

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA

EFEITOS DO CELECOXIBE EM RATOS  
SUBMETIDOS AO MODELO DE CÂNCER  
WALKER-256

CURITIBA  
2008

AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA

EFEITOS DO CELECOXIBE EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
CÂNCER WALKER-256

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexandra Acco.

CURITIBA  
2008

Dedico esse trabalho

A três estrelas que iluminam meus passos...

*Arthur*

*Marina*

*Yolanda*

## AGRADECIMENTOS

Com muito respeito, agradeço aos animais utilizados nos experimentos, que tornaram possíveis esses resultados.

Agradeço à minha orientadora Alexandra Acco, por sua imensa dedicação e amizade, paciência com meus atrasos e plantões, e pelos ensinamentos durante esses dois anos.

Uma pessoa mais do que especial foi a nossa "IC de Ouro" do laboratório, Daiana. Obrigada mesmo, pela companhia, seja no lab, no biotério, na USP ou na Fesbe; pelos sábados e domingos de repique; pela parceria nas imitações de Calypso e Marrone (hahaha); por me ouvir reclamando e falando muita bobagem; pela ajuda na interpretação de resultados e discussões do trabalho. Também agradeço aos meus grandes amigos Adriana e Thiago, pela companhia e ajuda nos experimentos (foram tantos!) e nas disciplinas, e à amiga Anabel, pelo apoio na confecção das lâminas de histopatologia. Podem ter certeza que o trabalho que está aqui é de todos nós!!!

Quero agradecer imensamente ao pessoal dos laboratórios do Departamento de Farmacologia, que nos auxiliaram com técnicas utilizadas no trabalho: Toxicologia Ambiental (Cris, Luciana, Stéfani), Produtos Naturais (Bárbara, André) e Inflamação (Laryssa, Evelise). Aos professores responsáveis, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, do Lab. de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres, da USP, pela acolhida e oportunidade. Em especial à Simon, Simoninha e Carly, por toda ajuda e dedicação nos ensaios realizados. Agradeço aos amigos Ângela e Marcelo por disponibilizarem com tanta confiança a sua casa para a nossa estadia em São Paulo.

Obrigada também às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Silvia Cadena e Maria Eliane Merlin Rocha, do Departamento de Bioquímica da UFPR, por toda a orientação dada nos experimentos de isolamento mitocondrial. Novamente, agradeço aos meus colegas de laboratório Daiana, Thiago e Jonas pelo trabalho dedicado.

Ao Prof. Dr. Luis Cláudio Fernandes, Doutoranda Fabíola e Mestrando Luis Alexandre, do Laboratório de Metabolismo do Depto de Fisiologia, pelo fornecimento de material e orientação em alguns experimentos. Também agradeço ao Fernando (Biologia Celular), pela disponibilidade em me auxiliar com os dados.

Agradeço à Professora Doutora Lucélia Donatti (Biologia Celular) pela orientação com a microscopia eletrônica, sempre muito disposta a ajudar-nos, e ao amigo Eduardo Masuda (Patologia Veterinária - UFSM) pelo grande auxílio com as lâminas de microscopia óptica.

Também quero agradecer aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, que com certeza contribuíram muito para a minha formação.

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto.

Agradeço aos colegas de trabalho das Clínicas Veterinárias em que trabalhei, assim como agradeço a todos os meus pacientes, felinos e caninos, que sempre conseguem arrancar um sorriso meu, simplesmente por serem as criaturas mais fantásticas que existem.

Peço desculpas pela falta de dedicação exclusiva, mas tenham certeza que dei o máximo de mim para conciliar os trabalhos. Também tenho que lembrar dos meus animaizinhos Truta-Truta, Chaplin-Nenê, Mozart e Lilica, somente por existirem na minha vida!

Finalmente, estou aqui para agradecer às pessoas mais importantes da minha vida: minha família!

Mãe e pai: como é grande o meu amor por vocês. Desculpem a ausência, o mau-humor e as lágrimas. Saibam que nos momentos mais difíceis da minha vida tudo o que quero é voltar ao tempo em que eu corria para a cama de vocês no meio da madrugada. Mas me dou conta que, além de ser obviamente impossível, o que devo fazer é garantir o meu futuro, e então, o que mais desejo mesmo é ser motivo de orgulho pra vocês. Porque eu tenho muito orgulho de ser sua filha! Agradeço o amor e carinho de meus irmãos Walkyria e Alysso, dos meus cunhados Itamar e Elizângela e do meu sobrinho Gustavo (nosso príncipezinho).

