel da ciclooxigenase 2 (COX-2) na carcinogénese	12
1 – A cascata da COX	12
2 – A COX-2 na génese tumoral	16
a) Angiogénese	17
b) Efeitos proliferativos e anti-apoptóticos	18
c) Supressão imunitária	19
d) Invasão celular	20
e) Efeitos clínico-patológicos	20

III – Anti-inflamatórios não esteróides como agentes de quimioprevenção	23
1 – Mecanismo de acção	24
2 – Inibidores selectivos da COX-2	25
3 – Uso de inibidores da COX-2 como fármacos antitumorais	26
4 – Evidências dos efeitos anti-cancerígenos dos AINEs	27
a) Cancro colo-rectal	27
a.1) Polipose adenomatosa familiar (PAF)	27
a.2) Adenoma e cancro colo-rectal esporádico	28
b) Cancro da mama	31
c) Cancro da próstata	34
d) Cancro do pulmão	36
e) Cancro da bexiga	38
5 – Inibidores selectivos versus não-selectivos da COX-2: evidências	41
IV – Perfil de segurança dos AINEs e dos inibidores da COX-2	42
V – Alvos alternativos para a inibição das prostaglandinas dependentes da COX durante os estádios precoces da carcinogénese	46
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS DE FUTURAS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – Vias que relacionam a inflamação e a carcinogénese 11
- Figura 2 – Síntese de prostanóides e seus receptores celulares 14
- Figura 3 – AINEs, COX e PGs na carcinogénese 17
- Figura 4 – A COX-2 na carcinogénese 21
- Figura 5 – A expressão da COX-2 em diferentes graus de malignidade em neoplasias da mama, próstata, cólon, pulmão 22
- Figura 6 - Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro do colo-rectal 30
- Figura 7 - Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro da mama 33
- Figura 8- Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro da próstata 35
- Figura 9 - Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro do pulmão 37
- Figura 10 - Meta-análise do risco de eventos cardiovasculares com o uso de inibidores selectivos da COX-2 45

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1 – Potencial papel da COX-2 15
- Tabela 2 – Uso de inibidores selectivos versus não-selectivos da COX-2 contra o cancro colo-rectal, mama, próstata e pulmão 41
- Tabela 3 – Estratégias alternativas para inibição da via de sinalização dependente de COX-PG, evitando/minimizando a inibição sistémica da COX-2 47

ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidónico;

AINEs - Anti-inflamatórios não esteróides;

BBN - Nitrosamina (N-butil-N-(4-hidroxibutil)amina);

CEL – Celecoxibe;

CIS – Carcinoma in situ;

COX – Ciclooxigenase;

CXCR4 – Receptor 4 da quimiocina CXC;

DNA - Ácido desoxirribonucleico;

EGF – Factor de crescimento epidérmico;

HIF- α – Factor induzido pela hipóxia;

I κ B – Inibidor do factor kB;

IL – Interleucina;

MDA – Malondialdeído;

MDH – Malato desidrogenase;

MMP – Metaloproteinases da matriz;

MVD – Densidade de microvasos tumorais;

NF-kB – Factor de transcrição nuclear kB;

NO – Monóxido de azoto;

NOS – Sintetase de monóxido de azoto;

PAF – Polipose adenomatosa familiar;

PCR – Proteína C-reactiva;

PGs – Prostaglandinas;

PSA – Antígeno prostático específico;

STAT3 – Sinal transdutor e activador de transcrição 3;

TAS – Estado antioxidante total;

TGF- β – Factor de transformação do crescimento β ;

TNF- α – Factor de necrose tumoral α ;

TX – Tromboxano;

VEGF – Factor crescimento endotélio vascular.

RESUMO

Embora a mortalidade por doenças crónicas, como as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tenha decrescido substancialmente durante a última metade do século passado, muito por força dos avanços científicos e tecnológicos nas áreas da Medicina e Farmacologia/Terapêutica, apenas agora se começa a assistir a um ligeiro decréscimo da taxa de mortalidade por cancro. Segundo estatísticas da *American Cancer Society*, nos EUA, o cancro é responsável por aproximadamente um quarto das mortes, apenas ultrapassado pelas doenças cardíacas; em 2006, a patologia tumoral foi responsável por cerca de 600 mil mortes; um milhão e meio de cancros foram diagnosticados em 2009. Os dados para Portugal, e Europa em geral, são também desanimadores.

A quimioprevenção é definida como o uso de agentes químicos, naturais ou sintéticos para reverter, suprimir ou prevenir a progressão carcinogénica para carcinoma invasivo.

Os inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2), ou coxibes, são anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), que têm como alvo a COX-2, enzima responsável pela produção de mediadores da inflamação e do processo nociceptivo, como as prostaglandinas. A selectividade para esta enzima reduz os riscos e os efeitos adversos dos restantes AINEs.

Observações pioneiras demonstraram concentrações superiores intratumorais de prostaglandinas em relação ao tecido normal circundante, o que se correlaciona com o facto de estas desempenharem um papel promotor no processo de carcinogénese. Desta forma, os coxibes têm sido vistos como um potencial agente de quimioprevenção, que advém dos seus efeitos anti-inflamatório, anti-proliferativo e pró-apoptótico, anti-metastático, de inibição da angiogénese e de imunomodulação.

O principal objectivo deste trabalho é proceder a uma análise rigorosa da literatura científica relativa aos estudos experimentais, mas sobretudo clínicos, sobre o papel dos

inibidores da COX-2 na quimioprevenção. Pretende-se fazer uma abordagem da possibilidade destes fármacos poderem constituir uma ferramenta terapêutica na prevenção da patologia tumoral, à luz dos estudos disponíveis na literatura e da experiência do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra nesta área, designadamente no carcinoma da bexiga em modelo animal (rato).

Conclui-se que, com base nas evidências actualmente disponíveis, serão necessários estudos experimentais e ensaios clínicos adicionais, sobre os efeitos quimiopreventivos dos inibidores da COX-2, de modo a esclarecer questões como a dose mínima efectiva, a idade de início, a duração da terapêutica e sua população-alvo, bem como a definição de eficácia e segurança dos diferentes fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: cancro, inflamação, ciclooxigenase, inibidores da COX, quimioprevenção

ABSTRACT

Although mortality from chronic diseases, such as cardiovascular disease and stroke, has substantially declined in the last half century, due to the scientific and technological advances in Medicine and Pharmacology / Therapeutics, the mortality rate from cancer has just began taking a slight decrease. According to statistics from the *American Cancer Society*, in the U.S., cancer is responsible for approximately a quarter of deaths, only surpassed by heart disease; in 2006, cancer was responsible for about 600 thousand of deaths; about 1,5 million of new cancer cases were diagnosed in 2009. The data from Portugal and Europe, are also disappointing.

The chemoprevention is defined as the use of chemical, natural or synthetic agents to reverse, suppress or prevent carcinogenic progression to invasive carcinoma.

The cyclooxygenase-2 inhibitors, coxibs, are anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which target the COX-2, enzyme responsible for the production of mediators of inflammation and nociceptive process, such as prostaglandins. The selectivity for this enzyme reduces the risks and adverse effects of the other NSAIDs.

Previous studies showed higher intratumor concentrations of prostaglandins than in surrounding normal tissue, which correlates with the perception that prostaglandins plays an important role in promoting the process of carcinogenesis. Thus, the coxibs have been seen as a potential agent for chemoprevention, which comes from its anti-inflammatory, anti-proliferative and pro-apoptotic, anti-metastatic, angiogenesis inhibitor, immunomodulator effects.

The aim of this work is to undertake a rigorous analysis of scientific literature on experimental studies, but rather clinical about the role of COX-2 in chemoprevention. In order to make an approach to the possibility that these drugs may constitute a therapeutic

agent in the prevention of cancer, in light of the available studies, as well as the experience of the Institute of Pharmacology and Experimental Therapeutics, of the Faculty of Medicine of Coimbra, in this matter, particularly in bladder carcinoma in an animal model (mice).

In conclusion, in keeping with current thinking, it is advisable that clinical trials and additional experimental studies should be made on the chemopreventive effects of COX-2 in order to clarify issues such as the lowest effective dose, the age at which to initiate therapy, the optimum treatment duration and its target population, as well as the definition of effectiveness and safety of different drugs.

KEYWORDS: cancer, inflammation, cyclooxygenase, COX inhibitors, chemoprevention

I – O papel da inflamação na carcinogénese

Embora o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico e terapêuticos tenha diminuído a taxa de mortalidade por cancro, este continua a ser uma das principais causas de morte nos países industrializados.

Apenas 5-10% dos cancros são causados por herança de mutações genómicas ou somáticas. Os restantes 90-95% estão associados aos estilos de vida e condições ambientais (Anand *et al.*, 2008). Assim sendo, infecções crónicas, dieta, obesidade, consumo de álcool e tabaco, radiações e poluentes ambientais são considerados alguns dos principais factores de maior risco para a carcinogénese (Belpomme *et al.*, 2007). Um processo que parece ser comum a todos os factores de risco mencionados é a inflamação.

A inflamação consiste numa resposta biológica complexa de homeostasia à agressão (entende-se como agressão qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual), e foi inicialmente caracterizada por Celsus nos seguintes marcadores cardinais: calor, rubor, dor e edema. Mais tarde foi acrescentado o termo impotência funcional.

Existem dois estadios da inflamação: inflamação aguda e inflamação crónica. A inflamação aguda consiste na resposta inflamatória inicial, de curta duração e resulta da activação da imunidade inata; se a inflamação persistir por um longo período de tempo instala-se a inflamação crónica. Embora a inflamação crónica esteja associada a várias patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, doenças pulmonares, doenças neurológicas (Aggarwal *et al.*, 2006), o presente artigo de revisão apenas se concentra no papel da inflamação na carcinogénese.

Há mais de um século atrás já o patologista alemão Rudolph Virchow havia referido que a “inflamação crónica é uma condição promotora tumoral, através do estímulo à proliferação celular” (Virchow, 1863).

De facto, várias linhas de evidência, baseadas nos achados em estudos epidemiológicos em seres humanos ou de estudos moleculares realizados em ratos modificados geneticamente, sugerem que os tumores surgem frequentemente em locais de inflamação crónica e que células inflamatórias estão presentes em biópsias tumorais.

Outras evidências da relação entre cancro e inflamação consistem na presença de células inflamatórias e mediadores inflamatórios (por exemplo, quimiocinas, citocinas e prostaglandinas) em tecidos tumorais, remodelação tecidual e angiogénese, semelhante à encontrada em respostas inflamatórias crónicas, e reparação. (Mantovani *et al.*, 2008)

A progressiva sequência de mutações e alterações epigenéticas relacionadas com o cancro promovem a transformação de células progenitoras cancerígenas pela disrupção de processos chaves envolvidos no controlo celular e na homeostasia. Para além das alterações genéticas, células e mediadores inflamatórios desempenham um papel crucial na progressão e desenvolvimento tumoral (Balkwill e Mantovani, 2001; Coussens e Werb, 2002; Balkwill *et al.*, 2005; Karin, 2006).

O estado inflamatório contribui para o desenvolvimento tumoral através de diferentes mecanismos, incluindo: indução de instabilidade genómica, alterações de agentes epigenéticos e, conseqüentemente, expressão inapropriada de genes, estimulação da proliferação e resistência à apoptose, indução de angiogénese tumoral e remodelação tumoral com conseqüente promoção da invasão e metastização (Mantovani *et al.*, 2008).

O vínculo entre a inflamação e a carcinogénese pode ser visto como consistindo em duas vias: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é activada por eventos genéticos. Estes eventos incluem a activação de vários tipos de oncogenes por mutação, rearranjos cromossómicos ou amplificação, e inactivação de genes supressores tumorais. As células resultantes produzem mediadores inflamatórios e geram um microambiente

inflamatório. Em contraste, na via extrínseca, condições inflamatórias e infecciosas aumentam o risco de desenvolvimento de cancro em certos locais anatómicos.

As duas vias convergem e resultam na activação de factores de transcrição, principalmente o factor nuclear kB (NF-kB), sinal transdutor e activador de transcrição 3 (STAT-3) e factor induzido por hipoxia (HIF-1 α), responsáveis pela indução de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e monóxido de azoto - NO) (Mantovani *et al.*, 2008) (Figura 1).

1 – Factores inflamatórios chave na carcinogénese

Citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos, NO, NF-kB, HIF-1 α e STAT-3, representam as principais moléculas envolvidas na inflamação e cancro (Kundu e Surh, 2008; Mantovani *et al.*, 2008).

a) Citocinas

O factor de necrose tumoral – TNF- α – desempenha um papel importante na carcinogénese. Se concentrações elevadas desta citocina podem matar células endoteliais e células tumorais, em certos modelos tumorais, este estimula os fibroblastos ou o crescimento de células tumorais (Gaiotti *et al.*, 2000). O efeito pró-tumoral do TNF- α pode ser demonstrado a partir de observações de que ratos que não possuíam esta citocina (Moore *et al.*, 1999) ou o seu receptor (Arnott *et al.*, 2004) eram mais resistentes à carcinogénese cutânea. Para além disso, o TNF- α está também envolvido na disseminação tumoral. À semelhança do que se passa com o TNF- α , o papel da interleucina 1 β (IL-1 β) na indução tumoral é controverso: baixas concentrações de IL-1 β induzem uma resposta inflamatória local que determina a activação de resposta imune protectora, elevadas concentrações desta citocina resultam em carcinogénese (Apte e Voronov, 2002).

Outra citocina que tem sido associada à promoção da iniciação e progressão tumoral é a interleucina 6 (IL-6). Tal facto é sugerido pela observação de níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com cancro (Chunge e Chang, 2003) ou em biópsias tumorais (Kai *et al.*, 2005). O papel da interleucina 7 (IL-7) e interleucina (IL-17) na inflamação associada ao cancro está relacionado com a acção desempenhada pelas células T auxiliares no desenvolvimento tumoral.

b) Quimiocinas

Os receptores das quimiocinas e os seus ligandos são os principais responsáveis pela migração leucocitária nas condições de homeostasia, assim como durante a inflamação e carcinogénese. Estes fazem parte dos mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência, motilidade e invasão das células tumorais.

Um exemplo é o receptor de quimiocinas CXCR4, o qual é frequentemente sobreexpresso em células malignas e por diferentes tipos de tumores (cancro colo-rectal, cancro da mama, fígado e esófago) e a sua expressão em tumores primários correlaciona-se com a frequência de metastização linfática (Kaifi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Salvucci *et al.*, 2006).

c) NF- κ B

O factor de transcrição nuclear NF- κ B é o coordenador chave da imunidade inata e inflamação, e tem emergido como um importante promotor endógeno de carcinogénese (Karin *et al.*, 2006). Este factor de transcrição opera tanto em células malignas ou com potencial de malignidade quanto em células inflamatórias. Nestas últimas, por intermédio da via de sinalização do Toll-like receptor (TLR)-MyD88, o factor NF- κ B sinaliza vias mediadas pelas citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Além disso, em células tumorais, o

NF- κ B pode ser activado como resultado de alterações genéticas (amplificação, mutações ou deleção) (Courtois e Gilmore, 2006).

