

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

ATIVIDADE DAS CICLOOXIGENASES E SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E2 EM LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO E EM CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich

Lízia Colares Vilela

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Botucatu – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

ATIVIDADE DAS CICLOOXIGENASES E SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E2 EM LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO E EM CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich

Doutoranda: Lízia Colares Vilela
Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Fecchio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Botucatu – SP

2007

SUMÁRIO

1. Revisão de Literatura	1
2. Referências Bibliográficas	12
3. Objetivos	19
4. Manuscrito 1	20
Introdução	22
Delineamento Experimental	23
Material e Métodos	24
Resultados	27
Discussão	39
Conclusões Gerais	43
5. Referências Bibliográficas	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclooxygenases

O processo pelo qual uma célula normal se transforma em cancerosa é complexo e envolve muitas etapas, reguladas por fatores ambientais, genéticos e nutricionais. Estes fatores em conjunto alteram vias que controlam o crescimento celular, mecanismos apoptóticos e vias supressoras tumorais. Dessa forma, o crescimento passa a ser autônomo, as células não entram em apoptose e se transformam em imortais (Farber, 1984; Hanahan et al., 2000).

Depois de passarem pelo processo de transformação, as células cancerosas expressam enzimas, moléculas de adesão, proteínas, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento que permitem a invasão de tecidos vizinhos e a colonização de outros tecidos (Ardestani et al., 1999). Dentre as enzimas e mediadores que as células tumorais passam a expressar, estão a prostaglandina-H-sintetase e prostaglandina E2 (PGE₂), detectadas em tumores de cólon, de estômago, fígado, próstata, mama, pulmão e pele (Sano et al., 1995; Buckman et al., 1998; Hwang et al., 1998; Uefuji et al., 1998; Wolff et al., 1998; Koga et al., 1999; Yoshimura et al., 2000).

As prostaglandinas são produzidas através de uma complexa cascata enzimática, da qual participam as Prostaglandinas-H-sintetases, comumente conhecidas como ciclooxygenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2). A via de síntese de prostaglandinas dá origem a substâncias coletivamente denominadas prostanóides, que incluem: PGD₂ (Prostaglandina D2), PGE₂ (Prostaglandina E2), PGI₂ (Prostaciclina), PGF_{2α} (Prostaglandina F2α) e TXA₂ (Tromboxano A2) (Capdevilla et al., 2000). Os prostanóides pertencem a um grupo maior de mediadores lipídicos, os eicosanóides que são ácidos graxos oxigenados de C₁₈, C₂₀ e C₂₂ com mecanismos de ação similares a hormônios. Em conjunto os eicosanóides incluem: a) prostanóides produzidos pela via das ciclooxygenases; b) leucotrienos, lipoxinas, epoxilinas, ácidos graxos mono-hidróxidos produzidos pela via das lipoxigenases;

c) epóxi e ácidos graxos di-hidróxidos formados pelo citocromo P450s e d) isoprostanos, isoleucotrienos, assim como ácidos graxos formados não-enzimaticamente. Os eicosanóides, apesar de funções biológicas diferentes, apresentam o mesmo precursor comum: ácido araquidônico, principal componente dos fosfolipídeos das membranas celulares. Este precursor, portanto, é substrato para as três vias enzimáticas: 1) COX-1 e COX-2; 2) para as lipoxigenases e 3) derivados da atividade do citocromo P450s (Smith et al., 2000) (Figura 1):

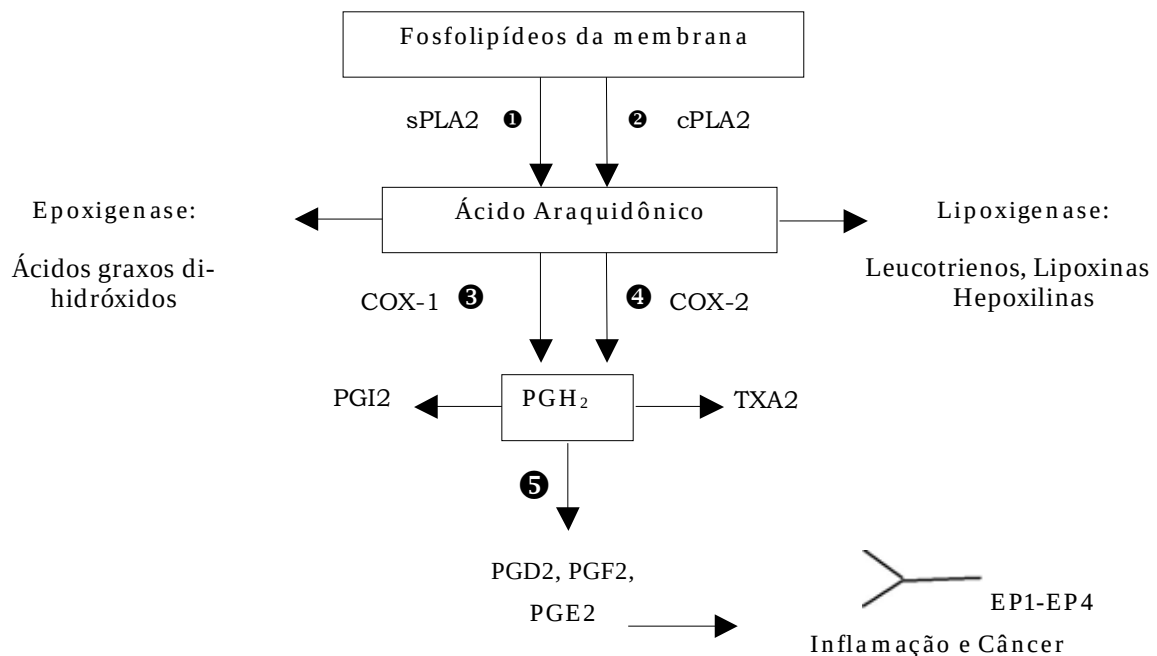


Figura 1. Metabolismo dos eicosanóides: Fosfolipídeos da membrana são convertidos a ácido araquidônico (AA) por fosfolipase-A2 solúvel (sPLA₂) (①) e fosfolipase A2 citosólica (cPLA₂) (②). O AA é convertido a leucotrienos pelas lipoxigenases, a ácidos graxos di-hidróxidos, pelas epoxigenases do citocromo P450 ou ainda a prostaglandina-H pelas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (③ e ④). Através de enzimas tecido-específicas, PGH₂ é convertida aos prostanóides: PGI₂ (prostaciclina - prostaciclina-sintetase), tromboxana A₂ (TXA₂ - tromboxana-sintetase) e prostaglandinas, produzidas pela atividade das prostaglandinas-sintetases) (⑤). A PGE₂ exerce tanto seus efeitos fisiológicos como em processos inflamatórios e carcinogênicos através da interação com seus quatro receptores (EP1-EP4). Adaptado de Clinical Reviews in Clinical Laboratory Science, 37(5): 431-502, 2000.

As ciclooxygenases participam de 2 das 3 etapas de produção dos prostanóides (Figura 2). Primeiramente adiciona duas moléculas de O_2 (ciclooxygenação) ao AA formando prostaglandina G_2 (PGG_2) e a seguir converte PGG_2 em prostaglandina H_2 (PGH_2), atividade peroxidase que consiste em adicionar 2 elétrons à molécula de PGG_2 . Os dois sítios ativos das ciclooxygenases estão em locais diferentes ao longo da molécula, mas apesar disso, estão funcional e estruturalmente ligados (Smith et al., 1996).