Um agradecimento especial às minhas segundas-mães e tias: Sonia (minha dinda), Maria Aparecida e Arminda, pelo apoio dado desde o tempo da graduação. Ao tio Carlos Augusto, agradeço igualmente. À minha tia Wilma, obrigada pelas orações. À minha prima e amiga Lia, pelas palavras de apoio e carinho. Ao meu primo Joaquim, agradeço a companhia nesses dois anos de convivência diária. Aos meus demais tios, tias, primos e primas, e meu avô, obrigada por toda a torcida!!!

Também é importante agradecer aos amigos!!! Amigos de infância (Fabi) e de faculdade (Clau, Ana, Glê, Guilherme – agora da Farmaco!!!) que nos acompanham sempre... Eu adoro vocês!

Aos muitos amigos do Departamento de Farmacologia, obrigada, muito obrigada, por todos os momentos inesquecíveis de parceria, amizade, risadas (mesmo que em um saquinho, hahaha) e festas. Tefa, Babi, Juli, André, Pamela, e todos os demais, que me foram companhia, ombro amigo e conselheiro... Seremos sempre Farmaco People!!! Há também outro agradecimento, especial e bobinho, escrito no meio desses na tentativa de ser discreta. *Chop, um beijo, te amo pra todos vocês, "hihihihi".*

E, para finalizar, agradeço a Deus por tudo o que me concedeu, ao meu Anjo da Guarda por toda a proteção (acho que teve trabalho, mesmo) e à Nossa Mãe do Céu, por nos ensinar que quando dizemos Sim a uma missão dada por Deus, abraçamos todas as dificuldades que com ela caminham. Que ela sempre interceda por nós junto a seu Filho, e eu somente sou grata a tudo que passei, de bom e de "não tão bom", durante todo esse período!

Eu me coloco inteiramente ao vosso dispor, com tudo o que sou e o que tenho, com o que sei e o que não sei, com todas as minhas capacidades e incapacidades, mas, acima de tudo, com o meu coração.

José Kentenich

## RESUMO

Devido à elevada morbidade e mortalidade associadas a cânceres, novas terapias que consigam controlar o desenvolvimento de tumores e síndromes paraneoplásicas são constantemente buscadas na terapêutica oncológica. Um conceito relativamente atual acerca deste tema é a chamada quimioprevenção, uma tentativa farmacológica de reduzir a mortalidade em algumas neoplasias, como no câncer cólon-retal. Dentre os fármacos que despontam como possíveis antineoplásicos e quimioprotetores estão os antiinflamatórios não esteroidais inibidores seletivos da ciclooxigenase-2, como o celecoxibe.

Este estudo investigou os efeitos do celecoxibe (25 mg/kg) no tumor Walker-256 em ratos, após inoculação de células tumorais ( $10^7$  células) e 14 dias de tratamento. Para tanto, foram avaliados o crescimento tumoral, ganho de peso corporal, taxa de sobrevivência e indicadores de seu mecanismo de ação (expressão e atividade de COX-2, envolvimento em vias de estresse oxidativo e apoptose celular).

Os resultados mostraram que o celecoxibe reduziu significativamente o crescimento tumoral - sendo essa redução de aproximadamente 85% e 90% para volume e massa tumoral, respectivamente - e aumentou o ganho de peso corporal em torno de 50%. Além disso, o celecoxibe proporcionou uma maior sobrevivência dos animais tratados, em comparação aos ratos controle, com tumor e tratados apenas com tampão Tris pH 8,6. As ações celulares responsáveis por esses efeitos são possivelmente independentes de COX-2, pois tanto a expressão da enzima, medida através de *western blotting*, quanto a sua atividade - aferida indiretamente através da medida de Prostaglandina E<sub>2</sub>- não apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado e controle. Possivelmente essa ação antitumoral é dependente de mecanismos apoptóticos, avaliados através da expressão de uma proteína antiapoptótica (Bcl-<sub>xL</sub>) e alterações observadas em microscopia eletrônica. Também há um possível envolvimento do fármaco na regulação do equilíbrio redox do organismo, fato comprovado pela alteração na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como catalase e superóxido-dismutase, embora a atividade de oxidases mitocondriais não tenha sido recuperada pelo celecoxibe.