O factor NF- κ B conduz à expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, factores angiogénicos e enzimas, como a COX-2 e a iNOS, importantes para a síntese de mediadores inflamatórios (PGE2 e NO, respectivamente). Em células tumorais e epiteliais expostas a carcinogénios, o factor NF- κ B promove a sobrevivência e a proliferação celular através da activação de genes que codificam proteínas importantes do ciclo celular e da via anti-apoptótica, a invasão, metastização e angiogénese.

De forma semelhante, a maioria dos agentes que promovem inflamação e proliferação activam o factor NF- κ B. Estes incluem endotoxinas, carcinogénios (como o fumo do tabaco), radiações, agentes de quimioterapia, hiperglicémia, promotores tumorais, citocinas inflamatórias (como o TNF- α e a IL-1) e factores de crescimento [por exemplo, factor de crescimento epidérmico (EGF)] (Aggarwal, 2004).

Quando ligado às proteínas I κ B, o heterodímero NF- κ B é enclausurado no citoplasma. A fosforilação das proteínas I κ B em resposta a indutores, como as citocinas, resulta na degradação do complexo e activação do NF- κ B. Como resultado, o NF- κ B migra para o núcleo onde se liga a regiões reguladoras nos genes alvos, promovendo a transcrição de determinados genes entre os quais o gene da COX-2, c-myc, e ciclina D1 (Gilmore, 2003).

A via do NF- κ B é rigorosamente controlada por factores inibidores e activadores que, actuando em diferentes etapas da via, determinam a extensão com que a via do NF- κ B opera como promotor tumoral endógeno. Um exemplo é o TIR8 (também conhecido como SIGIRR), um membro da família do receptor da IL-1 que inibe a sinalização através do TLRs (toll-like receptor) e do receptor da IL-1, sendo altamente expresso na mucosa intestinal. A deficiência no gene que codifica o TIR8 está associada a uma susceptibilidade

aumentada para inflamação intestinal e carcinogénese (Garlanda *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2007).

d) STAT3

O sinal transdutor e activador de transcrição 3, também conhecido como STAT3, é um importante factor de transcrição. O STAT-3 é activado em várias células cancerígenas humanas e representa um ponto de convergência para várias vias de sinalização oncogénicas (Yu *et al.*, 2007).

Este factor de transcrição apoia a oncogénese através de diferentes mecanismos que vão desde a activação de genes cruciais para a proliferação e sobrevivência à angiogénese e metastização. A activação de STAT em células tumorais mostrou aumentar a capacidade dos tumores invadirem o sistema imune, inibindo a maturação de células dendríticas (Wang *et al.*, 2004) e suprimindo a resposta imune (Kortylewski *et al.*, 2005).

e) HIF-1 α

A hipóxia é uma característica que tem sido associada a um decréscimo na resposta terapêutica, a progressão maligna, invasão local e metastização à distância. O factor de transcrição – HIF-1 α - é o maior regulador da adaptação celular ao stresse induzido pela hipóxia, e tem um papel importante na angiogénese e invasão tumoral. O HIF-1 α é sobreexpresso em condições inflamatórias e as evidências acumuladas indicam uma inter-relação entre o NF-kB e HIF-1 α (Rius *et al.*, 2008).

Devido ao papel central da hipóxia na promoção tumoral, a actividade HIF-1 α nas células cancerígenas representa um marcador de prognóstico da progressão tumoral (Mariani *et al.*, 2009; Yohena *et al.*, 2009) assim como um potencial alvo para estratégias terapêuticas (Giaccia *et al.*, 2003).

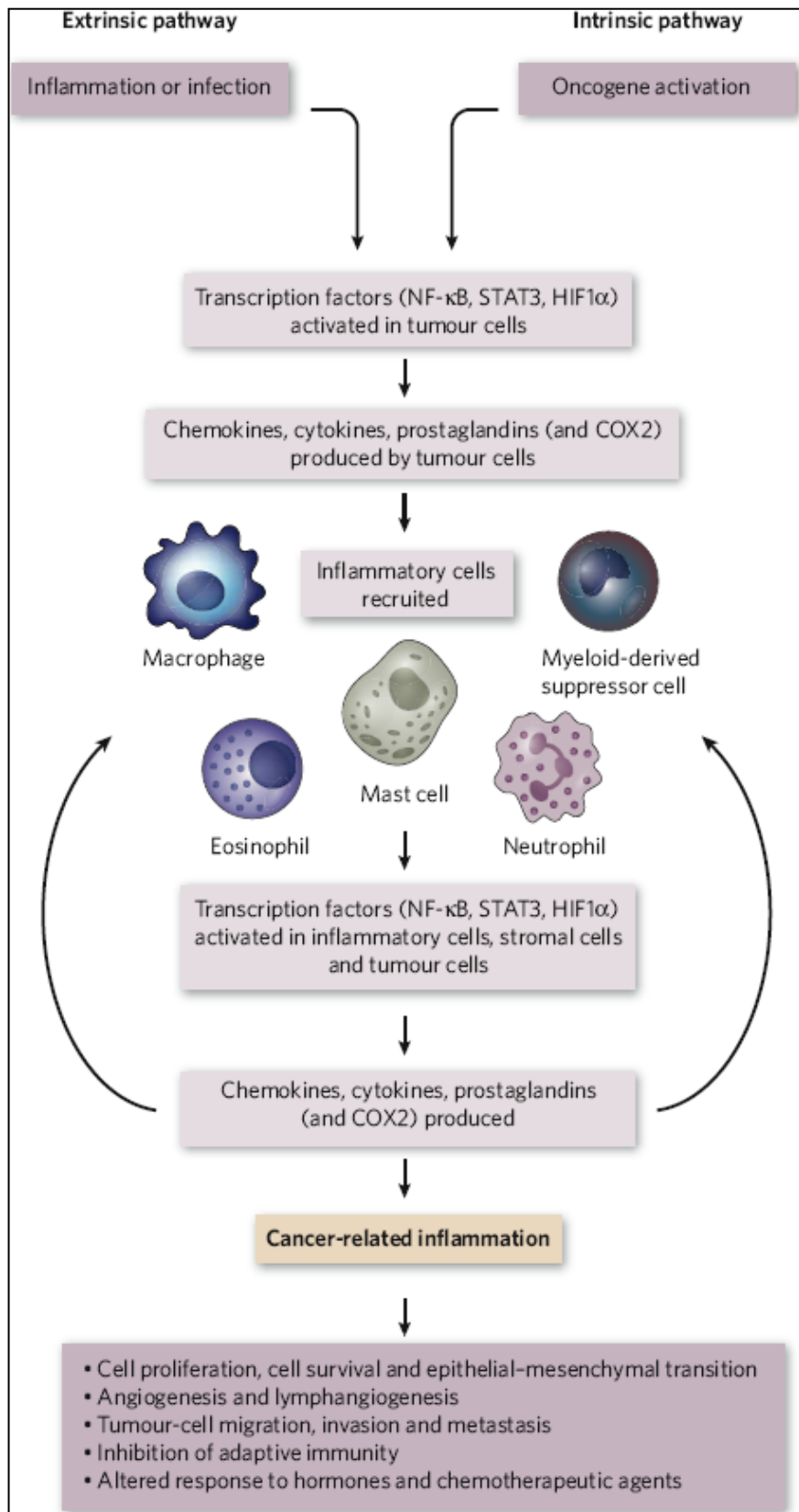


Figura 1: Vias que relacionam a inflamação e a carcinogênese (Retirado de Mantovani *et al.*, 2008)

II – O papel da ciclooxigenase 2 (COX-2) na carcinogénese

1 – A cascata da COX

A ciclooxigenase (COX) é uma enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanóides: que incluem prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos.

As prostaglandinas (PGs) são parte de um grupo denominado eicosanóides, originadas a partir do ácido araquidónico libertado de fosfolípidos de membranas celulares lesadas por acção catalítica da fosfolipase A2. O ácido linoleico é um precursor dietético do ácido araquidónico.

As ciclooxigenases (COXs) e a hidroxiperoxidase catalisam as etapas sequenciais de síntese dos prostanóides (prostaglandinas clássicas e tromboxanos) e as lipoxigenases transformam o ácido araquidónico em leucotrienos e outros compostos (Brenol *et al.*, 2000; Júnior *et al.*, 2007).

Na presença de oxigénio molecular, a COX (PGH2 sintetase) produz o intermediário instável PGG2, rapidamente convertido em PGH2 pela actividade peroxidase da PGH2 sintetase. Isomerases específicas convertem a PGH2 nas várias PGs e TXA2 (Simmons *et al.*, 2004).

Existem três isoformas da COX, a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 (constitucional ou fisiológica), envolvida na manutenção da homeostasia dos tecidos, auxilia na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetar e modulação do fluxo plasmático renal (Klippel *et al.*, 2001). A COX-2 é uma enzima indutível, estando a sua expressão aumentada em processos inflamatórios; é expressa constitutivamente no cérebro, rim, ossos e provavelmente no sistema reprodutor feminino. A sua actividade é importante na modulação do fluxo sanguíneo glomerular e

balanço hidroeletrólítico. A sua expressão é inibida pelos glicocorticóides, o que explicaria os seus efeitos antiinflamatórios (Klippel *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi identificada a COX-3. A sua expressão está aumentada no sistema nervoso central (cérebro e espinhal medula) e pode ser encontrada também no coração e na aorta; os seus produtos, PGD₂, medeiam a dor e a febre, e a sua actividade é inibida pelo acetaminofeno. Alguns autores não consideram a COX-3 como uma entidade distinta mas sim como uma variante da COX-1 (Berenbaum, 2004).

Diferentes tecidos expressam diferentes níveis de COX-1 e COX-2. Embora ambas as enzimas actuem basicamente da mesma forma, a inibição selectiva pode fazer a diferença em termos de efeitos colaterais.

As prostaglandinas têm acção vasodilatadora, sensibilizam os receptores nociceptivos (hiperalgesia) e estimulam os centros hipotalâmicos de termorregulação (Brenol *et al.*, 2000). O tromboxano (TX), predominante nas plaquetas, causa efeitos contrários, como vasoconstrição e agregação plaquetar (Klippel *et al.*, 2001; Júnior *et al.*, 2007).

Os efeitos fisiológicos das prostaglandinas são mediados em parte pelas proteínas G acopladas aos seus receptores. Existem nove diferentes tipos de receptores de prostanóides, oito dos quais (EP1-4, DP, FP, IP, e TP) são classificados de acordo com o prostanóide ao qual se liga com grande afinidade (Breyer *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2004) (Figura 2).

A activação de determinado receptor pode mediar diferentes respostas em diferentes tipos de células (Gardiner, 1986) e alguns deles podem ter um contributo importante na biologia cancerígena.

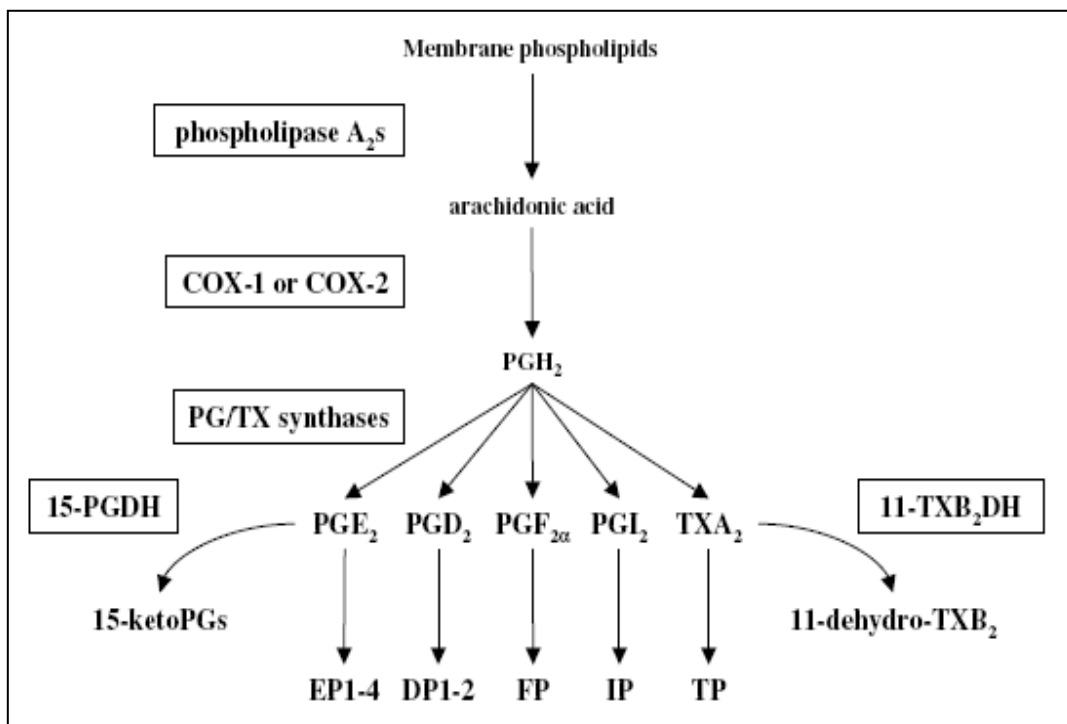


Figura 2: Síntese de prostanoídeos e seus receptores celulares (Retirado de Hull, 2005)

Os mecanismos moleculares que regulam e afectam a expressão da COX-2 e a sua actividade enzimática só agora começam a ser conhecidos. A expressão do gene da COX-2 (localizado no cromossoma 1) é regulada por numerosos mediadores pró-inflamatórios, seja através da sua estimulação ou inibição (Fosslien, 2000; Turini e Dubois, 2002).

Factores de transcrição pró-inflamatórios, como o factor nuclear kB (NF-kB), e NF-IL6, ligam-se às regiões promotoras da COX-2 (Fosslien, 2000; Turini e Dubois, 2002).

A inflamação e a artrite são consequências clínicas conhecidas da actividade da COX-2. Mais recentemente, a COX-2 demonstrou ter um papel fisiológico na regulação das funções do sistema nervoso central – incluindo piroxia, percepção da dor, regulação de reacções inflamatórias no tecido neuronal e até mesmo as funções cerebrais. Actualmente, o potencial papel da COX-2 na esclerose amiotrófica lateral e doença de Alzheimer está a ser investigado, nomeadamente as bases moleculares, clínicas e epidemiológicas (Fosslien, 2000; Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002).

Porventura, os efeitos mais bem estudados são a nível do tracto gastrointestinal. Em contraste com a COX-1, que se pensa que terá um efeito citoprotector do epitélio gastrointestinal, o papel fisiológico da COX-2 é menos claro.