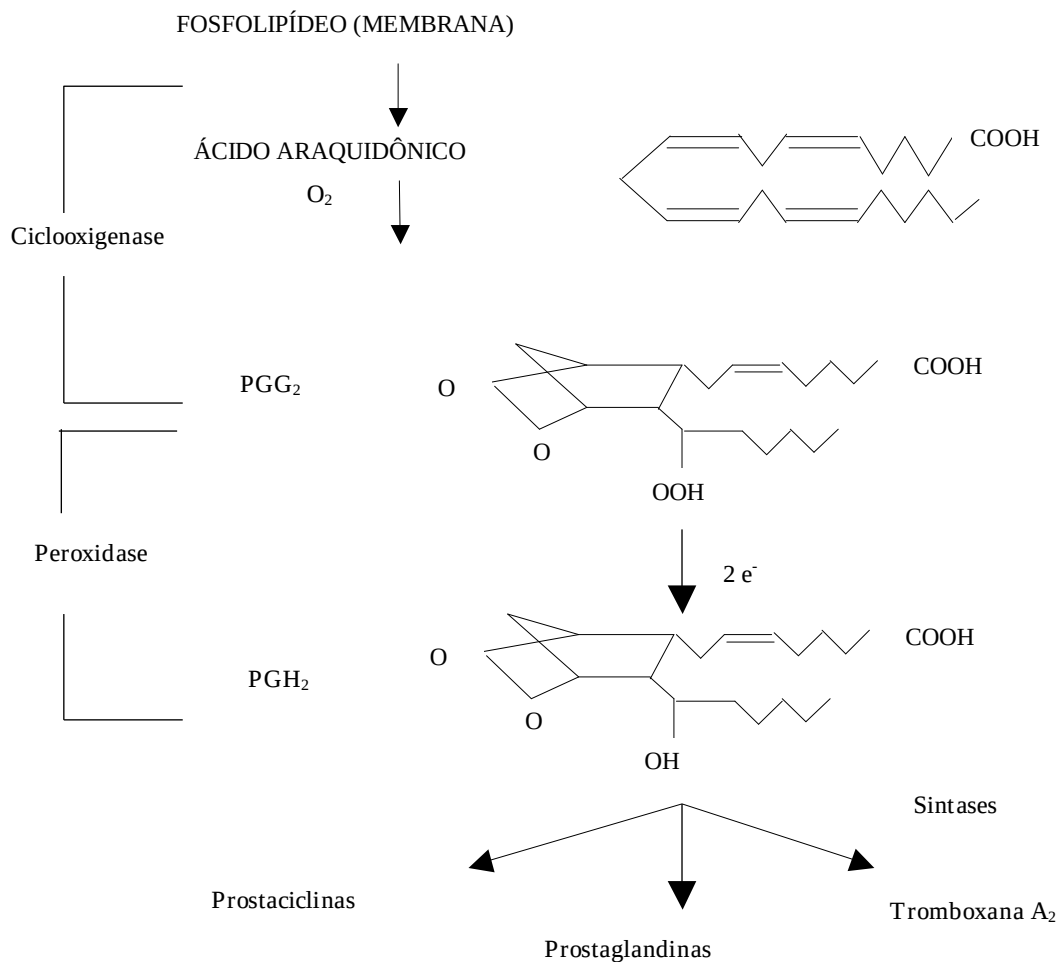


Figura 2. Via de síntese dos prostanóides, derivados do Ácido Araquidônico. Modificado de Annual Rev Biochem 2000. 69: 145-182.

As ciclooxigenases são desativadas irreversivelmente durante a oxigenação de seu substrato, fenômeno químico conhecido como “inativação suicida”, por ser catalisado pela própria enzima. Dessa forma, as atividades ciclooxigenase e peroxidase são desativadas de 1 a 2 minutos depois que o substrato, AA, é disponibilizado. O significado biológico deste fenômeno não está esclarecido, pois nova enzima tem que ser traduzida para que a síntese de prostanóides prossiga (Smith et al., 1996; Wu et al., 1999).

As isoenzimas COX-1 e COX-2 são proteínas geneticamente independentes, codificadas por genes localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. A COX-1 contém 576 aminoácidos, peso molecular de 67 Kilodáltons (KDa), COX-2 com 587 aminoácidos e peso molecular de 72 KDa, apresentando homologia de 60 a 65% quando considerada a mesma espécie. A estrutura das ciclooxigenases é composta por três domínios, um localizado na porção N-terminal (cerca de 50 aminoácidos), domínio transmembrana (cerca de 50 aminoácidos) e um grande domínio catalítico com cerca de 460 aminoácidos na extremidade C-terminal da proteína. Ambas enzimas estão localizadas na superfície interna do Retículo Endoplasmático e nas faces interna e externa da membrana nuclear; COX-2, no entanto, está relativamente mais concentrada no envoltório nuclear (Merlie, 1988; Needleman & Isakson, 1997; Vane et al., 1998).

A atividade das ciclooxigenases gera PGH_2 , que é convertida por sintetases específicas aos três grupos de prostanóides cíclicos: prostaciclina, tromboxanos e prostaglandinas. As enzimas COX-1 e COX-2 catalisam reações químicas muito semelhantes, mas são expressas em condições diferentes. A COX-1, enzima de expressão constitutiva para a maioria das células, participa da síntese de prostanóides envolvidos com a homeostase, como citoproteção gastrointestinal, manutenção da função renal, coagulação sanguínea, agregação plaquetária e vasoconstrição (Crofford, 1997; DeWitt, 1988).

Por sua vez, a expressão de COX-2 ocorre, normalmente, em resposta a estímulos inflamatórios como LPS, Interleucina-6, Interleucina-1, Fator de Necrose tumoral- α , fatores de crescimento e promotores tumorais (Fosslien, 2000; Zha et al., 2004).

As prostaglandinas são mediadores lipídicos compostos por 20 carbonos que desempenham diversas atividades biológicas através da interação com seus receptores específicos. Dentre as prostaglandinas, a PGE₂ é a mais abundante prostaglandina produzida nos sítios inflamatórios, em doenças degenerativas como o Mal de Alzheimer e em vários tumores, como o de cólon, estômago e mama. Nessas enfermidades, a produção de PGE₂ ocorre em consequência da atividade de COX-2. Em algumas células tumorais, as prostaglandinas sintetizadas via COX-2 interagem com receptores celulares, estimulando sua proliferação, impedindo que entrem em apoptose, estimulando a expressão de fatores angiogênicos. Essas alterações, em conjunto, conferem às células tumorais crescimento autônomo e vascularização independente. A interação de PGE₂ com seus quatro receptores (EP1 - EP4) deflagra sinais próprios para cada receptor, que resulta em consequências metabólicas diferentes (Dubois et al., 1998; Murakami et al., 2000; Fitzpatrick, 2001).

1.2. Anti-inflamatórios, Fator Ativador de Plaquetas e Câncer

Os antiinflamatórios não esteróides (AINEs) são uma classe de substâncias químicas que apresentam a mesma ação terapêutica: inibem a atividade ciclooxigenase das COXs e, por consequência, a síntese de prostanóides (Furst, 1999). Dessa forma, os AINEs são mundialmente utilizados como antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos para o tratamento de simples processos inflamatórios assim como de doenças crônicas como artrite reumatóide e câncer. Os AINEs são atualmente classificados pela forma com que interagem com o sítio ativo das enzimas (Mitchell et al., 1993; Furst, 1999; Dannhardt & Kiefer, 2001):

1. Inibidores irreversíveis de COX-1/COX-2 – eles se ligam covalentemente ao sítio ciclooxigenase da enzima, modificando-o quimicamente, impedindo que o substrato, AA, possa ser utilizado. Exemplo: aspirina;
2. Inibidores competitivos e reversíveis de COX-1 e COX-2 – competem com o AA para se ligarem ao sítio catalítico da enzima. São exemplos o Ibuprofeno e o piroxicam;
3. Inibidores reversíveis, tempo-dependente, de COX-1/COX-2 – eles se ligam vagarosamente ao sítio ativo da enzima através de interações iônicas que diminuem a flexibilidade da enzima. Indometacina e flurbiprofeno;
4. Inibidores irreversíveis, tempo-dependente de COX-2 – modificam o sítio ativo de COX-2, mas de uma forma muito lenta. São exemplos o celecoxibe e o rofecoxibes.

Existem evidências epidemiológicas, experimentais e clínicas demonstrando que os AINEs têm propriedades anti-neoplásicas, principalmente por bloquearem a atividade de COX-2 e, por conseguinte, a síntese de PGE₂ (Mitchell & Warner, 1999; Lipsky, 1999). Inflamações crônicas causadas por infecções persistentes ou doenças auto-imunes estão associadas com aumento no risco de desenvolvimento de câncer, como, por exemplo, pacientes com Hepatite B, Hepatite C ou infecção por *Helicobacter pilory* apresentam alto risco de desenvolverem câncer no fígado ou no estômago, respectivamente. Por outro lado, observa-se maior expressão de RNAm (RNA mensageiro) para COX-2 e da própria proteína em tecidos tumorais, como de estômago, pulmão, cólon e mama. Dessa forma, há um grande interesse na utilização e fabricação de AINEs altamente específicos para COX-2, alvo para o tratamento de doenças inflamatórias e para prevenção do câncer, principalmente para pessoas predispostas geneticamente (Rothstein, 1998; Mitchell & Warner, 1999; Rainsford, 1999; Fosslie, 2000; Zha et al., 2004; Wang & Dubois, 2007).

A expressão aumentada de COX-2 nas células tumorais é invariavelmente acompanhada por níveis elevados de PGE₂. Cânceres como o coloretal, gástrico, pulmão, carcinoma hepatocelular, do esôfago, de próstata e de mama são exemplos onde o aumento da expressão de COX-2 é acompanhado por aumento da concentração de PGE₂ (Sano et al., 1995; Buckman et al., 1998; Hwang et al., 1998; Uefuji et al., 1998; Wolff et al., 1998; Koga et al., 1999; Yoshimura et al., 2000; Moran, 2002; Thun et al., 2002).

Além das prostaglandinas, outro importante mediador lipídico é o Fator Ativador de Plaquetas (PAF). A biossíntese de PAF também envolve a mobilização de fosfolipídios presentes nas membranas celulares e disponibiliza entre outros ácidos graxos, o ácido araquidônico. O PAF é um mediador fosfolipídico sintetizado por células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos, células endoteliais vasculares, que entre outras atividades biológicas provoca vasodilatação, contração de músculo liso, ativação de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Prescott et al., 1990; Pinckard et al., 1994). Exerce suas funções metabólicas através de receptores específicos, caracterizados por sete domínios transmembrana da superfamília de receptores acoplados à proteína G, que estão presentes nas faces externas da membrana plasmática e do retículo endoplasmático. Além das células inflamatórias, células tumorais podem sintetizar PAF e, às vezes, expressam também seus receptores (Izumi et al., 1995; Ishii et al., 2002).

Evidências experimentais indicam uma forte relação entre as vias de síntese de PAF e de eicosanóides. Dessa forma, a utilização de antagonistas do receptor de PAF (AR-PAF), em algumas situações, além de inibir a liberação de PAF reduz a síntese de leucotrienos, TXA₂ e de PGI₂ (Pei et al., 1998; Ichinowatari et al., 2002; Teather et al., 2002).