Esses resultados corroboram dados da literatura, com outros tipos de neoplasia, e confirmam os efeitos antitumorais do celecoxibe, além de contribuir na elucidação do possível mecanismo por onde esse antiinflamatório atua como antitumoral.

Palavras-chave: câncer; neoplasia; Walker-256; celecoxibe.

## ABSTRACT

Cancer is a disease with great morbidity and mortality, so it has always been sought newer ways of therapy to control tumor development. A current concept about this topic is the chemoprevention, a pharmacological tentative to decrease mortality in some types of cancer, as colorectal tumor. Among these possible antineoplastic and chemopreventive drugs there are the nonsteroidal anti-inflammatories COX-2 selective, like celecoxib.

This study was conducted to investigate the celecoxib antitumoral properties using Walker-256 cells inoculated subcutaneously ( $10^7$  cell) in rats submitted to treatment with celecoxib (25 mg/kg) for 14 days. For this purpose, tumor growth, body weight gain and survival data were evaluated. Further mechanisms, like COX-2 expression and activity, oxidative damage and apoptosis mediators were also investigated.

Results have demonstrated a significant decrease in tumor growth – this reduction was about 85% and 90%, for volume and tumor weight, respectively - and increased weight gain (around 50%). Celecoxib also provided a higher survival incidence compared to the control group (treated with pH 8.6 Tris buffer). Cellular effects are probably COX-2 independent, because neither enzyme expression nor its activity (assessed indirectly by Prostaglandin  $E_2$  assay) have not showed significant difference between the control and treatment group. Probably this antitumor action is dependent of an apoptotic way, which was evaluated by expression of an antiapoptotic protein (Bcl-<sub>xL</sub>) and cellular changes observed by electronic microscopy. Celecoxib has also a possible involvement with the redox homeostasis, because its treatment caused changes in some oxidative enzymes activity, like catalase and superoxide dismutase, despite the mitochondrial oxidases kept the same activity. These results corroborate with scientific literature obtained with other types of cancer and confirm the celecoxib antitumor effects, beyond contribute to find out the possible antitumoral mechanism of this non steroidal anti-inflammatory.

Key words: cancer, neoplasia, Walker-256, celecoxib.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01.** Volume do tumor Walker-256 dos grupos controle e celecoxibe ao final do tratamento.....26
- Figura 02.** Valores de massa tumoral, em gramas, dos grupos controle e celecoxibe, ao final do tratamento.....27
- Figura 03.** Variação de peso dos grupos controle e celecoxibe durante o período de tratamento, calculada pela diferença entre o peso no primeiro e 14<sup>o</sup> dia de experimento, descontado o peso final do tumor.....27
- Figura 04.** Taxa de sobrevivência dos grupos controle e celecoxibe durante o período de 30 dias de tratamento.....28
- Figura 05.** Expressão tecidual da enzima ciclooxigenase-2 por *western blotting* em tecido tumoral, convertida em unidades arbitrárias através de densitometria, nos grupos controle e celecoxibe.....29
- Figura 06.** Fracas bandas de *western blotting*, evidenciando a baixa expressão de COX-2 em tecido hepático.....29
- Figura 07.** Valores de prostaglandina E<sub>2</sub> (pg/mL) na urina, representada no gráfico A, e em tecido tumoral, representada no gráfico B, nos grupos controle e celecoxibe.....30
- Figura 08.** Avaliação da atividade seqüestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelo celecoxibe.....31
- Figura 09.** Atividade da enzima catalase hepática no gráfico (A), e tumoral no gráfico (B), após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris).....32
- Figura 10.** Atividade da enzima superóxido-dismutase hepática (A) e tumoral (B) após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris).....32
- Figura 11.** Atividade enzimática de glutiona-S-transferase (GST), em fígado, após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris).....33

**Figura 12:** Taxa de peroxidação lipídica (LPO) em tecido hepático, representada no gráfico (A), e tecido tumoral, representada no gráfico (B), após tratamento com o celecoxibe, comparadas com o grupo controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris).....34