Para além dos efeitos gastrointestinais e no sistema nervoso central, outros potenciais papéis e efeitos da COX-2 podem ocorrer no sistema renal, cardiovascular, hematopoiético/coagulação e sistema reprodutor, e todos eles são, actualmente, objecto de intenso estudo (Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1: Potencial papel da COX-2

Condições malignas
<ul style="list-style-type: none">• Colo-rectal / Polipose adenomatosa familiar• Pulmão (não pequenas células)• Mama• Esofágico• Gástrico• Fígado• Pancreático• Cabeça e Pescoço• Cervical• Gliomas• Próstata• Bexiga
Condições benignas
<ul style="list-style-type: none">• Inflamação• Dor• Esclerose lateral amiotrófica• Doença de Alzheimer• Retinopatia diabética proliferativa• Doença aterosclerótica/cardiovascular• Função renal• Metabolismo ósseo• Integridade gastrointestinal

(Adaptado de Pruthi *et al.*, 2004)

2 – A COX-2 na gênese tumoral

A expressão aberrante ou aumentada da COX-2 tem sido implicada na patogênese de várias doenças, incluindo o cancro. Evidências deste papel derivam de estudos epidemiológicos, farmacológicos *in vitro*, animais *in vivo*, e ensaios clínicos em humanos.

A hiperexpressão da COX-2 pode ser observada numa variedade de diferentes tumores, incluindo o cancro colo-rectal, o cancro do pulmão, gástrico, mama, colo uterino, próstata e bexiga (Fosslien, 2000; Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002). Durante a tumorigênese, o aumento da expressão da COX-2 pode resultar de uma variedade de interações celulares.

Muitos dos principais factores de risco do cancro são capazes de induzir a expressão da COX-2. Importantes indutores da COX-2 são: nicotina e seus metabolitos, nitrosaminas, aminas heterocíclicas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos do fumo de tabaco, ácidos gordos da dieta, radiação ultravioletas, radicais livres, proteínas oncogénicas, factores de crescimento, agentes infecciosos como o *Helicobacter pylori*, papiloma vírus humano (HPV), vírus da hepatite e vírus Epstein-Barr (EBV), hipóxia, hormonas, neurotransmissores, stresse oxidativo e endotoxinas (Harris, 2009).

Como descrito anteriormente, uma variedade de factores de crescimento e oncogenes, tais como NF-kB, NF-interleucina-6, Her2/neu, v-Ha-ras, e Wnt, são conhecidos por se ligarem às regiões promotoras da COX-2 e estimularem a sua transcrição. Também a presença da p53 é conhecida por suprimir a transcrição da COX-2 e, conseqüentemente, a perda ou a mutação da p53 resulta na estimulação da expressão da COX-2 (Subbaramaiah, 1999). A expressão aumentada da COX-2 está associada ao aumento da angiogênese, à diminuição da apoptose, ao aumento da invasão tumoral e à imunossupressão numa

variedade de tumores (Fosslien, 2000; Masferrer *et al.*, 2000; Fosslien, 2001; Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002;) (Figura 3).

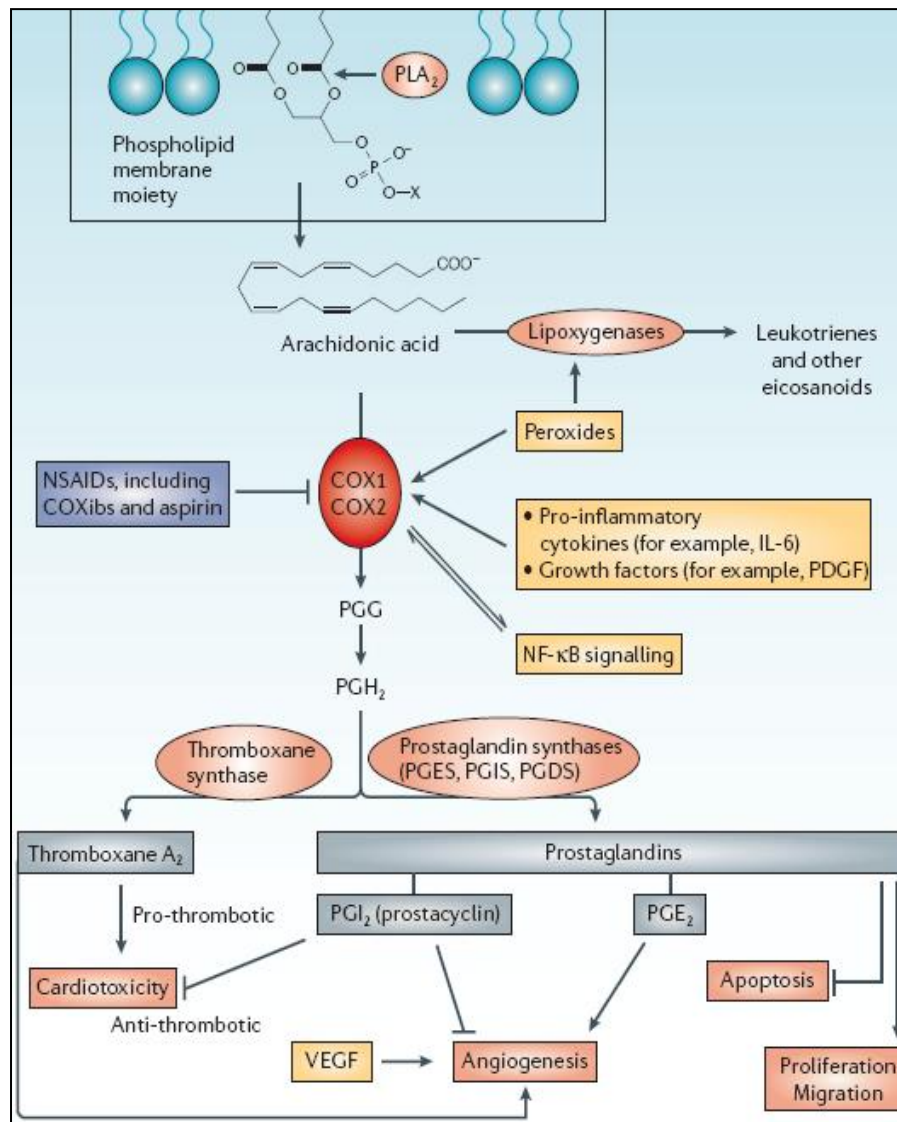


Figura 3: AINEs, COX e PGs na carcinogênese (Retirado de Ulrich *et al.*, 2006)

a) Angiogênese

A angiogênese é uma etapa crucial à progressão e crescimento tumorais. A COX-2 tem um papel importante na regulação da angiogênese, tanto nos tecidos benignos quanto em malignos. O efeito da COX-2 na angiogênese pode ocorrer por diferentes mecanismos: 1) aumento da expressão de mediadores pró-angiogênicos (ex: factor de crescimento do

endotélio vascular – VEGF – e factor de crescimento de fibroblastos); 2) aumento dos produtos da actividade da COX-2 (ex: TXA2, PGE2 e PGI2) que estimulam directamente a neovascularização; e 3) estimulação da actividade de genes anti-apoptóticos, incluindo o bcl-2 e o Akt, que podem promover a proliferação e neovascularização tumoral (Fosslien, 2000; Masferrer *et al.*, 2000; Fosslien, 2001; Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002).

O aumento da expressão da COX-2 e de factores pró-angiogénicos, como o VEGF, resulta no aumento da densidade de microvasos tumorais (MVD). Tal correspondência pode ser encontrada numa grande variedade de tumores, incluindo carcinoma colo-rectal, bexiga, próstata, pulmão e gástrico (Masferrer *et al.*, 2000; Fosslien, 2001; Howe *et al.*, 2001; Friedrich *et al.*, 2003).

b) Efeitos proliferativos e anti-apoptóticos

A desregulação da apoptose é um passo importante para a progressão tumoral. Diversos estudos confirmaram a capacidade dos anti-inflamatórios não esteróides não selectivos e dos inibidores selectivos da COX-2 na indução da apoptose em múltiplos tipos de tumores. Uma correlação entre o aumento da expressão da COX-2 e a inibição da apoptose está patente em diferentes tumores, incluindo gliomas e cancro colo-rectal, mama, esófago, pulmão, pâncreas, próstata, cabeça e pescoço (Fosslien, 2000; Howe *et al.*, 2001; Turini e Dubois, 2002).

Um mecanismo possível de actuação dos inibidores da COX-2 na apoptose envolve as prostaglandinas derivadas da COX, que podem servir como mediadores para inibir a apoptose através da indução de genes anti-apoptóticos, como o bcl-2 (Fosslien, 2000; Cao e Prescott, 2002). Outro possível modo de actuação é a capacidade de a COX-2 degradar o substrato ácido araquidónico (Chan *et al.*, 1998; Cao e Prescott, 2002). O aumento dos

níveis celulares de ácido araquidónico parece induzir a apoptose pela activação da caspase 3 ou pela conversão em ceramidas (Cao e Prescott, 2002).

A COX-2 estimula a proliferação celular por pelo menos 3 potenciais mecanismos: 1) uma via mediada pelo bcl-2; 2) a via do monóxido de azoto, e 3) a via das ceramidas (Cao e Prescott, 2002). Outros potenciais mediadores que podem conduzir à morte celular podem incluir o gene responsável pela apoptose prostática (par-4), a caspase-3, e até as próprias prostaglandinas derivadas da COX-2 (ex: PGE2 e PGI2) têm demonstrado capacidade de aumentar a síntese de DNA e a proliferação celular (Fosslien, 2000; Cao e Prescott, 2002; Turini e DuBois, 2002).

c) Supressão imunitária

Embora possa estar associado a uma resposta protectora durante a lesão celular, o aumento das PGs derivadas da COX-2 nas neoplasias pode levar ao aumento da proliferação das células tumorais. Para além do seu efeito directo sobre a angiogénese, as PGs derivadas da COX-2 podem afectar directamente a bcl-2, o p53 e outros genes mediadores tumorais, aumento das metaloproteínas mutagénicas, e diminuição de citocinas e outros imunomoduladores; a inibição da COX-2 é capaz de restaurar a imunidade celular antitumoral através da diminuição de IL-10 – imunossupressora – e o aumento da IL-12 – imunoestimuladora; as células dendríticas parecem ser as principais reguladoras deste processo (Howe *et al.*, 2001; Cao e Prescott, 2002). As PGs derivadas da COX-2 podem ter uma acção indirecta pela sinalização ou mediação de outros agentes mitogénicos. Por exemplo, investigadores demonstraram a capacidade das PGs derivadas da COX-2 para estimular a actividade de oncogenes (ex: c-myc) e factores de crescimento (ex: factor de crescimento epidérmico) (Howe *et al.*, 2001; Cao e Prescott, 2002).

d) Invasão celular

A COX-2 interfere na mobilidade e adesão celular, tal facto ressalta da constatação de que inibidores da COX-2 diminuem a capacidade invasiva das células tumorais e, conseqüentemente, podem ter um efeito antimetastático (Howe *et al.*, 2001; Cao e Prescott, 2002). O aumento da expressão da COX-2 conduz a um aumento da invasão e adesão tumoral às proteínas da matriz extracelular, talvez pela alteração da dinâmica celular, incluindo o aumento da expressão de cDUU, expressão de metaloproteinase-2, e redução da expressão de E-caderina (Cao e Prescott, 2002).

e) Efeitos clínico-patológicos

Embora uma relação causal não tenha sido comprovada, recentes estudos histológicos e clínicos demonstraram uma correlação entre o aumento da expressão da COX-2 e características clínico-patológicas adversas, incluindo pobre diferenciação, aumento das dimensões do tumor, aumento da metastização ganglionar e à distância, e diminuição da sobrevivência global numa grande variedade de tumores (Steinbach *et al.*, 1996; Fosslie, 2000; Masferrer *et al.*, 2000; Tomozawa *et al.*, 2000; Fosslie, 2001; Howe *et al.*, 2001; Turini e DuBois, 2002; Pruthi *et al.*, 2003).

O papel da ciclooxigenase-2 na carcinogénese está resumido na figura 4.

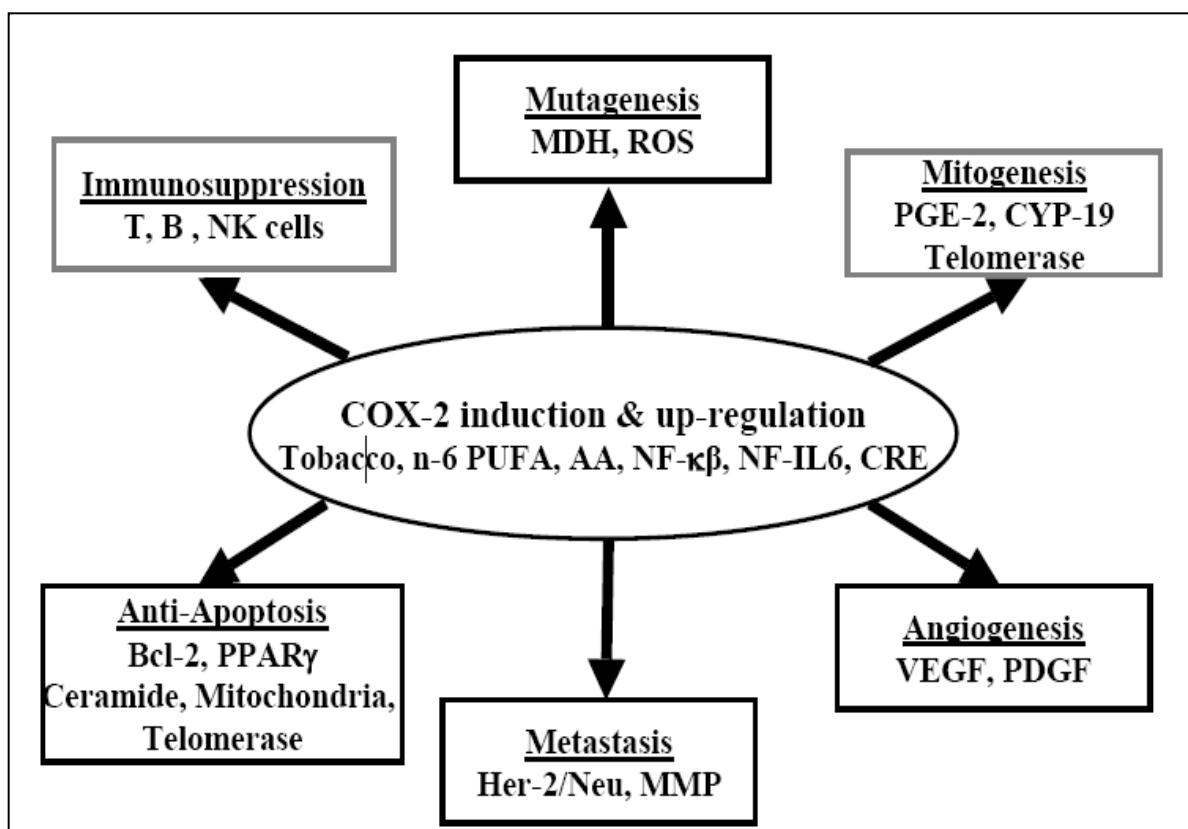


Figura 4 – A COX-2 na carcinogénese (Retirado de Harris, 2009): A sobreexpressão da COX-2 pode iniciar e promover a carcinogénese através de: 1) aumento da produção de MDH (malatodesidrogenase) e outras espécies reactivas de oxigénio; 2) aumento da produção de PGE2 e outras prostaglandinas promotores da proliferação celular; 3) estimulação do factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), resultando na formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese); 4) aumento de produção de metaloproteinases da matriz (MMP), que aumentam o potencial invasivo (metastização); 5) redução da biodisponibilidade do ácido araquidónico necessário à conversão de esfingomiélinea em ceramidas, estimulação do gene Bcl-2 e inibição do gene BAX, resultando na redução da diferenciação celular e em apoptose; 6) redução da proliferação de linfócitos B e linfócitos T, particularmente das células *natural-killer* (NK), limitando a actividade anti-neoplásica (efeito imunossupressor) (Harris, 2007); 7) aumento da telomerase intracelular que promove a proliferação celular, diminuição da apoptose e imortalidade celular (Zhuang *et al.*, 2008).