1.3. Câncer de mama e mediadores lipídicos

O carcinoma mamário afeta cerca de 1 em 12 mulheres, além de ser a principal causa de morte entre mulheres de 40 a 50 anos. Estudos a cerca desse carcinoma demonstraram que existe uma forte relação entre a patogênese dessa doença e a expressão de ciclooxigenases, particularmente de COX-2 nos tecidos tumorais (Soslow et al., 2000). Esse conjunto de dados reforça a idéia de que COX-2 é um dos principais marcadores para esse tipo de câncer e que a utilização preventiva de AINES pode reduzir significativamente o risco de aparecimento dessa neoplasia na população feminina. Por outro lado, estudos experimentais demonstraram que a atividade de COX-1 também está alterada em tumores mamários (Hwang et al., 1998), o que contradiz o que se acreditava sobre as funções fisiológicas dessa enzima, que sempre foi considerada a isoenzima constitutiva e que participava apenas de reações homeostáticas.

A utilização de AINEs, em baixas doses, como medida profilática para a prevenção do carcinoma mamário tem sido estudada em alguns países, pois COX-2 participa do processo carcinogênico. O aumento da expressão de COX-2 parece estar associado à perda de função de genes supressores tumorais. Em consequência, ocorre aumento da síntese de PGE₂, que por sua vez, se liga a um de seus receptores e induz expressão de COX-2, gerando uma via de retroalimentação positiva. A atividade ciclooxigenase de COX-2, utilizando alguns tipos de ácidos graxos provenientes da dieta, pode gerar carcinógenos, assim como a atividade peroxidase oxida compostos potencialmente carcinogênicos (Parret et al., 1997; Sing-Ranger et al., 2002; Horia et al., 2005).

O conhecimento sobre o comportamento de tumores mamários é, em parte, baseado em estudos in vitro, através de linhagens estabelecidas a partir de explantes tumorais.

Linhagens estabelecidas como a MDA-MB-231 e MCF-7 têm potenciais invasivos e metástáticos diferentes, em decorrência da expressão e não expressão de receptores hormonais, respectivamente (Lacroix & Leclercq, 2004; Dimri et al., 2005).

Além das linhagens humanas, as linhagens de tumores mamários murino também são utilizadas como modelo experimental, como é o caso do tumor mamário de Ehrlich. O tumor foi primariamente observado na glândula mamária, mas foi transplantado com sucesso para a cavidade peritoneal e para o tecido subcutâneo. O crescimento do tumor ascítico de Ehrlich é acompanhado por altas grandes concentrações de PGE_2 (Gentile, 2001) e a utilização de AR-PAF, BN 52021, reduziu significativamente o crescimento deste tumor (Fecchio et al., 1989).

1.4. Atividade das ciclooxigenases e Ressonância Paramagnética Eletrônica

Há grande interesse em avaliar a atividade das ciclooxigenases em tumores mamários, já que essas enzimas são expressas e participam do processo de transformação tumoral. No entanto, existem poucos métodos de avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2. Em 2006 foi proposta uma nova metodologia para avaliação de COX-1, através de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) (Turnbull et al., 2006). A RPE é utilizada para detectar radicais livres gerados pela atividade peroxidase de COX-1. A sonda CPH é adicionada à amostra e é oxidada pela enzima, gerando produto CP, que por ser estável e possuir um centro paramagnético pode ser detectado pelo aparelho de EPR (Figura 4).

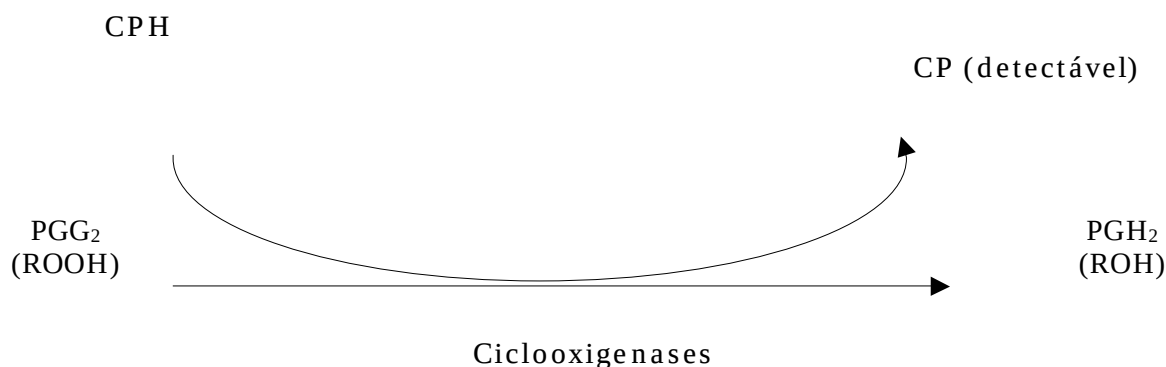
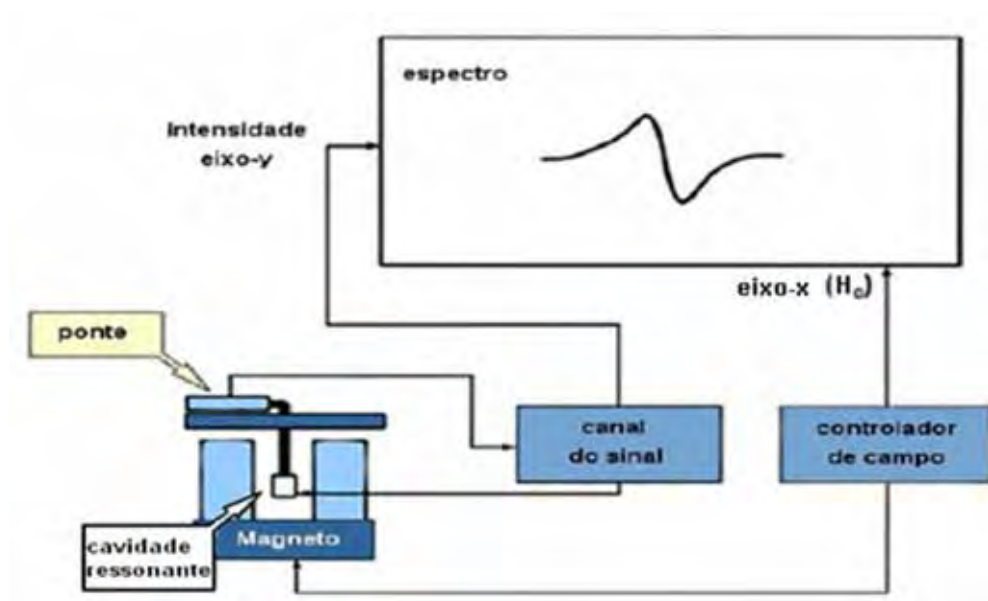


Figura 3. Diagrama esquemático da atividade peroxidase de COX. A enzima COX oxida o intermediário PGG₂ ao mesmo tempo que oxida a sonda CPH, gerando PGH₂ e CP (detectado pela Ressonância Paramagnética Eletrônica). Modificado de Journal of Inflammation 2006, 3:12.

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE), também conhecida como ressonância do spin eletrônico, é o nome dado ao processo de absorção ressonante de microondas por átomos, íons ou moléculas paramagnéticas, com ao menos um elétron desemparelhado na presença de um campo magnético. Considerando que bicamadas e vesículas não apresentam caráter paramagnético, é necessária a utilização do método do marcador de spin, que consiste na introdução de um grupo paramagnético no sistema a ser analisado. No caso de estudo de membranas-modelo, esse grupamento paramagnético geralmente é o radical nitróxido (N-O) e a molécula que o contém pode ser ligada ao sistema por meio de intercalação física entre os agregados.

A técnica espectroscópica de RPE detecta a absorção de energia de microondas em sistemas em que ocorre o fenômeno de paramagnetismo. Por questões de custo o aparelho de RPE utiliza um comprimento de onda fixo (frequência fixa) para a microonda e varre as diferentes energias de ressonância variando o campo magnético.

No caso de espectrômetros de banda X, a frequência de microondas produzida é de 9 GHz, a qual requer um campo magnético ($\overline{H_0}$) de 3.3kG que será convenientemente variado num intervalo de 100G.



A figura acima é um diagrama de blocos de um espectrômetro de RPE. A ponte de microondas contém tanto a fonte produtora de microonda, como um detector. A microonda produzida na ponte incide sobre a amostra que está numa cavidade localizada entre ímãs geradores do campo magnético variável. Após a ressonância e conseqüente absorção de energia pela amostra, a microonda é refletida para a ponte e terá sua intensidade detectada. A diferença entre a intensidade da microonda incidente e refletida será correspondente à intensidade de energia absorvida pela amostra. Esta quantidade de energia adquirida pela amostra corresponde à primeira derivada de um espectro de absorção.

A RPE é a técnica mais sensível no que se refere à detecção de radicais livres, portanto, será utilizada para avaliar a atividade das enzimas ciclooxigenases. As outras técnicas disponíveis, avaliam indiretamente a atividade das enzimas, pois determinam a etapa final de produção dos prostanóides. As mais utilizadas são as que determinam os níveis de tromboxana B₂, PGE₂, que não são produtos diretos da atividade das ciclooxigenases, mas sim da tromboxana-sintetase e prostaglandinaE-sintetase, respectivamente (Gierse et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardestani S.K., Inserra P, Solkoff DBS, Watson RR. The role of cytokines and chemokines on tumor progression. *Cancer Detect Prev.* 1999; 23(3): 215-225.