**Figura 13.** Atividade da enzima NADH oxidase, medida em consumo de oxigênio pelo método polarográfico, em mitocôndrias hepáticas isoladas após 14 dias de tratamento nos grupos A (Basal = animais hígidos tratados com tampão tris), B (animais hígidos tratados com celecoxibe), C (animais com tumor tratados com tampão tris) e D (animais com tumor tratados com celecoxibe).....34

**Figura 14.** Atividade da enzima Succinato oxidase, medida em consumo de oxigênio pelo método polarográfico, em mitocôndrias hepáticas isoladas após 14 dias de tratamento nos grupos A (Basal = animais hígidos tratados com tampão tris), B (animais hígidos tratados com celecoxibe), C (animais com tumor tratados com tampão tris) e D (animais com tumor tratados com celecoxibe).....35

**Figura 15.** Expressão da enzima antiapoptótica *Bcl-X<sub>L</sub>*, em tecido tumoral, convertida em unidades arbitrárias através de densitometria, nos grupos controle (C) e tratado com celecoxibe (T).....35

**Quadro 01.** Características histopatológicas avaliadas em cortes de fígado e tumor Walker-256 em ratos tratados com celecoxibe e controle.....37

**Figura 16.** Microscopia óptica de células do tumor Walker-256, mostrando o predomínio de células epiteliais em (A), de animais do grupo Celecoxibe e destacado na seta preta, considerado assim um carcinoma. Em (B), destaca-se a presença de células epiteliais (seta negra) juntamente com mesenquimais (seta vermelha), sendo essa lâmina proveniente de tumor de animal pertencente ao grupo Controle, e esse fragmento classificado como carcinosarcoma.....37

**Figura 17.** . Microscopia óptica de fígado de ratos tratados com celecoxibe, revelando a presença de vacuolização celular, em (A), como destacado pela seta; e tumefação celular, indicada em (B) pela seta.....38

**Figura 18.** Microscopia eletrônica de células do tumor Walker-256. **A** = grupo controle, evidenciando núcleo eucromático e heterocromatina periférica, destacada pela seta preta. **B** = grupo controle, mostrando citoplasma intacto, poros nucleares (indicado pela seta vermelha) e organelas preservadas, como o retículo endoplasmático indicado pela seta azul. **C** = grupo celecoxibe, mostrando heterocromatização (seta verde), além de não ser possível identificar organelas como em B; e **D**= heterocromatização (seta verde) e perda da arquitetura normal da célula.....39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – antiinflamatórios não-esteroidais  
ALT – alanina aminotransferase  
atm – atmosfera  
CAT – catalase  
COX - ciclooxigenase  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
epm – erro padrão da média  
GJIC – junções intercelulares tipo gap  
GSH – glutathiona reduzida  
GST – glutathiona-S-transferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
IAP – proteína inibidora de apoptose  
IFN-γ – interferon gama  
IL – interleucina  
i.p. – intra-peritoneal  
LIF – fator inibitório de leucemia  
LOX - lipooxigenase  
LPO - lipoperoxidação  
NOS – espécies reativas de nitrogênio  
OH· - radical hidroxila  
O<sub>2</sub><sup>·-</sup> - ânion superóxido  
PAF – pólipo adenomatoso familiar  
PBS – solução tampão de fosfato  
PG - prostaglandina  
PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>  
PIN – neoplasia intraepitelial prostática  
ptn – proteína  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
rpm – rotações por minuto  
SOD – superóxido dismutase  
TNF-α – fator de necrose tumoral alfa  
TPP – trifenilfosfina  
v.o. – via oral  
W256 – tumor Walker-256

## LISTA DE SIGLAS

INCA – Instituto Nacional do Câncer

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

COBEA – Colégio Brasileiro em Experimentação Animal

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FDA – *Food and Drug Administration*

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
<b>2.1 Características de células tumorais e a tumorigênese.....</b>	<b>03</b>
<b>2.2 Mediadores do desenvolvimento tumoral e controle celular.....</b>	<b>05</b>
<b>2.3 Quimioprevenção .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Celecoxibe.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Tumor Walker-256 em ratos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Grupos de tratamento e inoculação do tumor Walker-256.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Taxa de sobrevivência.....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Expressão da enzima COX-2 por <i>Western blotting</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>4.4 Quantificação de prostaglandina E2.....</b>	<b>18</b>
<b>4.5 Estresse oxidativo.....</b>	<b>18</b>
<i>4.5.1 Estudo in vitro da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH).....</i>	<i>18</i>
<i>4.5.2 Catalase (CAT).....</i>	<i>18</i>
<i>4.5.3 Superóxido-dismutase (SOD).....</i>	<i>19</i>
<i>4.5.4 Glutathiona-S-transferase (GST).....</i>	<i>20</i>