A COX-2 é normalmente encontrada em lesões pré-malignas como atipias da glândula mamária (Hartmann *et al.*, 2006), pólipos adenomatosos do cólon (Khan *et al.*, 2001), carcinoma *in situ* (Boland *et al.*, 2004; Perrone *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2006), cancro invasivo e doença metastática (Figura 5).

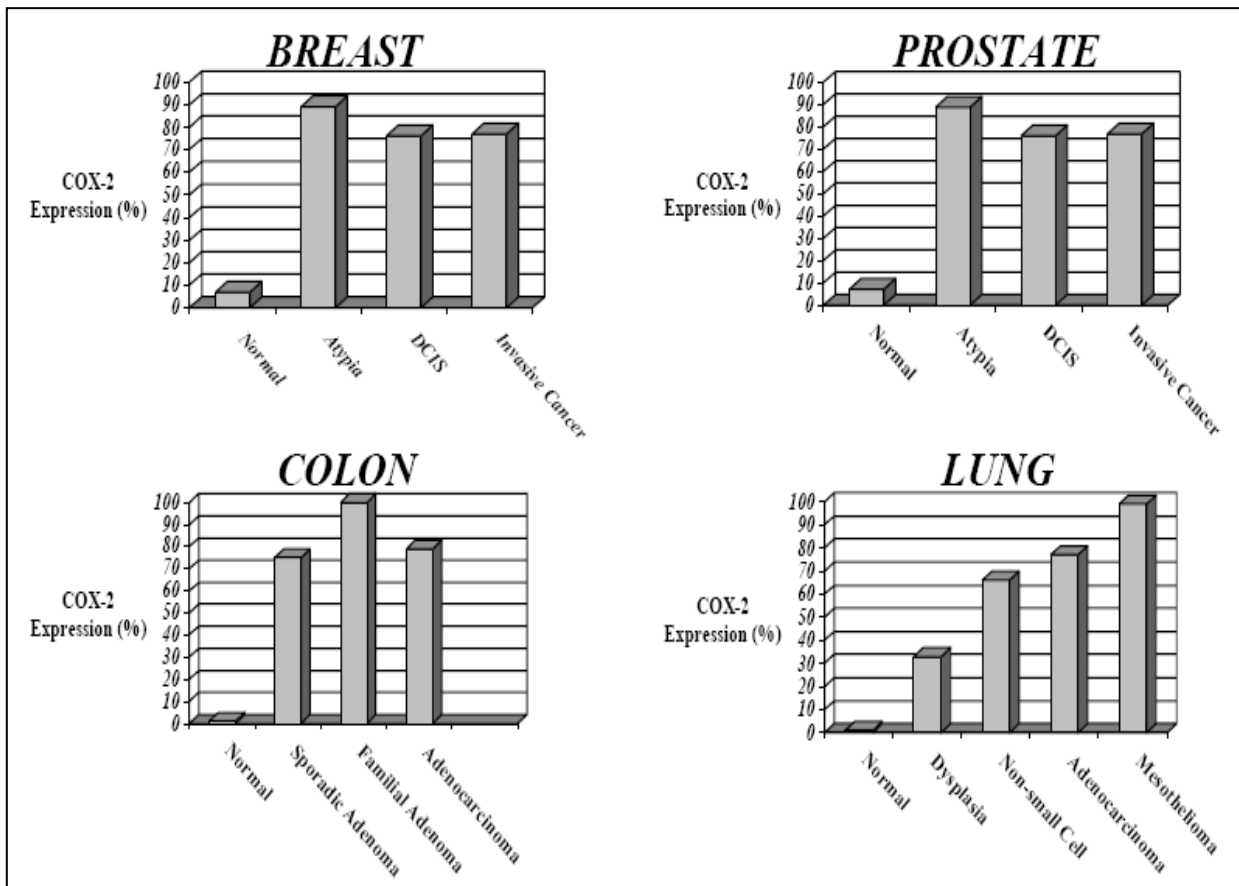


Figura 5 – A expressão da COX-2 em diferentes graus de malignidade em neoplasias da mama, próstata, cólon e pulmão (Retirado de Harris, 2009).

III – Anti-inflamatórios não esteróides como agentes de quimioprevenção

A prevenção cancerígena pode ser classificada em primária, secundária ou terciária (Gustin e Brenner, 2002). A prevenção primária consiste no conjunto de acções que visam evitar a doença na população, removendo os factores etiológicos ambientais e biológicos: ou seja, visam a diminuição da incidência da doença. São exemplos a eliminação da exposição a químicos, radiação, cessação tabágica. A prevenção secundária consiste em um diagnóstico precoce de lesões pré-malignas e lesões tumorais em estádios precoces e o respectivo tratamento imediato; por exemplo, o rastreio do cancro colo-rectal reduz a mortalidade em 15-33%. A prevenção terciária tem como objectivos: 1) limitar a progressão da doença; 2) evitar ou diminuir as consequências ou complicações da doença; 3) promover a adaptação do doente às consequências inevitáveis e 4) prevenir recorrências da doença (Imperatori e Giraldes, 1982).

A quimioprevenção consiste na utilização de agentes farmacológicos ou nutrientes para interferir na patogénese para prevenir a doença. Por exemplo, os agentes quimiopreventivos do cancro são usados para inibir, atrasar ou reverter o processo de carcinogénese. A eficácia da quimioprevenção depende da segurança, eficácia, efectividade, aderência e custos do agente quimiopreventivo proposto.

Uma nova era na quimioprevenção da patologia neoplásica foi iniciada pelo estudo realizado por Kune *et al* (1988), que demonstrou que indivíduos tratados com AINEs para outras indicações tiveram uma significativa redução da incidência de cancro colo-rectal. Mais de trinta estudos epidemiológicos envolvendo mais de um milhão de indivíduos se seguiram ao trabalho original e estabeleceram os AINEs como o protótipo de agente quimiopreventivo contra o cancro colo-rectal. Os achados dos estudos epidemiológicos

vieram ao encontro dos dados obtidos em estudos em animais e *in vitro* (Rayyan *et al.*, 2002).

Desde a introdução do ácido acetilsalicílico (aspirina) no mercado, como o primeiro anti-inflamatório não esteróide (em 1897), que se tem assistido ao desenvolvimento de inúmeros AINEs. Estes constituem uma das classes de fármacos mais prescritos e consumidos, sendo genericamente utilizados no controlo da dor e do processo inflamatório (Vane *et al.*, 1990; Wallace, 1997).

1 – Mecanismo de acção

O principal mecanismo de acção dos AINEs consiste na inibição específica da ciclooxigenase e consequente inibição da conversão do ácido araquidónico (AA) em prostaglandinas.

As AINEs não-selectivos bloqueiam tanto a COX-1 (por acetilação irreversível) como a COX-2 (por inibição competitiva), mas existem variações na inibição das diferentes isoformas em diferentes concentrações de AINE e em diferentes tecidos. No entanto, a aspirina e os restantes AINEs não bloqueiam a via da lipoxigenase, não inibindo, desta forma, a produção de leucotrienos.

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (como a aspirina, indometacina, e ibuprofeno) são genericamente usados como anti-inflamatórios, antipiréticos, analgésicos, sendo a aspirina também efectiva na prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares.

2 – Inibidores selectivos da COX-2

Os efeitos colaterais decorrentes do uso a médio e a longo prazo dos AINEs não-selectivos tradicionais (ulceração e hemorragia gastrointestinal, nefropatia analgésica, caracterizada por necrose papilar, hipertensão arterial e, finalmente, insuficiência renal), conduziram à investigação de novos fármacos que fossem mais eficazes e com maior margem de segurança, os inibidores selectivos da COX-2 – coxibes. Na sequência dessa investigação, foi lançada no mercado (em 1999) a primeira geração de coxibes – celecoxibe e rofecoxibe. Posteriormente surgiram os coxibes da segunda geração.

Os inibidores selectivos da COX-2 não possuem um grupo carboxílico que se encontra na maioria dos AINEs tradicionais e, desta forma, orientam-se de forma selectiva na enzima COX-2.

Os coxibes são utilizados no tratamento da dor aguda (dismenorreia, cirurgia dentária e ortopédica), tratamento de osteoartrite e artrite reumatóide.

3 – Uso de inibidores da COX-2 como fármacos antitumorais

A possibilidade do celecoxibe inibir a COX-2 e, potencialmente, suprimir o crescimento tumoral, sugeriu a aplicação destes agentes anti-inflamatórios no tratamento do cancro. Foram demonstrados efeitos antitumorais dos inibidores da COX-2 numa variedade de cancros, incluindo o cancro do cólon, da mama, pulmão e da próstata (Steinbach *et al.*, 1996; Masferrer *et al.*, 2000; Tomozawa *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2001; Turini e DuBois, 2002; Pruthi *et al.*, 2003). A inibição da COX-2 promove o decréscimo de formação de tumor “de novo” e causa regressão dos focos tumorais existentes. Este efeito acontece por uma combinação de indução de apoptose das células tumorais e diminuição do factor crescimento de endotélio vascular – VEGF - (e uma diminuição correspondente na densidade de microvasos tumorais - MVD) (Subbaramaiah *et al.*, 1999; Howe *et al.*, 2001; Turini e DuBois, 2002).

Os inibidores da COX-2 têm efeitos anti-proliferativos, pró-apoptóticos, anti-metastáticos, inibidores da angiogénese e supressores do sistema imunitário.

Clinicamente, os inibidores da COX-2 encontram-se melhor estudados no cancro colo-rectal e foi sugerido tanto um papel terapêutico quanto quimiopreventivo.

4 – Evidências dos efeitos anti-cancerígenos dos AINEs

a) Cancro colo-rectal

a.1) Polipose adenomatosa familiar (PAF)

A avaliação do efeito dos AINEs no cancro colorectal foi inicialmente verificada em pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF). Num estudo levado a cabo por Giardiello e seus colaboradores, 22 pacientes com PAF receberam 300 mg/dia de sulindac durante 9 meses ou o placebo (Giardiello *et al.*, 1993). Foi observada uma redução do número e do diâmetro dos adenomas colo-rectais nos pacientes tratados com sulindac. Contudo, após o fim do ensaio clínico não se assistiu à regressão adicional das lesões, o que levou os autores a postularem que o tratamento com AINEs não poderia substituir a cirurgia profilática (Giardiello *et al.*, 1993). Doses inferiores de sulindac não foram capazes de demonstrar uma prevenção significativa no desenvolvimento adenomatoso na PAF.

Posteriormente, Steinbach e seus colaboradores, analisaram os efeitos de um inibidor selectivo da COX-2 (celecoxibe) em pacientes com PAF. Num estudo duplamente cego, 77 pacientes foram aleatoriamente distribuídos: tratamento com celecoxibe (100 mg ou 400 mg 2id) ou placebo, durante 6 meses. Os pacientes foram submetidos a colonoscopias no início e no final do estudo e o número e tamanho dos pólipos foram anotados. Após os 6 meses, os pacientes que receberam 400 mg de celecoxibe tiveram uma redução de 28% do número e de 31% do diâmetro dos pólipos. No grupo placebo as reduções foram de 4,5% e 4,9%, respectivamente. A redução no grupo que recebeu 100 mg de celecoxibe foi de 12% e 15%, respectivamente (Steinbach *et al.*, 2000). A incidência de efeitos adversos foi similar nos diferentes grupos (Steinbach *et al.*, 2000).

a.2) Adenoma e cancro colo-rectal esporádico

Os pólipos adenomatosos são consideradas lesões pré-malignas do cancro colo-rectal e os AINEs têm um potencial papel na redução da sua incidência e recorrência (Giardiello *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2003; Sandler *et al.*, 2003). De realçar que a COX-2 é genericamente hiperexpressa nos adenomas e cancro colo-rectal (Eberhart *et al.*, 1994, Sinicrope *et al.*, 1999).

Um estudo demonstrou que, após um longo período de consumo de aspirina nas doses correspondentes àquelas que estão indicadas para a prevenção de doenças cardiovasculares, o risco de diagnóstico de cancro colo-rectal em mulheres foi substancialmente reduzido (Giovannucci *et al.*, 1995).

No entanto, nem todos os estudos apoiam o efeito quimiopreventivo da aspirina. No *Women's Health Study* (Cook *et al.*, 2005), 39876 mulheres saudáveis, com idades ≥ 45 anos, receberam de forma aleatória aspirina (100 mg) ou placebo durante 10 anos. Este estudo de larga escala não demonstrou nenhum efeito da aspirina na incidência de qualquer tipo de cancro (Cook *et al.*, 2005). Os resultados do *Women's Health Study* são difíceis de conciliar com as evidências de estudos epidemiológicos e pré-clínicos, ou com os resultados de ensaios em pólipos adenomatosos, a menos que o efeito quimiopreventivo se torne apenas evidente após 10 anos de tratamento. Em 2003, outros dois estudos randomizados foram publicados demonstrando o papel quimiopreventivo da aspirina na incidência de adenomas e carcinoma colorrectal (Baron *et al.*, 2003; Sandler *et al.*, 2003).

Todos estes estudos foram realizados usando AINEs não selectivos, principalmente a aspirina.

A partir de 1999, novas expectativas cresceram com o uso de inibidores selectivos da COX-2 na prevenção do cancro colo-rectal. Três estudos multicêntricos e internacionais

foram lançados em 1999 e 2000: o *Adenoma Prevention with Celecoxib* (APC), o *APPROVe*, e o *Prevention of Colorectal Sporadic Adenomatous Polyps* (PreSAP) (Bresalier *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; Arber *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006). O objectivo era determinar o efeito dos coxibes na formação de adenomas e avaliar a possibilidade de ultrapassar os efeitos gastrintestinais adversos dos AINEs não selectivos.