Atherton NM. Principles of electron resonance. Ellis Horwood, Great Britain, 1993.

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 723-729.

Capdevilla JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res.* 2000; 41(2): 163-181.

Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol.* 1997; 24: 15-19.

Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *Eur J Chem.* 2001; 36: 109-126.

DeWitt DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 1412-1416.

Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* 2005; 7: 171-179.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998; 12: 1063-1073.

Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984; 44: 4217-4223.

Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol.* 1989.

Fitzpatrick FA, Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest.* 2001; 107:1347-1351.

Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (cox)-2 inhibitors and molecular pathology of cox-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2000; 37(5): 431-502.

Furst DE. Pharmacology and efficacy of cyclooxygenase (COX) inhibitors. *Am J Med.* 1999; 107: 18S-22S.

Gentile LB. Modulação por PGE₂ no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).[dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Gierse JK, Zhang Y, Hood WF, Walker MC, Trigg JS, Maziasz TJ, Kobolt CM, Muhammad JL, Zweifel BS, Masferrer JL, Isakson PC, Seibert K. Valdecoxib: assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. *J Pharmacol Ther.* 2005; 312(3): 1206-1212.

Hanahan D, Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.

Horia E, Watkins BA. Comparison of stearidonic acid and α -linolenic acid on PGE₂ production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *J Nutrit Biochem.* 2005; 16: 184-192.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 455-460.

Ichinowatari G, Yamada M, Yaginuma H, Tsuyuki K, Tanimoto A, Ohuchi K. Participation of prostaglandin E2 and platelet-activating factor in thapsigargin-induced production of interleukin-6. *Eur J Pharmacol.* 2002; 434: 187-96.

Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Lip Mediat.* 2002; 68: 599-609.

Izumi T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor: gene regulation and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1259: 317-329.

Koga H, Sakisaba S, Ohishi M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 29(3): 688-696.

Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treatment*. 2004; 83: 249-289.

Lipsky PE. The clinical potencial of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med*. 1999; 106(5B): 51S-57S.

Marsh D. *Electron Spin Resonance: Spin labels*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1981; 51-141.

Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem*. 1988; 263: 3550-3553.

Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 11693-11697.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol*. 1999; 128: 1121-1132.

Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteriodal anti-inflammatory drugs as anti-cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol*. 2002; 21: 193-201.

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

Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol*. 1997; 24(49): 6-8.

Parret ML, Harris RL, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol*. 1997; 10: 503-508.

Pei Y, Barber L, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Dy LC, Fertel RH, Nguyen TM et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol*. 1998; 161: 1954-1961.

Pinckard RN, Woodard DS, Showell HJ, Conklyn MJ, Novak MJ, McManus LM. Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin Rev Allergy*. 1994; 12: 329-335.

Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem*. 1990; 265: 17381-17390.

Rainsford KD. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med*. 1999; 107: 27S-35S.

Rothstein R. Safety profiles of leading nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998; 105: 39S-43S.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(17): 3785-3789.

Sing-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *E J S O.* 2002; 28: 729-737.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. Cyclooxygenase-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumours. *Cancer.* 2000; 89: 2637-2645.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide-H synthases-1 and 2. *J Biol Chem.* 1996; 271: 33157-33160.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 145-182.

Teather LA, Lee RKK, Wurtman RJ. Platelet-activating factor increases prostaglandin E2 release from astrocyte-enriched cortical cell cultures. *Brain Res.* 2002; 946: 87-95.

Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 252-266.

Turnbull CM, McClure D, Rossi AG. A novel electron paramagnetic resonance-based assay for prostaglandin H synthase-I activity. *J Inflamm.* 2006; 3(12): 1-7.

Uefuji K, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 1998; 69: 168-172.

Vane JR, Bakhle YS, Boltting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38: 97-120.

Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut.* 2007; 55: 115-122.

Weil JA, Bolton JR, Wertz J E. *Electron Paramagnetic Resonance – elementary Theory and Pratical Applications*, 1994.

Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 4997-5001.

Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Ghargui J et al. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer.* 2000; 89: 589-596.

Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters.* 2004; 215: 1-20.

2. OBJETIVOS

Neste contexto, não há na literatura trabalhos avaliando a atividade das ciclooxigenases em células tumorais, através da Ressonância Paramagnética Eletrônica, correlacionando esta atividade com a produção de PGE_2 .

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar a atividade das ciclooxigenases, através de RPE, nas células do TAE e nas linhagens tumorais humanas, MDA-MB-231 e MCF-7, tratadas com BN 52021, Ibuprofeno, Indometacina, Meloxicam e Paracetamol;
2. Relacionar a dosagem de PGE_2 com a atividade enzimática.

Manuscrito 1

ATIVIDADE DAS CICLOOXIGENASES E SÍNTESE DE
PROSTAGLANDINA E₂ EM LINHAGENS DE ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO E EM CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Lízia Colares Vilela¹, Roberto Morato Fernandez², Denise Fecchio¹

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina-UNESP, Botucatu – SP, Brasil
2. Departamento de Física, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu –SP, Brasil

Correspondência: Denise Fecchio, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina,
UNESP, Botucatu-SP, Brasil. Telefone: 55 014 38116146

E-mail: dfecchio@fmb.unesp.br

INTRODUÇÃO

As prostaglandinas são produzidas através de uma complexa cascata enzimática, da qual participam as Prostaglandinas-H-sintetases, comumente conhecidas como ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2). A via de síntese de prostaglandinas dá origem a substâncias coletivamente denominadas prostanóides, que incluem: PGD₂ (Prostaglandina D₂), PGE₂ (Prostaglandina E₂), PGI₂ (Prostaciclina), PGF_{2α} (Prostaglandina F_{2α}) e TXA₂ (Tromboxano A₂)¹.

As ciclooxigenases participam de 2 das 3 etapas de produção dos prostanóides. Primeiramente adiciona duas moléculas de O₂ (ciclooxigenação) ao AA formando prostaglandina G₂ (PGG₂) e a seguir converte PGG₂ em prostaglandina H₂ (PGH₂), atividade peroxidase que consiste em adicionar 2 elétrons à molécula de PGG₂. Nos tecidos, a PGH₂ é convertida em PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α} e TXA₂². Portanto, tanto a COX-1 quanto a COX-2 participam da via de formação dos prostanóides. Dentre as prostaglandinas, a PGE₂ é a mais abundante prostaglandina produzida nos sítios inflamatórios e em vários tumores, como o de cólon, estômago e mama. Nessas enfermidades, a produção de PGE₂ ocorre em consequência da atividade de COX-2³⁻⁵.

Além das prostaglandinas, o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) é um mediador lipídico, gerado a partir de fosfolipídios presentes nas membranas celulares. Além das células inflamatórias, células tumorais podem sintetizar PAF e, às vezes, expressam também seus receptores. Alguns autores especulam a relação entre a síntese de prostanóides e de PAF, pois o estímulo do receptor de PAF aumenta a disponibilização de ácido araquidônico, substrato para as ciclooxigenases^{6,7}.

Os antiinflamatórios não esteróides (AINEs) são uma classe de substâncias químicas que apresentam a mesma ação terapêutica: inibem a atividade das COXs e, por consequência, a síntese de prostanóides⁸. Como o aumento na expressão de COX-2 está associado a um aumento no risco de desenvolvimento de tumores, a utilização de AINEs, em baixas doses, para a prevenção de carcinoma mamário tem sido estudada em alguns países⁹⁻¹¹.

Linhagens tumorais mamárias humanas são utilizadas como modelo experimental, assim como a de tumores murinos, como é o caso do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Os tumores mamários, tanto humanos quanto murino, são acompanhados de altas concentrações de PGE₂, provavelmente resultado da atividade de COX-2.

O presente trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar a atividade das ciclooxigenases e a síntese de PGE₂ nas linhagens de adenocarcinoma mamário humanas MDA-MB-231, MCF-7 e nas células do TAE tratadas com AINEs (ibuprofeno, indometacina, meloxicam e paracetamol) e Antagonista do Receptor de PAF, o BN 52021.

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliar a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 e a produção de PGE₂ pelas células neoplásicas, humanas e murina, frente aos tratamentos, foi feito o seguinte delineamento experimental:

As células, ajustadas para 1×10^6 cel/100 μ L, foram mantidas em cultura por 24 horas, antes de ser adicionado a elas qualquer tratamento. Decorrido este período, os tratamentos foram adicionados e as células avaliadas após 24 horas. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de PGE₂ e as células foram avaliadas quanto à atividade funcional de COX-1 e COX-2 através da Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Células Neoplásicas

Linhagens de câncer humanas

Foram utilizadas 2 linhagens permanentes provenientes de explantes de adenocarcinomas mamários humanos, MDA-MB-231 e MCF-7 que foram mantidas em condições estéreis em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As linhagens foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Célia Regina Nogueira.

As células da linhagem MDA-MB-231 não expressam receptores para estrógeno (RE-/RP-) e progesterona e as células MCF-7 apresentam ambos receptores (RE+/RP+).

Linhagem mamária murina

As células do Tumor de Ehrlich, apesar de originalmente mamárias, são mantidas na cavidade peritoneal de camundongos, em sua forma ascítica. Os camundongos suíços machos, 4 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas, São Paulo, foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, UNESP-Botucatu, onde receberam água e ração *ad libitum*.