4.5.5 Peroxidação pelo método do xilenol laranja (versão 2).....	20
4.5.6 Concentração Protéica.....	21
4.5.7 Isolamento de mitocôndrias em fígado de rato e determinação da atividade enzimática mitocondrial.....	21
4.5.7.1 NADH oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase).....	22
4.5.7.2 Succinato oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase).....	23
<b>4.6 Apoptose celular.....</b>	<b>23</b>
<b>4.7 Análise histopatológica hepática e tumoral.....</b>	<b>23</b>
4.7.1 Coloração de hematoxilina e eosina.....	23
4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	25
<b>5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>25</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência mundial de neoplasias vem crescendo ao longo dos anos. Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1,0 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil). Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2007).

No Brasil, em 2008, assim como para 2009, são esperados 231.860 casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), de mama feminina (49 mil), de pulmão (27 mil), de cólon e reto (27 mil), de estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil). Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão devidos ao câncer de pele não melanoma (56 mil casos novos), de próstata (49 mil), de pulmão (18 mil), de estômago (14 mil) e de cólon e reto (12 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não melanoma (59 mil casos novos), de mama (49 mil), de colo do útero (19 mil), de cólon e reto (14 mil) e de pulmão (9 mil) (INCA, 2007).

Em Curitiba, assim como no Paraná e no Brasil, as neoplasias representam o segundo grupo de causas de morte, abaixo somente dos óbitos por doenças do aparelho circulatório, e vem aumentando a sua participação na mortalidade proporcional. Segundo dados da Secretaria de Saúde de Curitiba, em 1980 as mortes por neoplasia representavam 13,1% do total de óbitos, e em 2005 passou a representar 19,7%. Nesse mesmo período, o coeficiente de mortalidade passou de 8,8 para 11,1 por 10 mil habitantes. Ainda com relação à incidência, dados da Secretaria de Saúde da capital paranaense mostram que nos indivíduos do sexo masculino o câncer de próstata é o mais freqüente nesse município, seguido pelas neoplasias de pele e as de brônquios/ pulmões. Em mulheres, o câncer de mama

figura como o principal em incidência e mortalidade, seguido pelo colo de útero e pele. No entanto, um fato a ser destacado é que no perfil de incidência, as neoplasias de vias biliares não ocupam destaque, no entanto figuram como câncer de alta letalidade. De forma inversa, as neoplasias de pele aparecem como algumas das mais freqüentes quanto à incidência e morbidade hospitalar, mas não apresentam a mesma importância na análise de mortalidade, como reflexo da baixa letalidade desse tipo de neoplasia (CURITIBA, 2007).

A incidência de neoplasias sofre variações regionais, de etnias, de ocupação e pela exposição a agentes desencadeadores de câncer. Um estudo retrospectivo feito no Brasil demonstrou que há maior taxa de mortalidade estandardizada por tumor cervical, prostático e cerebral em descendentes japoneses nascidos no Brasil do que naqueles nascidos no Japão (IWASAKI *et al.*, 2004). Um levantamento regional, feito em Salvador (Bahia), evidenciou que indivíduos expostos ao vírus da hepatite B têm maior probabilidade de desenvolver carcinoma hepatocelular (COTRIM *et al.*, 1992). Do mesmo modo, pessoas residentes em Belém (Pará), onde se concentra grande número de madeiras, são constantemente expostos ao pó da madeira, o que elevou a incidência de neoplasmas na cavidade oral, faringe e estômago no período de 1991 a 1999, em comparação a outras capitais (BAHIA *et al.*, 2005). Um outro levantamento de câncer dentre os militares da Marinha no Rio de Janeiro, no período compreendido entre 1991 e 1995, determinou que a mortalidade dos militares diferiu da população geral, devido à associação a fatores ocupacionais (SILVA, SANTANA e LOOMIS, 2000), sendo a mesma conclusão observada em trabalhadores rurais expostos a pesticidas no Rio de Janeiro (MEYER *et al.*, 2003).