Os resultados decorrentes destes estudos sugerem que o celecoxibe é um agente promissor para a prevenção de adenomas colo-rectais. Contudo, devido aos potenciais eventos cardiovasculares, este não poderá ser recomendado rotineiramente. A constatação de um risco dose-dependente, conduziu à procura da diminuição do risco cardiovascular através da utilização de doses inferiores ou outros intervalos de dose (Bresalier *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; Arber *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2006; Bertagnolli *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006).

Em 2009, Harris elaborou uma meta-análise de 32 estudos relativos ao uso de AINEs e o cancro do cólon. Os riscos relativos (RR) desses estudos estão expressos na figura 6.

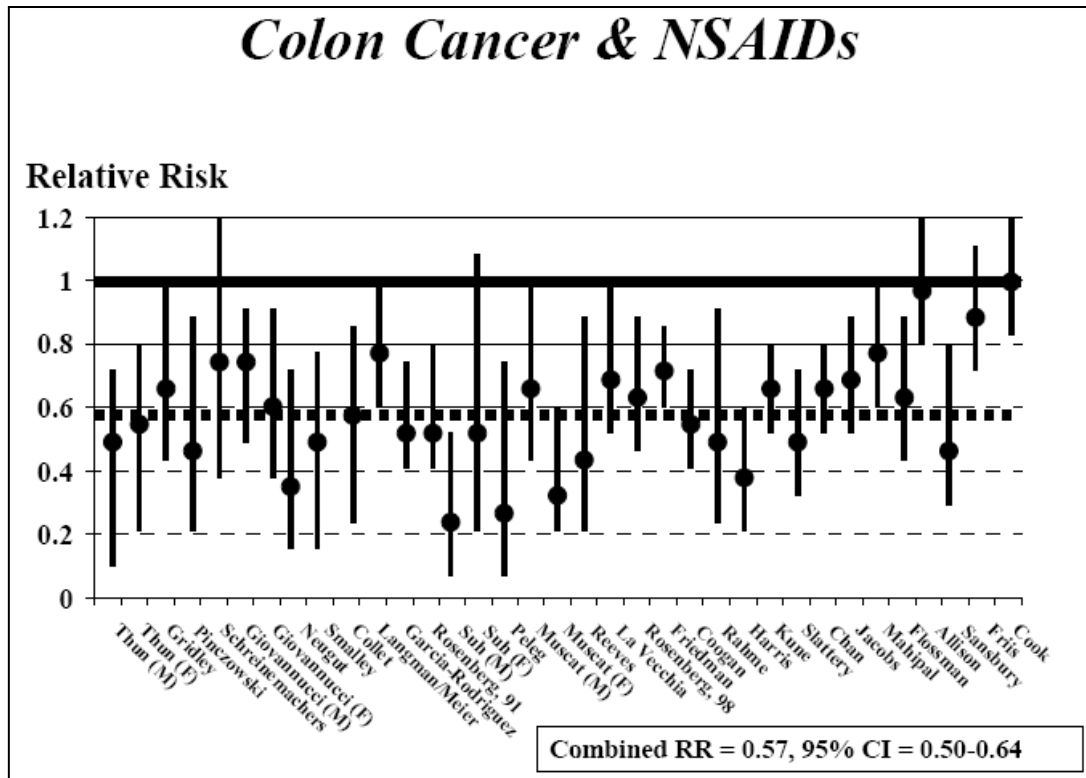


Figura 6 – Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro do cólon (Retirado de Harris, 2009)

Dos 35 estudos analisados, 28 demonstraram um risco relativo inferior a 1,0 e nenhum foi superior a 1,0. O teste de heterogeneidade não mostrou significância ($p < 0,52$) e a análise global demonstrou uma redução de 43% do risco de cancro do cólon com o uso regular de AINEs (Figura 6).

b) Cancro da mama

Apesar de ainda ser pouco claro, investigações epidemiológicas têm sustentado que o uso regular de AINEs pode conduzir a um decréscimo do risco de cancro da mama (Harris, 2002). As evidências sugerem que a actividade dependente da COX-2 é um elemento necessário para os mecanismos moleculares e celulares da invasão e motilidade das células do cancro da mama (Larkins *et al.*, 2006).

Mais evidências do papel da COX-2 surgiram de um estudo caso-controlo de base populacional, incluído no *Long Island Breast Cancer Study Project*, no qual 1067 casos de cancro da mama e 1110 indivíduos controlo foram genotipados para demonstrar que polimorfismos da COX-2 podem reduzir o risco de cancro da mama ou o risco para subtipos específicos de cancro da mama. Esses polimorfismos foram obtidos através da modulação da resposta inflamatória pelo uso da aspirina ou outro AINE (Shen *et al.*, 2006).

As acções anti-proliferativas e anti-metastáticas do celecoxibe foram também investigadas num modelo murinho de cancro da mama metastático, demonstrando que este fármaco poderá ser útil como uma terapia adjuvante para o cancro da mama contendo mutações da p53, devido às suas capacidades de induzir apoptose e potencialidade anti-angiogénica (Yoshinaka *et al.*, 2006).

Hormonas, como os estrogénios, desempenham um importante papel na carcinogénese do cancro da mama. Tendo em conta que as PGs são capazes de estimular a expressão do gene da aromatase e induzir a biossíntese de estrogénios, a eficácia da aspirina e outros AINEs no cancro da mama pode variar com o estado dos receptores hormonais (Terry *et al.*, 2004). Tal constatação levou ao desenvolvimento de outros estudos, que ainda estão a decorrer, para avaliar o efeito de inibidores selectivos da COX-2, em combinação com

quimioterapia cancerígena e terapêuticas hormonais, para o tratamento do cancro da mama em diferentes estadios (Pereg e Lishner, 2005).

A cooperação entre as vias da COX-2 e do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) na carcinogénese é óbvia. A terapia combinada com ambos os inibidores destas vias para aumentar a eficácia anti-cancerígena parece lógica, considerando as suas interacções moleculares.

Harris (2009) realizou uma meta-análise de estimativas independentes de 33 estudos acerca do uso de AINEs e o cancro da mama. Os resultados dessa meta-análise estão transcritos na figura 7.

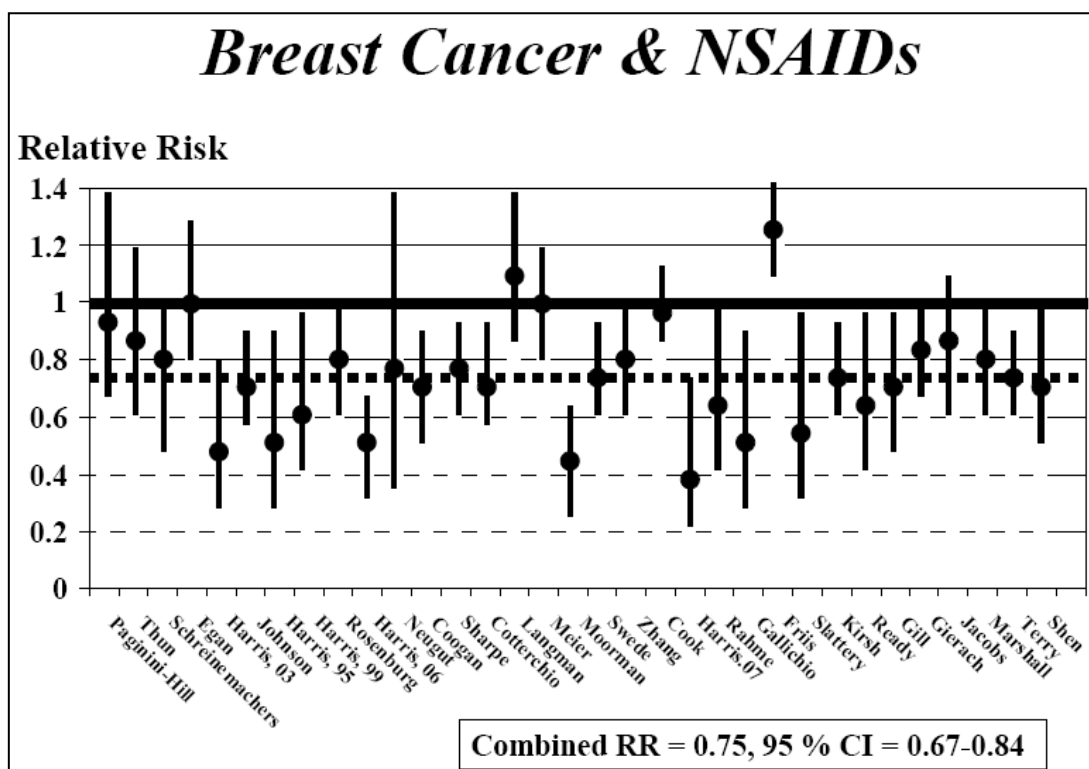


Figura 7 – Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro da mama (Retirado de Harris, 2009)

Entre os 33 ensaios analisados, 24 demonstraram um risco relativo inferior a 1,0 e apenas 1 foi superior a 1,0. O teste de heterogeneidade não mostrou significância ($p < 0,32$) e a análise global demonstrou uma redução do risco de cancro da mama de 25% com o uso regular de AINEs (Figura 7).

É de salientar que, nos estudos recentes, as reduções do risco foram especificamente observadas em cancro da mama com receptores de estrogénio positivo (Marshall *et al.*, 2004; Terry *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Geirach *et al.*, 2008).

c) **Cancro da Próstata**

À semelhança do cancro da próstata em humanos, a malignidade prostática num modelo de adenocarcinoma da próstata de rato transgénico (TRAMP) progride de uma lesão precursora intra-epitelial para carcinoma invasivo e, posteriormente, doença metastática. O tratamento de ratos com celecoxibe resultou na supressão do crescimento tumoral e um decréscimo da disseminação metastática da doença (Gupta *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2006).

Leitzmann e colaboradores sugeriram que, embora não seja claro que o uso regular de aspirina previna a incidência de cancro da próstata, não poderá ser excluído um possível benefício do seu uso frequente no risco de desenvolvimento de doença metastática (Leitzmann *et al.*, 2002).

Um estudo aleatorizado de fase III foi realizado para avaliar os efeitos dos inibidores da COX-2 (celecoxibe) nos níveis séricos de PSA, em doentes submetidos a prostatectomia radical ou radioterapia. O estudo demonstrou uma redução mais significativa nos níveis de PSA nos doentes sob tratamento com celecoxibe do que com placebo (Smith *et al.*, 2006).

Na figura 8 estão expostos os resultados de uma meta-análise de 17 estudos sobre o uso regular de AINEs e o risco e cancro da próstata (Harris, 2009).

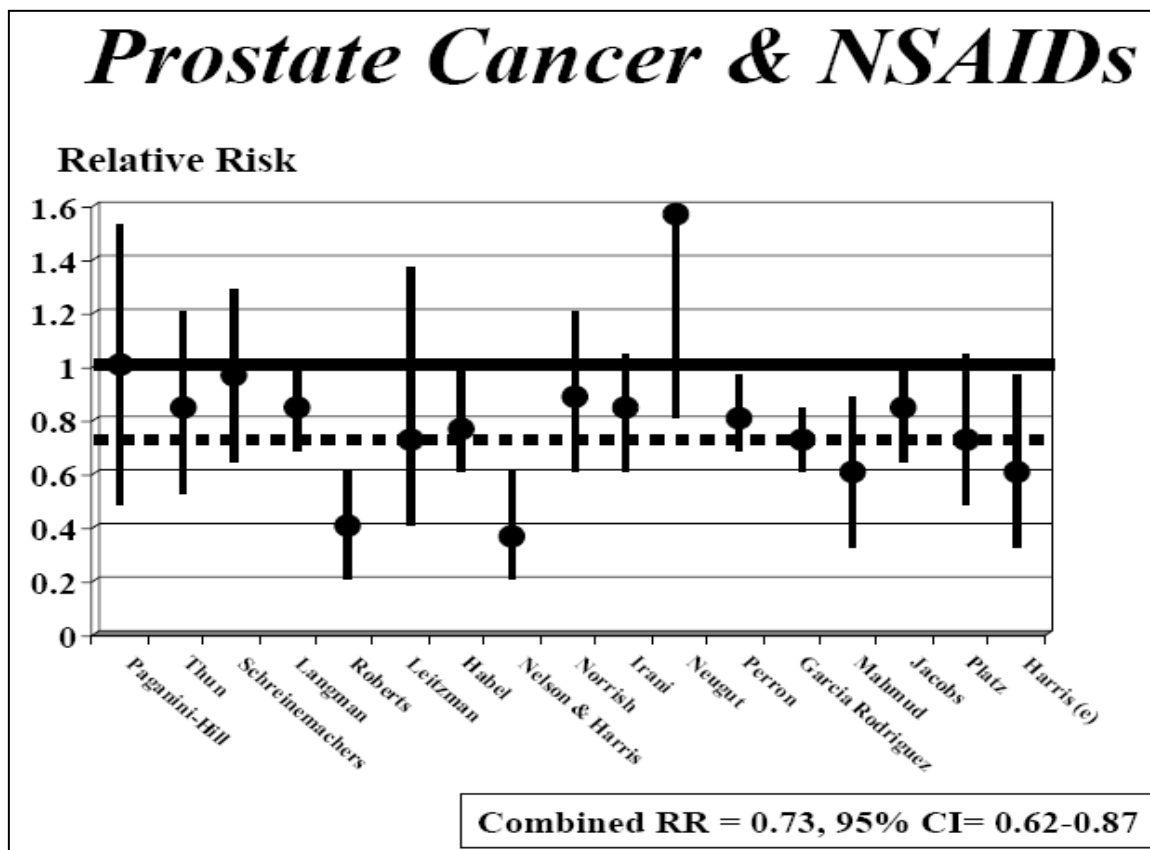


Figura 8 – Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro da próstata (Retirado de Harris, 2009)

Dos 17 estudos analisados, 11 demonstraram um risco relativo inferior a 1,0 e nenhum foi superior a 1,0. O teste de heterogeneidade não mostrou significância ($p < 0,72$) e a análise global demonstrou uma redução do risco de cancro da próstata de 27% com o uso regular de AINEs (Figura 8).

d) Cancro do pulmão

Foram demonstrados efeitos anti-cancerígenos sinérgicos em modelos pré-clínicos de cancro do pulmão usando uma combinação de AINEs e agentes de quimioterapia (como a cisplatina, a ciclofosfamida e o etopósido) (Teicher *et al.*, 1994; Soriano *et al.*, 1999; Hida *et al.*, 2000). Esse mesmo efeito foi também demonstrado para a combinação de sulindac com agentes de quimioterapia recentes como paclitaxel e docetaxel, usando um modelo *in vitro* de cancro de pulmão humano não pequenas células (NSCLC) (Chan *et al.*, 2002).