Para a obtenção das células em condições estéreis, camundongos portadores de TAE foram eutanasiados (Rompun e Cloridrato de Cetamina) em capela de fluxo laminar e a cavidade peritoneal lavada com 3 mL de salina tamponada estéril (PBS). A suspensão celular foi obtida mediante punção com agulha e seringa, centrifugada a 200g por 10 minutos, a viabilidade determinada e só aceita quando superior a 95%.

Tratamentos

Foram utilizados quatro inibidores de síntese de PGE_2 , Indometacina (Sigma Chemical Co., USA), diluída em tampão Tris, 1M pH:8, na diluição de 1:10 em PBS, Ibuprofeno, Paracetamol e Meloxicam (EMS[®], Medicamentos genéricos) diluídos em PBS, pH:7,2, com 5% de DMSO. O antagonista de PAF utilizado, o BN 52021 (Biomol[®] International), foi diluído em PBS contendo 5% de DMSO.

A concentração utilizada dos tratamentos, previamente padronizada no laboratório, foi de 1 mM.

Cultura celular

As células neoplásicas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (MDA-MB-231 e TAE) ou 20% (MCF-7) de soro fetal bovino (SFB), 2mM de glutamina, mantidas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C, manipuladas em condições estéreis durante todo o período experimental.

Determinação da concentração de Prostaglandina E_2

A concentração de PGE_2 foi determinada no sobrenadante das culturas, através de ELISA competitivo de acordo com as especificações do fabricante (R&D Systems, Minneapolis).

A densidade celular foi ajustada para 1×10^6 cel/100 μ L em placas de 96 poços, onde as células foram submetidas aos tratamentos (BN 52021, Indometacina, Ibuprofeno, Meloxicam, Paracetamol e aos respectivos diluentes, Tampão Tris e PBS/5% de DMSO) por 24 horas. Transcorrido este tempo, o sobrenadante das culturas foi recolhido e estocado a -20°C , para a posterior dosagem.

Atividade das Prostaglandina-H-sintetases

A atividade das ciclooxygenases foi indiretamente determinada por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

Como os metabólitos gerados pela atividade das PGH-sintetases são muito instáveis foi necessário a utilização de uma sonda, que por sofrer redução, gera um composto estável, passível de ser quantificado. Dessa forma, foi adicionada a sonda CPH.hydrochloride ($\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Cl}$, 1-hidroxi-3-carboxi-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina.HCl, 1mM, Alexis® Biochemical) às células para a detecção de radicais livres, CP, gerados pela atividade peroxidase das enzimas Prostaglandina-H-sintetases. As enzimas contêm dois sítios ativos: um sítio COX, onde o Ácido Araquidônico é convertido a Prostaglandina G_2 (PGG_2) e o outro que reduz PGG_2 a PGH_2 , através da atividade peroxidase. A sonda é oxidada ao mesmo momento que ocorre a redução de PGG_2 a PGH_2 , formando um composto detectável pelo RPE, o CP (3-carboxi-proxi). Portanto, a intensidade do sinal gerado no espectro é proporcional à atividade peroxidase das PGHS.

Para otimizar o encontro da sonda com as enzimas e desorganizar as membranas celulares, as células foram submetidas a um ultra-som de ponta (ULTRASONIC CELL DISRUPTER, VIRSONIC DIGITAL 475W) por 10 minutos. Após 150 minutos em repouso, as amostras foram submetidas a um forte campo magnético no aparelho de EPR (Bruker, Germany). O sinal resultante, devido ao método utilizado na detecção, aparece no espectro sob a forma matemática da derivada da curva da absorção e a concentração dos radicais livres presentes pode ser calculada através da área sob a curva resultante.

Análise Estatística

Os dados obtidos da atividade das enzimas COX-1 e COX-2 e da produção de PGE₂ foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguidos pelo teste de Dunns. O nível de significância adotado foi de 5%. O software empregado na análise foi o SigmaStat (Jandel Corporation).

3. RESULTADOS

3.1. Atividade das enzimas COX-1/COX-2 e Síntese de PGE₂

3.1.1. Células do TAE

A pré-incubação das células do TAE com BN 52021 reduziu em 40% a formação do produto CP (Fig.1-B), que está diretamente relacionada à quantidade de radicais livres detectados pelo RPE. A redução da atividade das ciclooxigenases foi acompanhada pela inibição significativa de síntese de PGE₂, que foi inibida significativamente pela utilização de BN 52021 (Fig.2).

Apesar de Ibuprofeno ter reduzido em 46% a formação de radicais livres detectados pelo espectro de RPE (Fig.1-C), a síntese de prostaglandina não foi inibida na mesma intensidade (Figura 2).

A utilização de Indometacina provocou redução de 62% na atividade das enzimas, detectada pela formação do produto CP (Fig.1-D). Foi observado que a inibição da atividade enzimática levou a uma forte redução nos níveis de PGE₂ em consequência do tratamento com Indometacina (Fig.2).

A atividade das ciclooxigenases frente ao tratamento com Meloxicam foi reduzida em 46%, como pode ser observado pela intensidade do sinal (Fig.1-E), exatamente a mesma inibição causada pelo Ibuprofeno. Da mesma forma, os dois tratamentos não reduziram significativamente a síntese de PGE₂.

A discreta redução de 39% na quantidade de CP causada pelo tratamento com Paracetamol (Fig.1-F) foi correlacionada com a pequena inibição de síntese de PGE₂ (Fig.2).

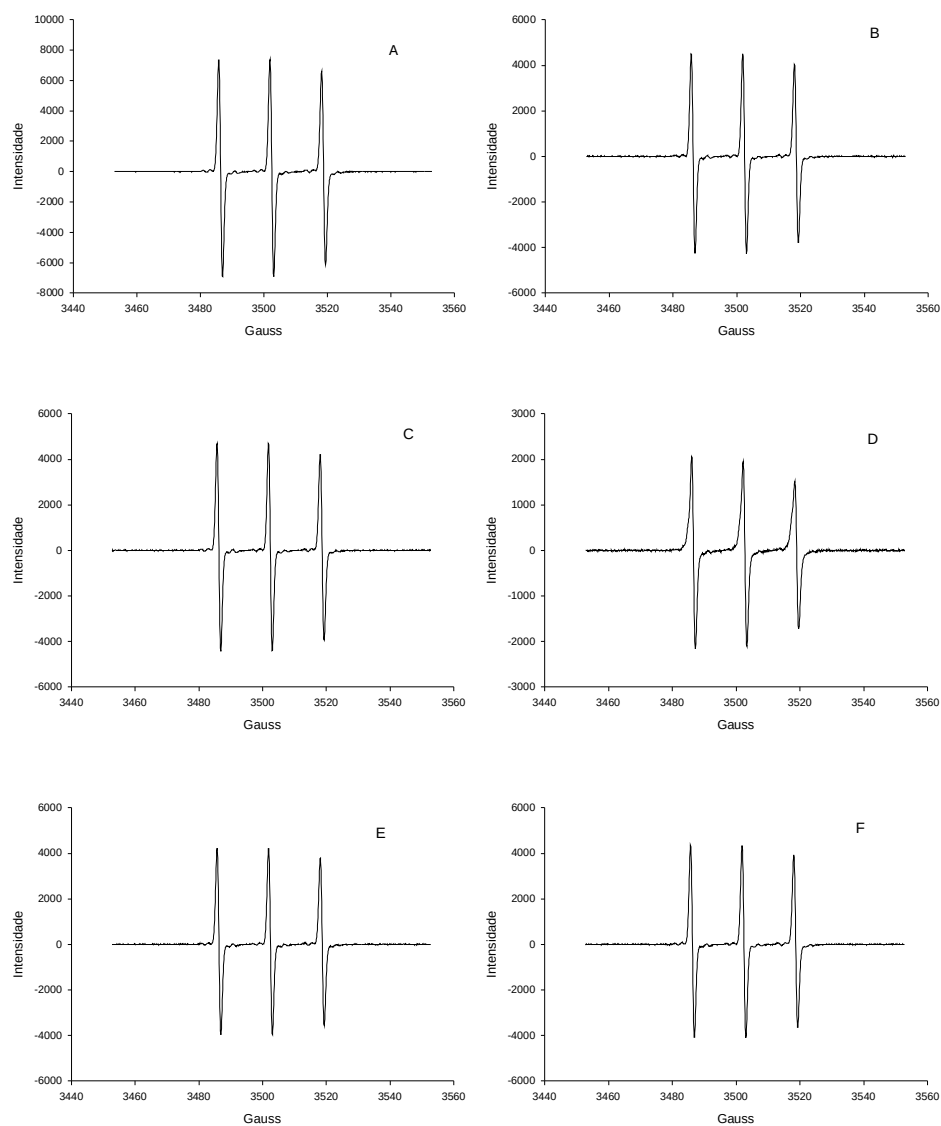


Figura 1 – Espectro de RPE obtido das células do TAE (A), na presença de BN 52021 (B), Ibuprofeno (C), Indometacina (C), Meloxicam (D), Paracetamol (E) depois da correção, para cada substância, do background por autoxidação. Critérios do EPR: Center Field: 3502,8 G; sweep time: 41,943 s; modulation amplitude: 0,5 G; microwave power: 1,013 mW.