Frente à alta incidência, novas terapias contra câncer são buscadas constantemente. Assim, se propôs este estudo experimental com o tumor Walker-256 e o celecoxibe, fármaco inicialmente usado com finalidade analgésica e antiinflamatória. Evidências científicas têm mostrado, no entanto, a potencialidade do celecoxibe como antineoplásico em tumores prostáticos (GUPTA *et al.*, 2004), pancreáticos (FERRARI *et al.*, 2005) e metástases hepáticas de tumores

pancreáticos (WENGER *et al.*, 2002), além de câncer cólon-retal (PENG, ZHANG & XIAO, 2004). Os mecanismos deste efeito, a toxicidade e a posologia ainda não estão completamente definidos para as diferentes neoplasias. Há, inclusive, mecanismos propostos de inibição tumoral tanto dependentes quanto independentes da ciclooxigenase (AMIR & AGARWAL, 2005).

Deste modo, esclarecimentos acerca dos efeitos celulares do celecoxibe em neoplasias assumem importância frente à real potencialidade desta droga como um novo fármaco antineoplásico, uma vez que novas terapias são necessárias diante da alta incidência de neoplasias e da morbidade e mortalidade inerentes a elas.

Este estudo é parte integrante de um projeto mais amplo, financiado pelo CNPq (Edital 054/2005), com o intuito de avaliar os efeitos metabólicos, hepáticos e antitumorais do celecoxibe, frente a um modelo de neoplasia, o Tumor Walker-256.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Características de células tumorais e a tumorigênese**

Tumores são reconhecidos pelo fato de que suas células apresentam crescimento anormal, de forma que células tumorais diferem das normais por não responderem adequadamente aos mecanismos naturais de controle do crescimento. Cânceres são tumores malignos com capacidade específica para invadir e destruir o local da invasão. As células do tumor requerem nutrientes que são supridos através da corrente sanguínea em tecidos normais. Algumas células do tumor produzem uma série de proteínas que estimulam a proliferação de vasos sanguíneos que irrigam o tumor - angiogênese. Os novos vasos, no entanto, não são bem formados e são facilmente danificados, de modo que as células do tumor podem penetrar nestes vasos e atingir também vasos linfáticos. Fragmentos do tumor podem ser carregados através desses vasos a linfonodos locais ou a órgãos distantes onde podem produzir tumores secundários, as metástases (FRANKS, 1999).

O início do processo do câncer é estudado principalmente em células tumorais de origem epidérmica, sendo os tumores conhecidos como carcinomas, e seu processo de origem chamado carcinogênese. A carcinogênese caracteriza-se por um processo múltiplo, no qual um acúmulo de eventos genéticos em uma linhagem celular leva a uma aparência celular progressivamente displásica, com desregulação no crescimento celular e, finalmente, ao carcinoma. Os carcinomas são também mais freqüentes que os sarcomas (TSAO, KIM & HONG, 2004; ALBINI & SPORN, 2007).

A carcinogênese, simplificada, é dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve ligação e dano direto ao DNA através dos carcinógenos, sendo rápida e irreversível. A promoção envolve mecanismos epigenéticos e leva à pré-malignidade, sendo também um processo irreversível. A progressão ocorre devido a mecanismos genéticos e é o período entre pré-malignidade e câncer, sendo também geralmente irreversível. Com raras exceções, os estágios de promoção e progressão aparecem até décadas após a iniciação (TSAO, KIM & HONG, 2004).

Outro mecanismo descrito nesse processo refere-se a um equilíbrio entre proliferação e morte celular. Se o dano ao DNA é muito grave, existe um processo importante que elimina células alteradas: a apoptose. Células tumorais, no entanto, parecem estar protegidas contra mecanismos de apoptose e/ ou necrose celular (GIGLIO, 2001; VALKO *et al.*, 2006).

Em conjunto com esses mecanismos, as comunicações intercelulares de junção *gap* (GJIC), foram propostas por desempenhar papel importante na regulação do controle do crescimento celular, diferenciação e apoptose de células progenitoras. Resultados de biologia molecular mostraram que existem genes que quando ativados (oncogenes) ou desativados (genes de supressão tumoral) contribuem para a expansão clonal de uma célula-tronco. Muitos experimentos têm mostrado que células tumorais que ativaram oncogenes possuem junções *gap* disfuncionais. Isto evidencia o fato de que oncogenes ativados e junções *gap* estão

funcionalmente ligados, através de vias de sinalização afetadas por esses oncogenes (VALKO *et al.*, 2006).