Recentemente, estudos clínicos demonstraram uma redução do risco de cancro do pulmão após tratamento com AINEs (Harris *et al.*, 2002; Muscat *et al.*, 2003). Num estudo caso-controlo, levado a cabo por Harris e colaboradores (Harris *et al.*, 2002), comparando pacientes com cancro do pulmão e fumadores de frequência elevada no grupo controlo, uma dose diária de AINEs, durante pelo menos 2 anos, foi associada a uma redução de 68% no risco relativo de cancro do pulmão (Harris *et al.*, 2002). Impulsionados por estas descobertas, foram elaborados ensaios clínicos para determinar a eficácia de uma combinação de agentes quimioterapia com inibidores selectivos da COX2. Os resultados ainda não estão disponíveis.

A meta-análise já citada, de Harris (2009) incidiu também sobre as estimativas independentes de 18 estudos do uso de AINEs e cancro do pulmão. Os resultados estão expressos na figura 9.

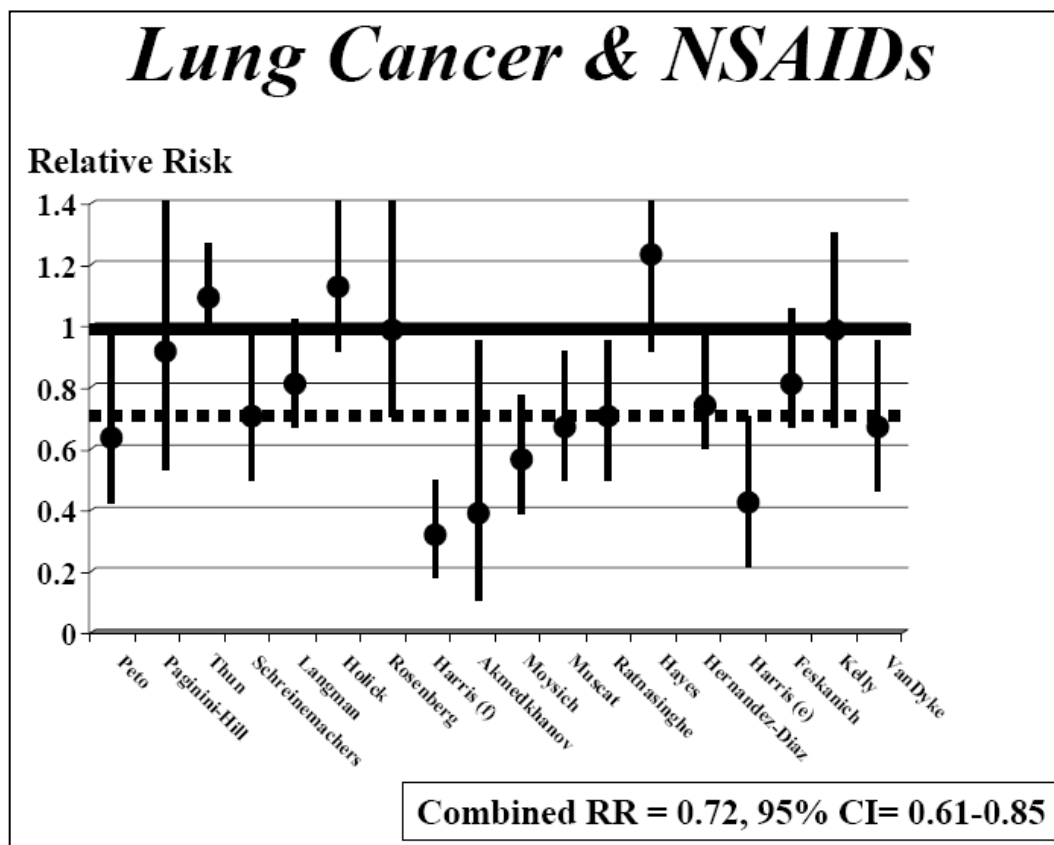


Figura 9 – Meta-análise do uso de AINEs e o risco de cancro do pulmão (Retirado de Harris, 2009)

De entre os 18 estudos analisados, 11 demonstraram um risco relativo inferior a 1,0 e nenhum foi superior a 1,0. O teste de heterogeneidade não mostrou significância ($p < 0,50$) e a análise global demonstrou uma redução do risco de cancro pulmão de 28% com o uso regular de AINEs (Figura 9).

e) Cancro da bexiga

No Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra foi realizado um estudo experimental para avaliar a eficácia de um inibidor selectivo da COX-2 - celecoxibe (CEL) - na quimioprevenção do tumor da bexiga num modelo animal (Parada *et al.*, 2009). Este trabalho permitiu ainda a compreensão do papel da inflamação, proliferação e stresse oxidativo no crescimento tumoral e sua prevenção.

Procedeu-se à indução de carcinoma da bexiga usando uma nitrosamina (N-butil-N-(4-hidroxiutilamina) ou BBN) em ratos, devido às características histológicas semelhantes às do carcinoma humano de células de transição.

O estudo desenrolou-se ao longo de vinte semanas: nas primeiras 8 semanas procedeu-se à administração dos fármacos, seguidas de 12 semanas de seguimento para avaliar a expressão ou a prevenção tumoral. Foram definidos 4 grupos: controlo – veículo; carcinogénio - 0,05% de BBN; CEL – 10 mg/kg/dia; CEL + BBN. O número e o tamanho de lesões tumorais bem como outras lesões do urotélio foram anotadas. Foram realizados doseamentos séricos de marcadores da inflamação, proliferação e de estado redox.

No modelo animal de carcinoma da bexiga induzido por uma nitrosamina, a administração de celecoxibe na dose de 10 mg/kg/dia mostrou ser eficaz na prevenção tumoral. Com efeito, a percentagem de tumores baixou de 65% no grupo do carcinogénio (BBN) para 12,5% no grupo CEL + BBN, com redução também significativa do volume tumoral por rato e por tumor (de $138,5 \pm 7,5$ e $112,5 \pm 6,4$ mm³ para $21,2$ mm³ e $5,3 \pm 0,4$ mm³, respectivamente). A incidência de lesões pré-neoplásicas (hiperplasia e displasia) e neoplásicas (tumores papilares e carcinoma *in situ* – CIS) foi menor no grupo CEL + BBN.

A prevenção do desenvolvimento tumoral foi acompanhada por uma diminuição do stresse oxidativo (redução do indicador MDA/TAS no soro) e de factores inflamatórios (redução da PCR) e proliferativos (redução de TGF- β).

Em suma, o celecoxibe demonstrou um efeito inibitório na quimioprevenção do cancro da bexiga, o que se deve às suas acções anti-inflamatórias, bem como anti-proliferativas e antioxidantes. Este trabalho suporta o papel relevante das estratégias quimiopreventivas baseadas na inibição da COX-2 (Parada *et al.*, 2009).

Na sequência deste estudo, e tendo em conta o mau prognóstico do cancro da bexiga considerando as actuais estratégias terapêuticas cirúrgicas e farmacológicas disponíveis, um outro foi elaborado para comparar a eficácia preventiva versus curativa do inibidor selectivo da COX-2 no carcinoma da bexiga (Serenó *et al.*, 2009).

O estudo, que se desenrolou ao longo de 20 semanas, comparou 52 ratos da espécie *Wistar*, divididos em 5 grupos: controlo – veículo; carcinogénio – 0,05% de nitrosamina (N-butil-N-(4-hidroxi-butilamina) ou BBN; CEL – 10 mg/kg/dia; grupo preventivo – CEL+BBN-P e grupo curativo – BBN+CEL-C. A BBN e o CEL foram administrados durante as 8 semanas iniciais, excepto no grupo curativo, no qual o CEL foi iniciado após o tratamento de 8 semanas com BBN. Idênticos parâmetros foram alvo de avaliação.

O número e o volume de carcinomas foram significativamente inferiores no grupo CEL+BBN-P quando comparados com o grupo BBN, acompanhados também por uma redução na incidência de hiperplasia, displasia e tumores papilares. Quando usado com efeitos curativos, o inibidor selectivo da COX-2, não só conduziu ao aumento do crescimento e desenvolvimento tumorais (incidência de 75% versus 65% no grupo carcinogénio), mas também demonstrou uma progressão na malignidade, evidente na

presença de formas mais agressivas. O perfil anti-inflamatório e antioxidante apenas foi visível no grupo sob tratamento preventivo.

Concluindo, a inflamação, com sobreexpressão e/ou hiperactividade da COX-2, parece ser muito importante para o desenvolvimento/progressão do tumor da bexiga. A inibição da COX-2 com o celecoxibe provou ser um tratamento farmacológico promissor para a quimioprevenção da carcinogénese da bexiga se usada nos estadios iniciais da progressão tumoral, com intuito preventivo. O mesmo não se aplica à utilização do celecoxibe para fins curativos (Serenó *et al.*, 2009).

5 – Inibidores selectivos versus não-selectivos da COX-2: evidências

Apenas um pequeno número de estudos de inibidores selectivos da COX-2 e o seu potencial efeito anti-cancerígeno estão relatados na literatura.

A tabela 2 apresenta os *odds ratio* estimados para a exposição a dois coxibes (celecoxibe ou rofecoxibe) de uma série de casos controlo de cancros da mama, próstata, cólon e pulmão (Harris *et al.*, 2006; Harris, 2007; Harris *et al.*, 2008).

Tabela 2: Uso de inibidores selectivos versus não-selectivos da COX-2 contra o cancro colo-rectal, mama, próstata e pulmão

Compound	Colon Cancer	Breast Cancer	Prostate Cancer	Lung Cancer	Composite Odds Ratio and 95 % CI
COXIB	0.31	0.15	0.45	0.39	0.30 (0.22-0.41)
Ibuprofen	0.28	0.36	0.62	0.39	0.40 (0.30-0.54)
Aspirin	0.33	0.46	0.52	0.55	0.46 (0.37-0.56)

(Retirado de Harris, 2009)

Estimativas comparativas dos mesmos estudos foram obtidas para a aspirina e ibuprofeno. Reduções de risco de 70%, 60% e 54% foram observadas respectivamente para os inibidores selectivos da COX-2, aspirina e ibuprofeno (Tabela 2).

IV – Perfil de segurança dos AINEs e dos inibidores da COX-2

Os AINEs não selectivos que bloqueiam ambas as isoformas da COX são associados a um espectro de efeitos adversos devido à irritação da mucosa gástrica (Feldman e McMahon, 2000), inibição da função plaquetar (Patrono, 2006) e deterioração da função renal e hepática (Whelton, 1999).

A toxicidade gastrointestinal dos AINEs alcança proporções que a projectam como problema de saúde pública, tanto pela mortalidade e morbidade, como pelo impacto económico sobre os sistemas de saúde. A redução desta toxicidade foi uma das principais motivações para o desenvolvimento dos coxibes que contudo, estão associados a efeitos cardiovasculares indesejáveis.

Em contraste com os AINEs tradicionais, a inibição selectiva da COX-2 inibe a produção de PGE2 e PGI2, mas não tem nenhum efeito no TXA2 plaquetar (Patrono, 2006). A inibição selectiva da COX-2 tem vários efeitos que podem aumentar o risco de doença cardiovascular, incluindo a redução dos níveis de prostaciclina, aumento da pressão sanguínea, diminuição da angiogénese (Konstam *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2002; Strand e Hochberg, 2002; Whelton *et al.*, 2002; Weir *et al.*, 2003; Howard e Delafontaine, 2004; Mamdani *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 2004;) e desestabilização plaquetar (Egan *et al.*, 2005).

No aparelho cardiovascular observam-se altas concentrações de COX-1 em plaquetas e células do endotélio vascular. A COX-1 é responsável pela produção de TXA2, o qual tem um efeito pró-trombótico, promovendo a agregação e adesão plaquetar, vasoconstrição e remodelação vascular (FitzGerald, 2003).

Em contraste, a COX-2 é anti-trombótica, promovendo a vasodilatação e redução da agregação e adesão plaquetar. Mais recentemente, uma elevada expressão de COX-2 foi

identificada em amostras obtidas de placas ateromatosas coronárias e carotídeas, reforçando a participação desta enzima no processo inflamatório aterosclerótico.

Assim sendo, os inibidores selectivos da COX-2 podem afectar o equilíbrio entre TXA2 e prostaciclina, levando a um aumento de eventos cardiovasculares e trombóticos (Saraiva, 2007). Os inibidores selectivos da COX-2 podem também promover a retenção de sódio e água, a elevação da pressão arterial e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, devido a desequilíbrios hidro-electrolíticos induzidos pelas PGs a nível dos túbulos renais (Saraiva, 2007).

Alguns estudos clínicos evidenciaram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e tromboembólicos em utilizadores a longo prazo de inibidores selectivos da COX-2 (Saraiva, 2007).

No estudo APPROVe (*Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx*), pacientes com uma história de adenomas colo-rectais eram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. O rofecoxibe (25 mg id) foi comparado com um placebo durante um período de 3 anos. O estudo demonstrou um aumento dos eventos trombóticos (predominantemente enfarte do miocárdio) no grupo do rofecoxibe (RR 1,9; 95% CI 1,2-3,1) que se tornou evidente após 18 meses de terapêutica (Bresalier et al., 2005). Tal resultado culminou com a retirada do mercado do rofecoxibe.

Os resultados do estudo APC (*Adenoma Prevention with Celecoxib*), um estudo previsto para cinco anos de duração (2.026 pacientes) com o objectivo de determinar a eficácia do celecoxibe na prevenção de cancro do cólon, demonstraram um risco aumentado de eventos cardiovasculares com o uso de celecoxibe, dependente da dose, particularmente evidente numa dose diária de 800 mg (RR 3,4; 95% CI 1,4-7,8) (Solomon et al., 2005).

Contudo, os dados disponíveis de uma análise preliminar do estudo PreSAP (*Prevention of Sporadic Adenomatous Polyps*) não evidenciaram um risco cardiovascular aumentado nos utilizadores de celecoxibe 400 mg id (Solomon *et al.*, 2005).

Acredita-se que diferenças na estrutura química dos coxibes sejam factores determinantes do perfil farmacológico de cada um deles. Contudo, a relação entre doses e efeitos adversos tem mostrado linearidade comum a todos os coxibes.

Os resultados de uma meta-análise de 72 estudos do uso de celecoxibe (400 mg id) e eventos cardiovasculares trombóticos (enfarte do miocárdio e AVC) são mostrados na figura 10. A análise inclui uma estimativa combinada de 39 ensaios clínicos randomizados de curta duração, estimativas independentes de 26 estudos observacionais e estimativas independentes de 7 ensaios clínicos randomizados de longa duração (Harris, 2009).