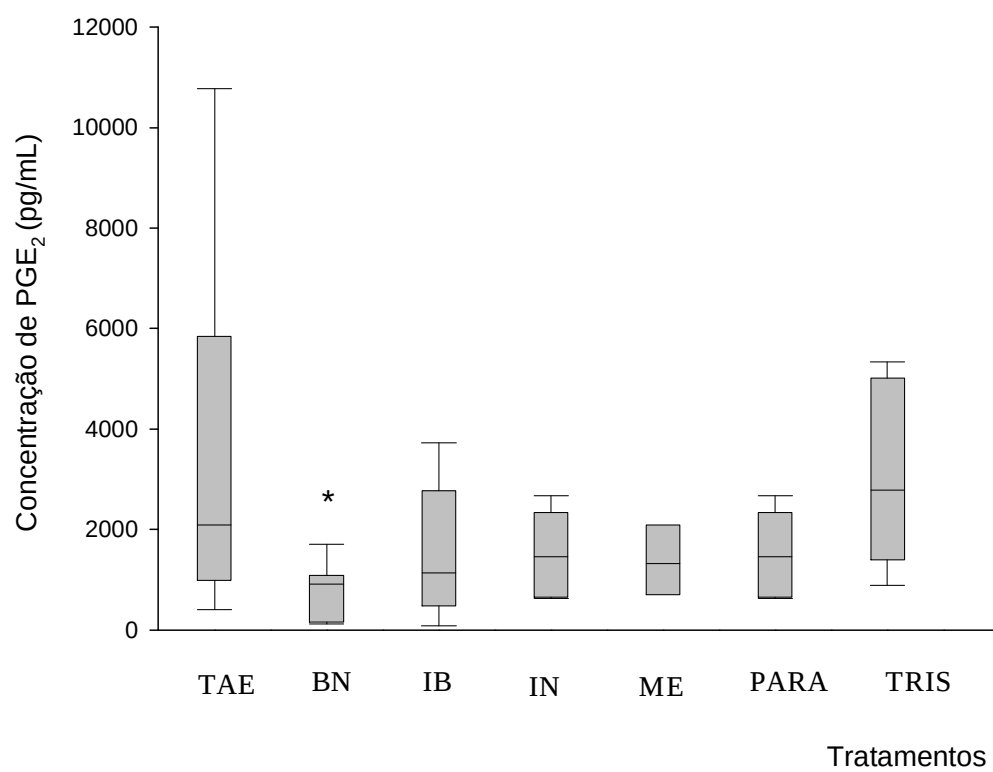


Figura 2 – Box-plot representando a concentração de PGE₂(pg/mL) produzida pelas células do TAE frente aos Tratamentos com BN 52021(BN), Ibuprofeno (IB), Indometacina (IN), Meloxicam (ME), Paracetamol (PA) e Tampão Tris (TRIS).
*p<0,05

MDA-MB-231

A quantidade de CP formada foi reduzida muito discretamente, como pode ser observado na Figura 3-B. Em consequência dessa fraca inibição enzimática, não ocorreu significante redução nos níveis de prostaglandina (Fig.4) produzidas por essa linhagem.

A pré-incubação das células com Ibuprofeno reduziu em 50% a atividade das ciclooxigenases (Fig.3-C), mas não inibiu com a mesma intensidade os níveis de PGE_2 (Fig.4).

A atividade enzimática foi fortemente inibida pela utilização de Indometacina (Fig.3-D), que foi acompanhada pela redução significativa nos níveis de PGE_2 produzidos pelas células (Fig.4).

A utilização de Meloxicam provocou redução de 43% na quantidade de CP formado (Fig.3-E) sem, no entanto, inibir com a mesma intensidade a síntese de PGE_2 .

Assim como aconteceu com as células do TAE, o tratamento com Paracetamol provocou redução discreta de 28% na atividade das ciclooxigenases (Fig.3-F) e, em consequência, não alterou a produção de PGE_2 pelas células MDA-MB-231.

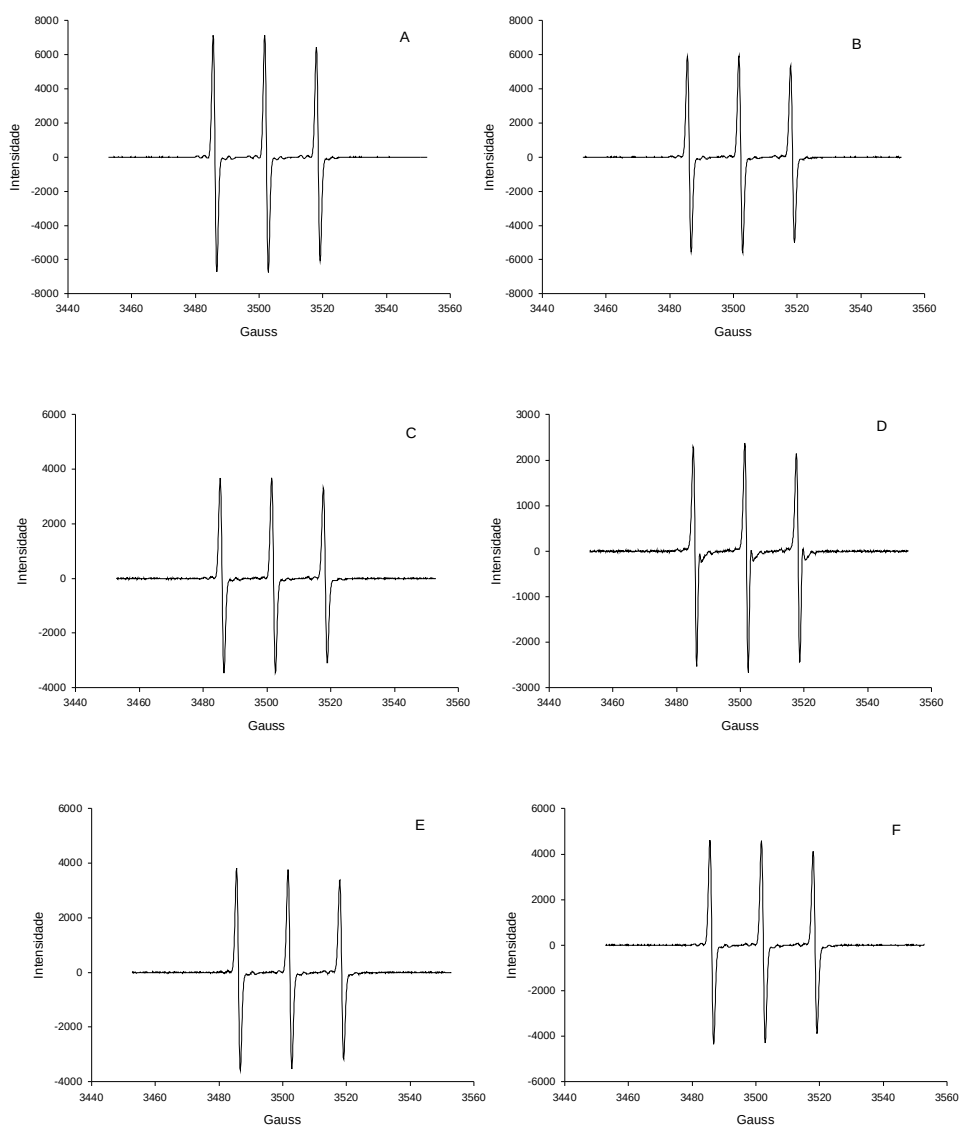


Figura 3 – Espectro de RPE obtido das células MDA-MB-231 (A), na presença de BN 52021 (B), Ibuprofeno (C), Indometacina (C), Meloxicam (D), Paracetamol (E) depois da correção, para cada substância, do background por autoxidação. Critérios do EPR: center field: 3502,8 G; sweet time: 41,943 s; modulation amplitude: 0,5 G; microwave powder: 1,013 mW.

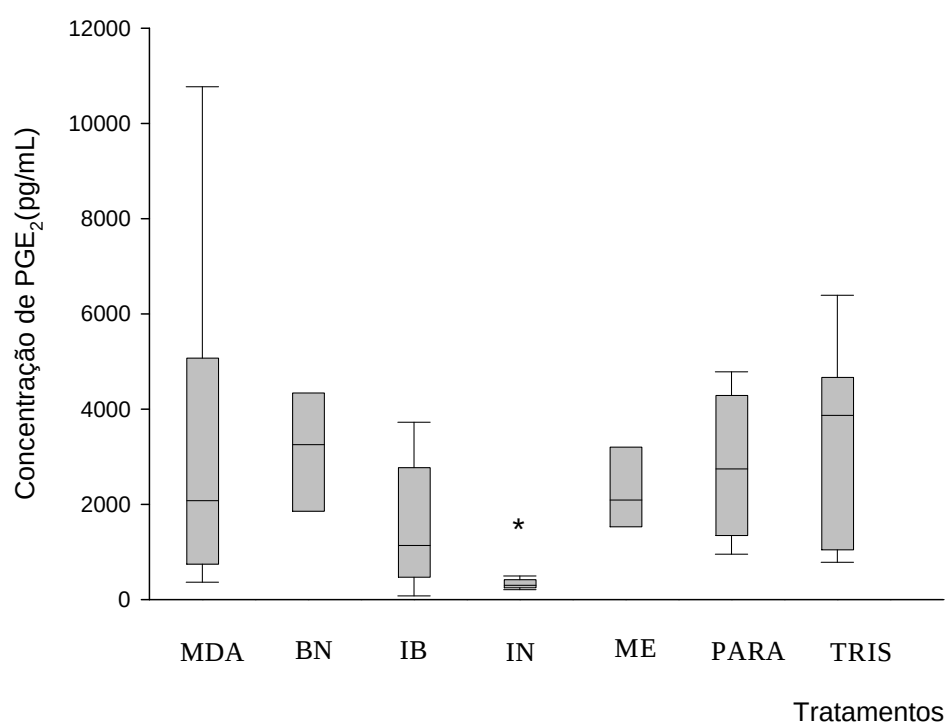


Figura 4 – Box-plot representando a concentração de PGE₂(pg/mL) produzida pelas células MDA-MB-231 frente aos tratamentos com BN 52021(BN), Ibuprofeno (IB), Indometacina (IN), Meloxicam (ME), Paracetamol (PA) e Tampão Tris (TRIS). **p<0,05.