Por fim, dados recentes indicam que a carcinogênese e a angiogênese tumoral resultam não apenas da interação de células tumorais com células endoteliais de origem vascular ou linfática, mas que células do estroma, vizinhas às anteriormente citadas, assim como células inflamatórias, desempenham um papel crucial ao direcionar a formação de vasos sanguíneos que nutrem um tumor em desenvolvimento. Deste modo, deve-se considerar de fundamental importância o papel das células mesenquimais e do sistema imune na angiogênese e na carcinogênese (ALBINI & SPORN, 2007).

## **2.2 Mediadores do desenvolvimento tumoral e controle celular**

Vários fatores têm sido postulados como mediadores da caquexia do câncer, como as citocinas, da qual fazem parte o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6), o interferon gama (IFN - $\gamma$ ) e o fator inibitório de leucemia (LIF) (LANGSTEIN & NORTON, 1991; TISDALE, 1993; KOREKANE *et al.*, 2003). Os principais sintomas relatados por pacientes com câncer, que incluem fadiga, anorexia, perda de apetite e náuseas, podem ser relacionados ao estresse oxidativo e a uma grande produção de citocinas seletivas, como as supracitadas (MANTOVANI *et al.*, 2002).

Existem também relatos de altas concentrações de PGs e aumento substancial na indução da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) em vários tecidos tumorais animal e humano, incluindo o câncer de mama, próstata, pulmão, esôfago, bexiga, estômago e cólon-reto (TAKETO, 1998b; MASFERRER *et al.*, 2000). Essa enzima tem um importante papel na neoplasia, e seu aumento parece estar relacionado com o desenvolvimento do câncer pela hiperproliferação celular, transformação no crescimento tumoral, inibição da apoptose, estimulação da neovascularização, alteração da adesão celular, aumento do potencial invasivo e de metástases (GASPARINI *et al.*, 2003; GROSH *et al.*, 2006). Em geral, a expressão da COX-2 é alta em tumores moderados e bastante diferenciados e em

metástases. Uma significativa relação entre a superexpressão da COX-2 e redução de sobrevida pacientes com câncer de cólon, mama, estômago e pulmão tem sido relatada. (GASPARINI et al, 2003; THUN, HENLEY & PATRONO, 2002).

A COX-2 é regulada em muitas células tumorais humanas, e as propriedades antitumorais de drogas antiinflamatórias não esteroidais foram demonstradas por este mecanismo, através de estudos epidemiológicos e em alguns modelos experimentais. Um dos mais importantes metabólitos da atividade da COX-2 é a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), que é produzida em grande quantidade em alguns tumores, e que pode induzir à produção de fatores angiogênicos em muitos tipos celulares (CIANCHI *et al.*, 2004).

Ainda, o estresse oxidativo é um fenômeno que ocorre quando há um aumento líquido dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), afetando negativamente o balanço produção / destruição. O envolvimento de espécies reativas de oxigênio e também espécies reativas de nitrogênio tem sido investigado nos mecanismos patogênicos da carcinogênese (LEV *et al.*, 2003). Muitos mecanismos podem levar ao estresse oxidativo no paciente com câncer. O primeiro é o metabolismo energético alterado, que pode ser caracterizado por sintomas como anorexia/caquexia, náuseas e vômito, que impedem uma nutrição normal e assim suprimento normal de nutrientes como glicose, proteínas, e vitaminas, levando eventualmente a acúmulo de radicais livres (ROS). O segundo mecanismo é a ativação crônica não-específica de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez podem aumentar a produção de ROS. Um terceiro mecanismo pode ser resultado do uso de drogas anti-neoplásicas, pois muitas delas, particularmente agentes alquilantes e cisplatina, são capazes de produzir ROS em excesso e assim levar ao estresse oxidativo (MANTOVANI, 2004).