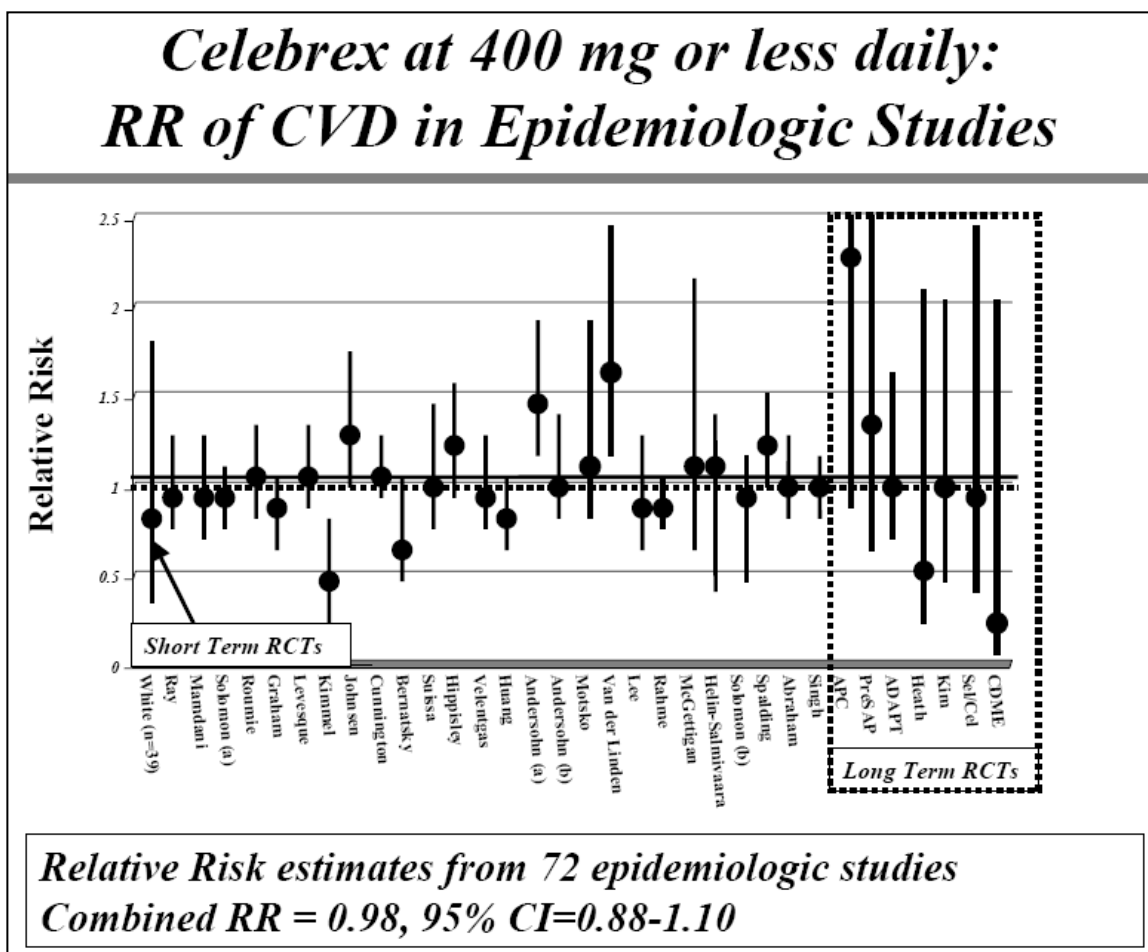


Figura 10: Meta-análise do risco de eventos cardiovasculares com o uso de inibidores selectivos da COX-2

(Retirado de Harris, 2009)

O risco relativo de eventos cardiovasculares trombóticos com o celecoxibe foi de 0,98%, o que demonstra que doses de celecoxibe de 400 mg dia não estão associadas a risco cardiovascular/trombótico.

V – Alvos alternativos para a inibição das prostaglandinas dependentes da COX durante os estádios precoces da carcinogénese

A eficácia dos inibidores selectivos da COX-2 na quimioprevenção do cancro pode potencialmente ser comprometida pela falta de expressão da COX-2 numa proporção de lesões-alvo. É claro que a expressão da COX-2 é variável nos tecidos humanos pré-malignos que são alvos da quimioprevenção. Por exemplo, a proteína COX-2 está ausente numa significativa proporção de adenomas colo-rectal, esófago de Barrett (Morris *et al.*, 2001) e precursores de cancro cutâneo (Nijsten *et al.*, 2004).

Continua pouco claro se a produção de PGs dependente de COX-1 pode compensar a falta de actividade da COX-2 ou se as vias de síntese de PGs dependentes das COX-1 e COX-2 são mutuamente exclusivas. Uma significativa contribuição de ambas as isoformas da COX implica que os inibidores da COX não selectivos podem ter vantagens sobre os inibidores selectivos da COX-2.

A constatação de que embora a inibição da COX-2 tenha uma significativa actividade quimiopreventiva, o uso prolongado de inibidores da COX-2 possa produzir riscos desnecessários em indivíduos até aqui saudáveis com uma propensão para a malignidade, aumentou o ênfase na procura de vias alternativas inibitórias da produção de prostaglandinas dependentes da COX.

Talvez os AINEs mais promissores que demonstraram combinar a actividade anti-neoplásica, *in vitro* e *in vivo*, com aumento da segurança gastrointestinal, sejam os AINEs-NO, também conhecidos como inibidores não selectivos da COX doadores de monóxido de azoto. (Rigas e Kashfi, 2004; Whittle, 2004). O NO pode ter um papel intermediário na citoprotecção da mucosa gástrica. Com papel similar à COX-1, a sintetase constitutiva do monóxido de azoto (NOS) é importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica.

Os mecanismos citoprotectores do NO são paralelos aos efeitos das PGs e incluem a mediação da libertação de muco gástrico, manutenção da função da barreira epitelial e aumento do fluxo sanguíneo da mucosa.

Outro novo conceito na quimioprevenção do cancro é a utilização de uma terapia combinada, que pode permitir uma redução da dose de fármacos como os AINEs ou coxibes quando combinados com outros agentes anti-cancerígenos como, por exemplo, os inibidores EGFR (Torrance *et al.*, 2000).

Alternativamente, outras etapas na biossíntese e sinalização das prostaglandinas (Laye e Gill, 2003; Helliwell *et al.*, 2004; Hull *et al.*, 2004) representam potenciais alvos (Tabela 3). Por exemplo, inibidores farmacológicos da ligação da PGE2 aos receptores EP (Hull *et al.*, 2004).

Tabela 3: Estratégias alternativas para inibição da via de sinalização dependente de COX-PG, evitando/minimizando a inibição sistémica da COX-2
(Adaptado de Hull, 2005)

Inibição segura não-selectiva da COX, ex: AINEs-NO

Redução da biodisponibilidade sistémica dos inibidores selectivos da COX-2

- Redução de dose (no contexto de terapia combinada);
- Restrição (local, ex: tópica) da distribuição do fármaco.

Alvejar outras etapas no mecanismo de biossíntese/sinalização de PGs

- PLA₂s;
- Sintetases de PGs;
- Receptores de PGs ex: GPCRs e PPARs.

Inibição da expressão da COX-2 (em vez da sua actividade) em tecidos pré-neoplásicos e/ou neoplásicos

V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE FUTURO

Os mediadores moleculares e celulares do processo inflamatório são constituintes importantes no ambiente local dos tumores. Numa grande parte dos tumores, condições inflamatórias estão presentes antes do aparecimento das alterações malignas. Estas alterações inflamatórias actuam na proliferação e sobrevivência das células malignas, promoção da angiogénese e metastização, supressão das respostas imunes adaptativas.

Estes mediadores inflamatórios começam agora a ser conhecidos e revelados. A identificação de agentes/fármacos que possam suprimi-los poderá representar um enorme passo na quimioprevenção da carcinogénese. De entre os inúmeros mediadores destaca-se o papel da ciclooxigenase. Actualmente, existem evidências substanciais que suportam o papel da ciclooxigenase-2 (COX-2), mediador da produção de prostaglandinas, durante a carcinogénese em diferentes tipos de tumores, nos quais a COX-2 se encontra hiperexpressa.

Os inibidores da COX-2 têm, desta forma, potencialidades para afectar a biologia e o crescimento tumorais e servir como fármacos antitumorais tanto com um papel terapêutico como quimiopreventivo. As evidências mostram claramente o efeito quimiopreventivo dos AINEs em diferentes tipos de cancro: cancro colo-rectal, mama, pulmão, próstata e bexiga; contudo, as informações relativas ao perfil de risco-benefício são insuficientes e recomendações definitivas ainda não poderão ser realizadas.

Dados actualmente disponíveis sugerem que os AINEs devem ser tomados durante alguns anos para uma substancial protecção contra o cancro. Contudo, reside a dúvida se será necessário um tratamento ininterrupto ou se a interrupção após um período de 10 anos de tratamento pode ter um benefício contínuo.

As observações relativas ao efeito quimiopreventivo referem-se a tumores como o cancro esofágico, gástrico, do pulmão, da mama, da próstata e colo-rectal. A maioria destas patologias desenvolvem-se depois dos 60 anos, mas a melhor idade para começar a quimioprevenção com AINEs é desconhecida. Devido ao aparente atraso do efeito quimiopreventivo dos AINEs (cerca de 10 anos), o tratamento óptimo deverá começar por volta dos 40-50 anos. Além disso, parece ser por volta desta idade que se desenvolvem as lesões pré-malignas, para além do facto do risco de efeitos adversos dos AINEs aumentar exponencialmente após os 60 anos de idade.

Outra das questões reside na população-alvo: o tratamento quimiopreventivo da população em geral não tem um bom perfil de risco-benefício. O ideal seria focar as intervenções preventivas em indivíduos com um risco substancial de cancro. Nesse sentido, mais estudos moleculares e genéticos serão necessários para definir com exactidão a população de risco elevado de cancro.

Outro factor importante é definir para os ensaios clínicos a duração de tratamento e de seguimento necessária para se encontrarem diferenças entre os diferentes grupos envolvidos no estudo. Será também essencial determinar se o aumento do risco cardiovascular com a terapia com coxibes é apenas relevante nos doentes com doença aterosclerótica pré-existente ou se os pacientes mais jovens, sem patologia vascular *ab initio*, estarão em risco de aterosclerose acelerada.

Conclui-se, com base nas evidências actualmente disponíveis, que serão necessários estudos experimentais adicionais bem como ensaios clínicos, sobre os efeitos quimiopreventivos dos inibidores da COX-2, de modo a esclarecer questões como a dose mínima efectiva, a idade de início da terapêutica, duração da terapêutica e sua população-alvo para a qual os benefícios da quimioprevenção superam os riscos de efeitos adversos, definição de eficácia e segurança dos diferentes fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, B. B. (2004). "Nuclear factor-kappaB: the enemy within." *Cancer Cell* 6(3): 203-208.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., *et al.* (2006). "Inflammation and cancer: how hot is the link?" *Biochem Pharmacol* 72(11): 1605-1621.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., *et al.* (2008). "Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes." *Pharmaceutical Research* 25(9): 2097-2116.
- Apte, R. N. e Voronov, E. (2002). "Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions." *Semin Cancer Biol* 12(4): 277-290.
- Arber, N., Eagle, C. J., Spicak, J., *et al.* (2006). "Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps." *N Engl J Med* 355(9): 885-895.
- Arnott, C. H., Scott, K. A., Moore, R. J., *et al.* (2004). "Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development." *Oncogene* 23(10): 1902-1910.
- Balkwill, F., Charles, K. A. e Mantovani, A. (2005). "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." *Cancer Cell* 7(3): 211-217.
- Balkwill, F. e Mantovani, A. (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357(9255): 539-545.
- Barnes, N., Haywood, P., Flint, P., *et al.* (2006). "Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence." *Br J Cancer* 94(2): 253-258.
- Baron, J. A., Cole, B. F., Sandler, R. S., *et al.* (2003). "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas." *N Engl J Med* 348(10): 891-899.
- Baron, J. A., Sandler, R. S., Bresalier, R. S., *et al.* (2006). "A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas." *Gastroenterology* 131(6): 1674-1682.
- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., *et al.* (2007). "The multitude and diversity of environmental carcinogens." *Environ Res* 105(3): 414-429.
- Berenbaum, F. (2004). "COX-3: fact or fancy?" *Joint Bone Spine* 71(6): 451-453.
- Bertagnolli, M. M., Eagle, C. J., Zauber, A. G., *et al.* (2006). "Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas." *N Engl J Med* 355(9): 873-884.
- Boland, G. P., Butt, I. S., Prasad, R., *et al.* (2004). "COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ." *Br J Cancer* 90(2): 423-429.
- Brenol, J.C., Xavier, R.M., Marasca, J. (2000) "Anti-inflamatórios não hormonais convencionais." *Rev Bras Med* 57.
- Bresalier, R. S., Sandler, R. S., Quan, H., *et al.* (2005). "Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial." *N Engl J Med* 352(11): 1092-1102.

- Breyer, R. M., Bagdassarian, C. K., Myers, S. A., *et al.* (2001). "Prostanoid receptors: subtypes and signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 661-690.
- Cao, Y.e Prescott, S. M. (2002). "Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer." *J Cell Physiol* 190(3): 279-286.
- Chan, D. C., Earle, K. A., Zhao, T. L., *et al.* (2002). "Exisulind in combination with docetaxel inhibits growth and metastasis of human lung cancer and prolongs survival in athymic nude rats with orthotopic lung tumors." *Clin Cancer Res* 8(3): 904-912.
- Chan, T. A., Morin, P. J., Vogelstein, B., *et al.* (1998). "Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(2): 681-686.
- Chung, Y. C.e Chang, Y. F. (2003). "Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer." *J Surg Oncol* 83(4): 222-226.
- Cook, N. R., Lee, I. M., Gaziano, J. M., *et al.* (2005). "Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial." *JAMA* 294(1): 47-55.
- Courtois, G.e Gilmore, T. D. (2006). "Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease." *Oncogene* 25(51): 6831-6843.
- Coussens, L. M.e Werb, Z. (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-867.
- Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., *et al.* (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." *Gastroenterology* 107(4): 1183-1188.
- Egan, K. M., Wang, M., Fries, S., *et al.* (2005). "Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism." *Circulation* 111(3): 334-342.
- Feldman, M.e McMahon, A. T. (2000). "Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?" *Ann Intern Med* 132(2): 134-143.
- FitzGerald, G.A. (2003). "COX-2 and beyond; approaches to prostaglandin inhibition in human disease." *Nat Rev Drug Discov*, London (2): 879-90.
- Fosslien, E. (2000). "Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia." *Ann Clin Lab Sci* 30(1): 3-21.
- Fosslien, E. (2001). "Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis." *Ann Clin Lab Sci* 31(4): 325-348.
- Friedrich, M. G., Toma, M. I., Petri, S., *et al.* (2003). "Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis in pTa/T1 urothelial bladder carcinoma but does not predict recurrence." *BJU Int* 92(4): 389-392.
- Gaiotti, D., Chung, J., Iglesias, M., *et al.* (2000). "Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway." *Mol Carcinog* 27(2): 97-109.
- Gardiner, P. J. (1986). "Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (psi) using a highly selective agonist, TR4979." *Br J Pharmacol* 87(1): 45-56.