MCF-7

O tratamento com BN 52021 provocou forte redução de 71% na concentração de CP gerado, em consequência, a atividade das enzimas COX-1/COX-2 foi fortemente inibida (Fig.5-B). Essa redução na atividade das enzimas refletiu na síntese de prostanóides, pois os níveis de PGE₂ também foram reduzidos significativamente (Fig.6).

A utilização de Ibuprofeno provocou redução de 49% na atividade enzimática (Fig.5-C), a qual foi acompanhada pela inibição significativa na síntese de PGE₂ (Fig.6).

Foi de 67% a redução na quantidade de CP formada pelo tratamento com Indometacina (Fig.5-D) e a síntese de PGE₂ foi significativamente inibida nessas células (Fig.6).

Meloxicam não alterou a quantidade de radicais livres formados e, por consequência, a atividade das ciclooxigenases não foi reduzida (Fig.5-E). O mesmo pode ser observado em relação aos níveis de PGE₂ que não foram afetados pelo tratamento com essa droga (Fig.6)

Apesar de Paracetamol ser considerado fraco inibidor das Ciclooxigenases, provocou redução de 41% na formação do produto CP (Fig.5-F) sem, no entanto inibir significativamente a formação de prostaglandina (Fig.6).

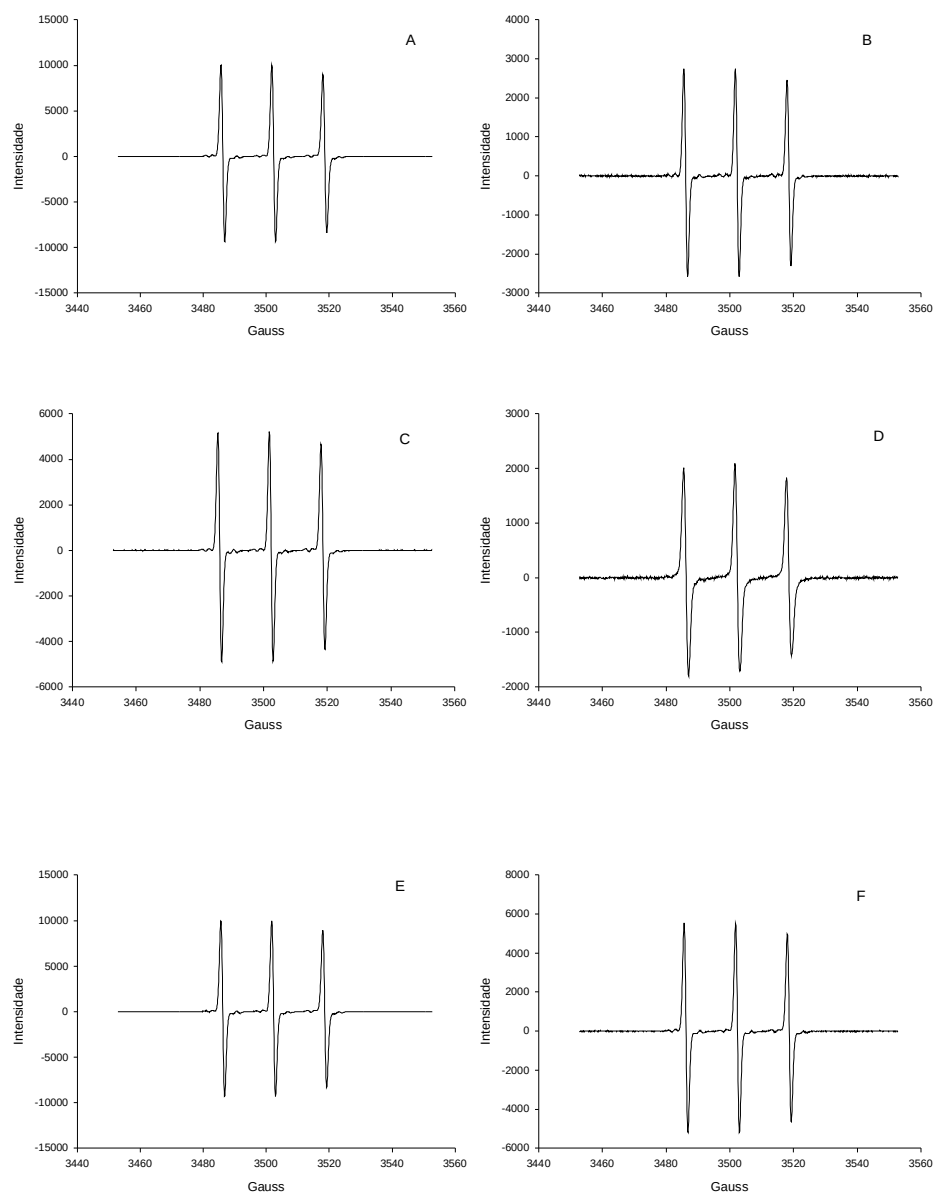


Figura 5 – Espectro de RPE obtido das células MCF-7 (A), na presença de BN 52021 (B), Ibuprofeno (C), Indometacina (C), Meloxicam (D), Paracetamol (E) depois da correção, para cada substância, do background por autoxidação. Critérios do EPR: Center Field: 3502,8 G; sweet time: 41,943 s; modulation amplitude: 0,5 G; microwave powder: 1,013 mW.

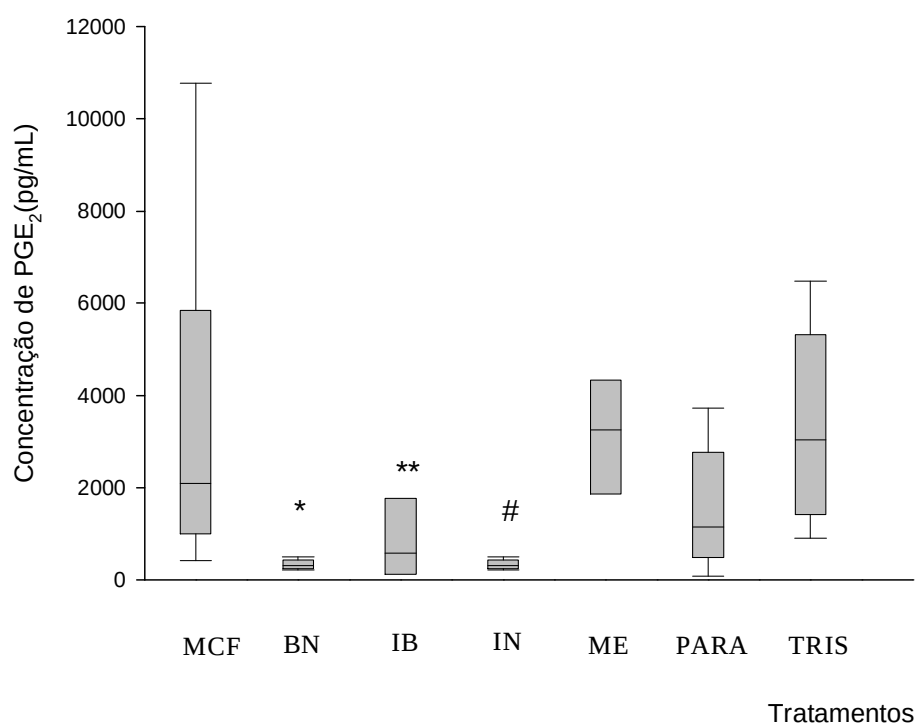


Figura 6 – Box-plot representando a concentração de PGE₂(pg/mL) produzida pelas células MCF-7 frente aos tratamentos com BN 52021(BN), Ibuprofeno (IB), Indometacina (IN), Meloxicam (ME), Paracetamol (PA) e Tampão Tris (TRIS). *,#, **p<0,05.

Percentual de Inibição Enzimática detectada por RPE e síntese de PGE₂

Foi determinada primeiramente a concentração de radicais livres, obtida através da segunda derivada sob a curva do espectro de RPE. As linhagens controle não receberam nenhum tratamento, portanto, foi atribuída a elas 100% de atividade das ciclooxygenases. Assim, o percentual de inibição foi determinado subtraindo a concentração de radicais livres diante do tratamento pela concentração observada no grupo controle. Os valores de mediana se referem aos obtidos em relação à dosagem de PGE₂, em cada grupo. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo.

	TAE	Mediana	MDA	Mediana	MCF-7	Mediana
Controle	100%	2094	100%	2077	100%	2100
BN 52021	40%	911	8%	3258	71%	301
Ibuprofeno	41%	1139	50%	1139	49%	571
Indometacina	72%	317	58%	301	67%	310
Meloxicam	61%	1464	43%	2093	4%	1139
Paracetamol	55%	1321	28%	2751	41%	3258

DISCUSSÃO

As três linhagens avaliadas sintetizaram PGE_2 em concentrações diferentes.

A utilização de diferentes classes de AINEs bem como de AR-PAF reduziu heterogeneamente a atividade das ciclooxigenases e, como consequência, a síntese de PGE_2 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 e nas células do TAE.

O antagonista do receptor de PAF, BN 52021, apesar de não ter afinidade conhecida pelos sítios catalíticos das enzimas, inibiu a atividade ciclooxigenase e a síntese de PGE_2 nas células do Tumor Ascítico de Ehrlich e nas células da linhagem MCF-7. Por outro lado, não alterou os mesmos parâmetros na linhagem MDA-MB-231. O mecanismo exato que esclarece a ligação entre PAF e as ciclooxigenases não está esclarecido, mas PAF pode se ligar à fosfolipase A_2 estimulando a liberação de ácido araquidônico, substrato preferido pelas COXs¹¹. Ainda, receptores de PAF estão localizados nas membranas de organelas como o Retículo Endoplasmático, um dos locais que as ciclooxigenases estão presentes. Da mesma forma, em células normais, a ativação do receptor de PAF induz expressão de COX-2 e aumenta a liberação de PGE_2 . De maneira inversa, o bloqueio do receptor de PAF pode interferir através de feedback negativo, diminuindo a disponibilidade de AA, substrato para a atividade das ciclooxigenases e, por consequência, reduzindo a formação de PGH_2 . Sendo esse intermediário precursor de todos os prostanóides, a síntese de PGE_2 diminuiria em consequência do tratamento com BN 52021¹².

Quando camundongos portadores de TAE foram tratados com BN 52021, o crescimento tumoral foi reduzido em 80%. Da mesma forma, a liberação de PGE_2 pelas células do TAE, in vitro, foi significativamente inibida quando tratadas com BN 52021¹³

O que pode explicar a maneira pela qual BN 52021 afeta diferencialmente as linhagens estudadas pode ser a presença ou ausência de receptores para PAF nas células tumorais. Diante do que foi exposto, há fortes evidências que as células do TAE e MCF-7 expressam receptores de PAF e que BN funciona como substância anti-tumoral por inibir a liberação de PGE_2 .

A atividade enzimática foi reduzida pelo tratamento com Ibuprofeno, nos três tipos celulares, praticamente na mesma proporção de 50%, como detectado pela RPE. No entanto, inibiu significativamente a síntese de PGE_2 apenas na linhagem MCF-7. Este AINE inibe reversivelmente COX-1 e COX-2, apesar de se ligar preferencialmente ao sítio de COX-1^{14,15}. Como o ibuprofeno compete com ácido araquidônico pelo sítio catalítico da enzima e essa interação é transitória e rápida, a redução da atividade enzimática, no momento avaliado, pode ou não ser acompanhada pela conseqüente inibição da síntese de prostaglandinas. Como Ibuprofeno reduziu a atividade enzimática em torno de 50% na linhagem MCF-7, estas células devem expressar tanto COX-1 quanto COX-2, pois a ligação preferencial ao sítio de COX-1 não inviabiliza a síntese de PGE_2 através de COX-2. Assim, as outras duas células avaliadas, TAE e MDA-MB-231, talvez expressem mais COX-2 que COX-1. Além disso, a expressão de ProstaglandinaE-sintetase, que completa a síntese de PGE_2 , não foi avaliada; dessa forma pode haver diferenças de expressão dessa enzima nas linhagens estudadas. Apesar de não haver na literatura trabalhos avaliando a expressão das ciclooxigenases no TAE, as células MDA-MB-231 sintetizam muitas cópias de COX-2. No entanto, a utilização de PCR em tempo real poderá confirmar o que há na literatura, já que ocorrem freqüentes alterações genéticas em células tumorais mantidas em cultura por longos períodos.

Indometacina, inibidor lento e reversível de COX-1/COX-2, reduziu fortemente tanto a atividade enzimática quanto a síntese de PGE_2 , nos três tipos celulares estudados.

A inibição ocorre vagarosamente, tempo-dependente, porque a Indometacina penetra profundamente através do canal hidrofóbico de COX, preferencialmente COX-1, causando alterações conformacionais, mas sem provocar alterações químicas no sítio catalítico¹⁴. Como a avaliação da atividade das enzimas e da produção de prostaglandina foi feita após 24 horas que o tratamento estava em contato com as células, houve tempo suficiente para que Indometacina interagisse com o sítio catalítico de COX e, portanto, a síntese de PGE₂ foi coerentemente inibida nas células avaliadas.

Como a Indometacina é considerada inibidor inespecífico das COXs¹⁶, somente com a avaliação por RPE não é prudente sugerir qual ou quais enzima(s) é (são) expressa(s) nestas células tumorais.

Meloxicam se liga reversivelmente às duas isoenzimas, mas preferencialmente à COX-2^{17,18}. Nas linhagens MDA-MB-231 e no TAE, o tratamento com meloxicam inibiu a atividade enzimática em torno de 45%, mas na linhagem MCF-7 a inibição foi insignificante. Em nenhuma das linhagens avaliadas, Meloxicam provocou redução significativa nos níveis de PGE₂. Em vista dos resultados discutidos, provavelmente as células da linhagem MDA-MB-231 e do TAE expressem ambas enzimas, no entanto, maior expressão de COX-2. Já a linhagem MCF-7 deve traduzir pouca quantidade de proteína COX-2.

A utilização de Paracetamol reduziu discretamente tanto a atividade enzimática quanto os níveis de PGE₂. Este antiinflamatório é classificado como fraco inibidor da atividade ciclooxigenase, no entanto, é eficaz como analgésico e antipirético. Paracetamol parece exercer seus efeitos principalmente no sistema nervoso central. Foi recentemente descrito como inibidor da atividade de uma terceira COX, a COX-3. Esta enzima, assim como COX-1, é produto da atividade do gene COX-1, mas que durante a maturação do RNA mensageiro, retém um íntron a mais que COX-1. COX-3 é abundante no córtex cerebral humano, de cães e no tecido cardíaco humano¹⁹.

Como consequência, paracetamol inibe apenas discretamente a síntese de prostaglandinas. Dessa forma, os resultados obtidos confirmam os já descritos na literatura em relação à fraca inibição das ciclooxigenases causada pelo tratamento com Paracetamol.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Diante dos resultados que obtivemos, as linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e as células do Tumor Ascítico de Ehrlich sintetizam PGE_2 ;
2. Provavelmente as células do TAE e da linhagem MCF-7 expressem receptores para PAF, o que não ocorre com as células da linhagem MDA-MB-231;
3. A expressão de COX-2 e COX-1 é diferente nas linhagens avaliadas;
4. A Ressonância Paramagnética Eletrônica é uma técnica muito eficiente para avaliação das ciclooxigenases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Capdevilla JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res.* 2000; 41(2): 163-181.
2. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide-H synthases-1 and 2. *J Biol Chem.* 1996; 271: 33157-33160.
3. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998; 12: 1063-1073.
4. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nkatari Y, Kojima F, Ikeda T et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000; 275: 32783-32792.
5. Fitzpatrick FA, Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1347-1351.
6. Izumi T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor: gene regulation and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1259: 317-329. Ardestani SK, Inserra P, Solkoff DBS, Watson RR. The role of cytokines and chemokines on tumor progression. *Cancer Detect Prev* 1999; 23(3):215-25.

7. Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. Prostaglandins Lip Mediat. 2002; 68: 599-609. Borden EC, Sondel PM. Lymphokines and cytokines as cancer treatment: immunotherapy realized. Cancer 1990; 65:800-14.
8. Furst DE. Pharmacology and efficacy of cyclooxygenase (COX) inhibitors. Am J Med. 1999; 107: 18S-22S.
9. Parret ML, Harris RL, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. Int J Oncol. 1997; 10: 503-508. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. Biochem J 1994; 300:281-90.
10. Sing-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. E J S O. 2002; 28: 729-737.
10. Horia E, Watkins BA. Comparison of stearidonic acid and α -linolenic acid on PGE₂ production and COX-2 protein levels in MDA-MB-231 breast cancer cell lines. J Nutrit Biochem. 2005; 16: 184-192.
11. Van Snick J. Interleukin-6. Ann Ver Immunol 1990; 8:253-78.
12. Ichinowatari G, Yamada M, Yaginuma H, Tsuyuki K, Tanimoto A, Ohuchi K. Participation of prostaglandin E₂ and platelet-activating factor in thapsigargin-induced production of interleukin-6. Eur J Pharmacol. 2002; 434: 187-96.

13. Pei Y, Barber L, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Dy LC, Fertel RH, Nguyen TM et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol.* 1998; 161: 1954-1961.
14. Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol.* 1989.
15. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *Eur J Chem.* 2001; 36: 109-126.
16. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104(3A):2S-8S.
17. Lipsky PE. The clinical potencial of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med.* 1999; 106(5B): 51S-57S.
18. FitzGerald GA, Patrono C. Drug Therapy: The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345(6):433-442.
19. Whittle BJR. COX-1 and COX-2 products in the gut: therapeutic impact of COX-2 inhibitors. *Gut* 2000; 47(3):320-325.
20. Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN. Prostaglandins, Leukotrienos and Essential Fatty Acids. 2003; 69: 339-343.