- Garlanda, C., Riva, F., Veliz, T., *et al.* (2007). "Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family." *Cancer Res* 67(13): 6017-6021.
- Giaccia, A., Siim, B. G.e Johnson, R. S. (2003). "HIF-1 as a target for drug development." *Nat Rev Drug Discov* 2(10): 803-811.
- Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Krush, A. J., *et al.* (1993). "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis." *N Engl J Med* 328(18): 1313-1316.
- Giardiello, F. M., Yang, V. W., Hylind, L. M., *et al.* (2002). "Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac." *N Engl J Med* 346(14): 1054-1059.
- Gierach, G. L., Lacey, J. V., Jr., Schatzkin, A., *et al.* (2008). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study." *Breast Cancer Res* 10(2): R38.
- Gilmore, T. D. (2003). "The Re1/NF-kappa B/I kappa B signal transduction pathway and cancer." *Cancer Treat Res* 115: 241-265.
- Giovannucci, E., Egan, K. M., Hunter, D. J., *et al.* (1995). "Aspirin and the risk of colorectal cancer in women." *N Engl J Med* 333(10): 609-614.
- Gupta, S., Adhami, V. M., Subbarayan, M., *et al.* (2004). "Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model." *Cancer Res* 64(9): 3334-3343.
- Gustin, D. M.e Brenner, D. E. (2002). "Chemoprevention of colon cancer: current status and future prospects." *Cancer Metastasis Rev* 21(3-4): 323-348.
- Harris, R. E. (2002). "COX-2 Blockade in Cancer Prevention and Therapy" Totowa, Human Press 147-155.
- Harris, R. E. (2007). "Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer." *Subcell Biochem* 42: 93-126.
- Harris, R. E. (2009). "Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung." *Inflammopharmacology* 17(2): 55-67.
- Harris, R. E., Beebe-Donk, J.e Alshafie, G. A. (2006). "Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors." *BMC Cancer* 6: 27.
- Harris, R. E., Beebe-Donk, J.e Alshafie, G. A. (2007). "Cancer chemoprevention by cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of case control studies." *Subcell Biochem* 42: 193-212.
- Harris, R. E., Beebe-Donk, J.e Alshafie, G. A. (2008). "Similar reductions in the risk of human colon cancer by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors." *BMC Cancer* 8: 237.
- Harris, R. E., Beebe-Donk, J.e Schuller, H. M. (2002). "Chemoprevention of lung cancer by non-steroidal anti-inflammatory drugs among cigarette smokers." *Oncol Rep* 9(4): 693-695.

- Hartmann, L. C., Lingle, W., Frost, M. H., et al. (2006). "COX-2 expression in atypia: correlation with breast cancer risk." Abstract No. 2353, American Association for Cancer Research, 97th Annual Meeting.
- Hata, A. N.e Breyer, R. M. (2004). "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation." *Pharmacol Ther* 103(2): 147-166.
- Helliwell, R. J., Adams, L. F.e Mitchell, M. D. (2004). "Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(2): 101-113.
- Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., et al. (2000). "Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines." *Clin Cancer Res* 6(5): 2006-2011.
- Howard, P. A.e Delafontaine, P. (2004). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk." *J Am Coll Cardiol* 43(4): 519-525.
- Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Brown, A. M., et al. (2001). "Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 8(2): 97-114.
- Hull, M. A. (2005). "Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention?" *Eur J Cancer* 41(13): 1854-1863.
- Hull, M. A., Ko, S. C.e Hawcroft, G. (2004). "Prostaglandin EP receptors: targets for treatment and prevention of colorectal cancer?" *Molecular Cancer Therapeutics* 3(8): 1031-1039.
- Imperatori, E., Giraldes, M. R., (1982). "Metodologia do planeamento da saúde: manual para uso em serviços centrais, regionais e locais". Lisboa: Escola Nacional de Saúde Pública.
- Júnior, J.O., Serrano, S.C., Teodoro, A.L. et al. (2007) "Os antiinflamatórios não hormonais." *Prática hospitalar* 51: 173-8.
- Kai, H., Kitadai, Y., Kodama, M., et al. (2005). "Involvement of proinflammatory cytokines IL-1beta and IL-6 in progression of human gastric carcinoma." *Anticancer Res* 25(2A): 709-713.
- Kaifi, J. T., Yekebas, E. F., Schurr, P., et al. (2005). "Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer." *J Natl Cancer Inst* 97(24): 1840-1847.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* 441(7092): 431-436.
- Kashfi, K.e Rigas, B. (2005). "Non-COX-2 targets and cancer: expanding the molecular target repertoire of chemoprevention." *Biochem Pharmacol* 70(7): 969-986.
- Khan, K. N., Masferrer, J. L., Woerner, B. M., et al. (2001). "Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon." *Scand J Gastroenterol* 36(8): 865-869.
- Kim, J., Takeuchi, H., Lam, S. T., et al. (2005). "Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival." *Journal of Clinical Oncology* 23(12): 2744-2753.

- Klippel, J.H., Weyand, C.M., Wortmann, R.L. (2001) "Primer in the rheumatic diseases." Ed Arthritis Foudation, Georgia 583-91.
- Konstam, M. A., Weir, M. R., Reicin, A., *et al.* (2001). "Cardiovascular thrombotic events in controlled, clinical trials of rofecoxib." *Circulation* 104(19): 2280-2288.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., *et al.* (2005). "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nat Med* 11(12): 1314-1321.
- Kundu, J. K.e Surh, Y. J. (2008). "Inflammation: gearing the journey to cancer." *Mutat Res* 659(1-2): 15-30.
- Kune, G. A., Kune, S.e Watson, L. F. (1988). "Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study." *Cancer Res* 48(15): 4399-4404.
- Larkins, T. L., Nowell, M., Singh, S., *et al.* (2006). "Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression." *BMC Cancer* 6: 181.
- Laye, J. P.e Gill, J. H. (2003). "Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention?" *Drug Discov Today* 8(15): 710-716.
- Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., Ma, J., *et al.* (2002). "Aspirin use in relation to risk of prostate cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(10 Pt 1): 1108-1111.
- Mamdani, M., Juurlink, D. N., Lee, D. S., *et al.* (2004). "Cyclo-oxygenase-2 inhibitors versus non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study." *Lancet* 363(9423): 1751-1756.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., *et al.* (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* 454(7203): 436-444.
- Mariani, F., Sena, P., Marzona, L., *et al.* (2009). "Cyclooxygenase-2 and Hypoxia-Inducible Factor-1alpha protein expression is related to inflammation, and up-regulated since the early steps of colorectal carcinogenesis." *Cancer Letters* 279(2): 221-229.
- Marshall, S. F., Bernstein, L., Anton-Culver, H., *et al.* (2005). "Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk by stage and hormone receptor status." *J Natl Cancer Inst* 97(11): 805-812.
- Masferrer, J. L., Leahy, K. M., Koki, A. T., *et al.* (2000). "Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors." *Cancer Res* 60(5): 1306-1311.
- Moore, R. J., Owens, D. M., Stamp, G., *et al.* (1999). "Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis." *Nat Med* 5(7): 828-831.
- Morris, C. D., Armstrong, G. R., Bigley, G., *et al.* (2001). "Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence." *American Journal of Gastroenterology* 96(4): 990-996.
- Muscat, J. E., Chen, S. Q., Richie, J. P., Jr., *et al.* (2003). "Risk of lung carcinoma among users of nonsteroidal antiinflammatory drugs." *Cancer* 97(7): 1732-1736.
- Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Ptman, B., *et al.* (2006). "Adenocarcina of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition." *Prostate* 66(3): 257-265.

- Nijsten, T., Colpaert, C. G., Vermeulen, P. B., *et al.* (2004). "Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases." *Br J Dermatol* 151(4): 837-845.
- Parada, B., Sereno, J., Reis, F., *et al.* (2009). "Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis." *Cancer Biol Ther* 8(17): 1615-1622.
- Patrono, C. (2006). "The PGH-synthase system and isozyme-selective inhibition." *J Cardiovasc Pharmacol* 47 Suppl 1: S1-6.
- Pereg, D. e Lishner, M. (2005). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer." *J Intern Med* 258(2): 115-123.
- Perrone, G., Santini, D., Vincenzi, B., *et al.* (2005). "COX-2 expression in DCIS: correlation with VEGF, HER-2/neu, prognostic molecular markers and clinicopathological features." *Histopathology* 46(5): 561-568.
- Pruthi, R. S., Derksen, E. e Gaston, K. (2003). "Cyclooxygenase-2 as a potential target in the prevention and treatment of genitourinary tumors: a review." *J Urol* 169(6): 2352-2359.
- Pruthi, R. S., Derksen, E., Gaston, K., *et al.* (2004). "Rationale for use of cyclooxygenase-2 inhibitors in prevention and treatment of bladder cancer." *Urology* 64(4): 637-642.
- Rayyan, Y., Williams, J. e Rigas, B. (2002). "The role of NSAIDs in the prevention of colon cancer." *Cancer Invest* 20(7-8): 1002-1011.
- Rigas, B. e Kashfi, K. (2004). "Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention." *Trends Mol Med* 10(7): 324-330.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., *et al.* (2008). "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." *Nature* 453(7196): 807-811.
- Salvucci, O., Bouchard, A., Baccarelli, A., *et al.* (2006). "The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study." *Breast Cancer Res Treat* 97(3): 275-283.
- Sandler, R. S., Halabi, S., Baron, J. A., *et al.* (2003). "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer." *N Engl J Med* 348(10): 883-890.
- Saraiva, J.F. (2007). "COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente?" *Phaenix Comunicação Integrada, São Paulo*: 1-5.
- Sereno, J., Parada, B., Reis, F., *et al.* (2009). "Preventive but not curative efficacy of selective cyclooxygenase-2 inhibition on bladder carcinogenesis in a rat model". *Tese de Mestrado; UBI - Covilhã*
- Shen, J., Gammon, M. D., Terry, M. B., *et al.* (2006). "Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk." *Breast Cancer Res* 8(6): R71.
- Simmons, D. L., Botting, R. M. e Hla, T. (2004). "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." *Pharmacol Rev* 56(3): 387-437.

- Sinicrope, F. A., Lemoine, M., Xi, L., *et al.* (1999). "Reduced expression of cyclooxygenase 2 proteins in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers." *Gastroenterology* 117(2): 350-358.
- Smith, M. R., Manola, J., Kaufman, D. S., *et al.* (2006). "Celecoxib versus placebo for men with prostate cancer and a rising serum prostate-specific antigen after radical prostatectomy and/or radiation therapy." *J Clin Oncol* 24(18): 2723-2728.
- Solomon, D. H., Glynn, R. J., Levin, R., *et al.* (2002). "Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and acute myocardial infarction." *Arch Intern Med* 162(10): 1099-1104.
- Solomon, D. H., Schneeweiss, S., Glynn, R. J., *et al.* (2004). "Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults." *Circulation* 109(17): 2068-2073.
- Solomon, S. D., McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., *et al.* (2005). "Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention." *N Engl J Med* 352(11): 1071-1080.
- Solomon, S. D., Pfeffer, M. A., McMurray, J. J., *et al.* (2006). "Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas." *Circulation* 114(10): 1028-1035.
- Soriano, A. F., Helfrich, B., Chan, D. C., *et al.* (1999). "Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines." *Cancer Res* 59(24): 6178-6184.
- Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., *et al.* (1996). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." *N Engl J Med* 342: 1946-1950.
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., *et al.* (2000). "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis." *N Engl J Med* 342(26): 1946-1952.
- Strand, V.e Hochberg, M. C. (2002). "The risk of cardiovascular thrombotic events with selective cyclooxygenase-2 inhibitors." *Arthritis Rheum* 47(4): 349-355.
- Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W. J., *et al.* (1999). "Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53." *J Biol Chem* 274(16): 10911-10915.
- Teicher, B. A., Korbut, T. T., Menon, K., *et al.* (1994). "Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies." *Cancer Chemother Pharmacol* 33(6): 515-522.
- Terry, M. B., Gammon, M. D., Zhang, F. F., *et al.* (2004). "Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk." *JAMA* 291(20): 2433-2440.
- Tomozawa, S., Tsuno, N. H., Sunami, E., *et al.* (2000). "Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer." *Br J Cancer* 83(3): 324-328.
- Torrance, C. J., Jackson, P. E., Montgomery, E., *et al.* (2000). "Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia." *Nat Med* 6(9): 1024-1028.
- Turini, M. E.e DuBois, R. N. (2002). "Cyclooxygenase-2: a therapeutic target." *Annu Rev Med* 53: 35-57.

- Ulrich, C. M., Bigler, J.e Potter, J. D. (2006). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics." *Nat Rev Cancer* 6(2): 130-140.
- Vane, J. R., Flower, R. J.e Botting, R. M. (1990). "History of aspirin and its mechanism of action." *Stroke* 21(12 Suppl): IV12-23.
- Virchow, R. (1863) "Aetiologie der neoplastischen Geschwulst/Pathogenie der neoplastischen Geschwulste." *Die Krankhaften Geschwulste*. Berlin: Verlag von August Hirschwald, 57–101.
- Wallace, J. L. (1997). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years." *Gastroenterology* 112(3): 1000-1016.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., *et al.* (2004). "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells." *Nat Med* 10(1): 48-54.
- Weir, M. R., Sperling, R. S., Reicin, A., *et al.* (2003). "Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: a review of the rofecoxib development program." *Am Heart J* 146(4): 591-604.
- Whelton, A. (1999). "Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications." *Am J Med* 106(5B): 13S-24S.
- Whelton, A., White, W. B., Bello, A. E., *et al.* (2002). "Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and edema in patients > or =65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis." *Am J Cardiol* 90(9): 959-963.
- Whittle, B. J. (2004). "Cyclooxygenase and nitric oxide systems in the gut as therapeutic targets for safer anti-inflammatory drugs." *Curr Opin Pharmacol* 4(6): 538-545.
- Xiao, H., Gulen, M. F., Qin, J., *et al.* (2007). "The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis." *Immunity* 26(4): 461-475.
- Yohena, T., Yoshino, I., Takenaka, T., *et al.* (2009). "Upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer." *J Thorac Oncol* 4(3): 284-290.
- Yoshinaka, R., Shibata, M. A., Morimoto, J., *et al.* (2006). "COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer." *Anticancer Res* 26(6B): 4245-4254.
- Yu, H., Kortylewski, M.e Pardoll, D. (2007). "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* 7(1): 41-51.
- Zhuang, Z. H., Tsao, S. W., Deng, W., *et al.* (2008). "Early upregulation of cyclooxygenase-2 in human papillomavirus type 16 and telomerase-induced immortalization of human esophageal epithelial cells." *J Gastroenterol Hepatol* 23(10): 1613-1620.