A geração de radicais livres *in vivo* é um fenômeno constante que ocorre no metabolismo fisiológico ou por alterações patológicas. O oxigênio (O<sub>2</sub>) tem um papel duplo nas células, ele é essencial para os organismos aeróbicos, mas pode agir como radical livre. Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais pares de elétrons desemparelhados

que conferem um considerável grau de reatividade (GATÉ *et al.*, 1999). Quando uma molécula de oxigênio captura um elétron, ela se torna um ânion superóxido ( $O_2^\ominus$ ), considerado uma ROS primária, que pode reagir com outras moléculas para formar ROS secundárias. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), molécula que não conta com um elétron desemparelhado, é menos reativo que o superóxido, e se difunde mais facilmente, podendo atravessar a membrana plasmática. O radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) pode ser produzido a partir de peróxido de hidrogênio, e essa reação é catalisada pela oxidação de elementos como o  $Fe^{+2}$ . O  $OH^\bullet$  é a molécula oxidante mais reativa, capaz de se ligar ao DNA, lipídios e proteínas, oxidando-os (GATÉ *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006).

Devido aos efeitos deletérios em macromoléculas, as ROS podem induzir alterações celulares que podem levar a várias doenças (GATÉ *et al.*, 1999). Os radicais de oxigênio podem atacar diretamente o DNA, ocorrendo, assim, mutagênese e carcinogênese. O DNA alterado pode ser reparado pela DNA glicosilase. Entretanto, se o estresse oxidativo é muito intenso, esse reparo do DNA é burlado. As proteínas também são alvos dos radicais livres, o que resulta em alterações nos mecanismos de transduções, sistemas de transportes ou em atividades enzimáticas (GATÉ *et al.*, 1999; DEWEESE, HRUSZKEWYCZ & MARNETT, 2001).

As células desenvolveram sistemas enzimáticos que convertem os oxidantes em moléculas não-tóxicas, protegendo o organismo do efeito deletério do estresse oxidativo. A enzima superóxido-dismutase (SOD) converte o ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , sendo o  $H_2O_2$  um produto menos tóxico. Essa enzima é a primeira linha na defesa celular contra o estresse oxidativo, e trabalha juntamente com enzimas que removem  $H_2O_2$ , como a catalase e a glutathiona peroxidase (GPx). A catalase é a segunda enzima que age na “desintoxicação celular”, pois converte  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$ . A GPx converte  $H_2O_2$  em  $H_2O$  via oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona redutase permite a conversão da glutathiona oxidada em GSH, o que é essencial para a viabilidade do GSH in vivo. O GSH é um tripeptídeo que

apresenta um importante papel celular na síntese de proteínas, transporte de aminoácidos, síntese do DNA e na desintoxicação celular (GATÉ *et al.*, 1999).

A glutationa-S-transferase (GST) pertence a uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH. A diversidade de compostos detoxificados pela GST é resultado do sítio de ligação não específico para substratos hidrofóbicos e a existência de várias isoformas da GST, que metaboliza carcinógenos, poluentes ambientais, drogas e xenobióticos. A GST também participa na defesa contra o estresse oxidativo por detoxificar compostos endógenos reativos como hidroperóxidos de DNA (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Os processos degenerativos orgânicos são caracterizados pelo fato de ocorrer morte celular de maneira lenta e duradoura. Existem duas formas de morte celular: necrose e apoptose (LEV *et al.*, 2003). A necrose é o resultado de algum “acidente” celular, as células necrosadas distendem-se e se rompem, provocando resposta inflamatória. A apoptose é um mecanismo de morte celular programada. É caracterizada por mudanças morfológicas que incluem: redução celular, condensação nuclear, e degradação do DNA (LEV *et al.*, 2003). Em oposição à necrose, não há processos inflamatórios relacionados às células apoptóticas (MATTSON, 2000). Como é evidenciada uma relação entre o grau de depleção do ATP resultante da apoptose e a ocorrência de necrose, em condições de extrema falta de substrato energético a apoptose pode levar a um processo de necrose celular (LEIST *et al.*, 1997).

O processo apoptótico é causado por uma cascata de eventos na qual uma família de cisteína-proteases, conhecidas como caspases, levam à quebra de múltiplos substratos (LEV *et al.*, 2003; EBERHARDT & SCHULZ, 2003). A morte apoptótica é caracterizada pela expressão de genes (a maior parte oncogenes), que aumentam o processo apoptótico (*Bax*, *Bcl-x*) e outros que inibem a morte (por exemplo: *Bcl-2* e *Bcl-x<sub>L</sub>*) (LEV *et al.*, 2003). Também está relacionada uma grande variedade de fatores indutores de transcrição, como c-Fos, Fos B, antígeno relacionado a Fos, *c-jun*, jun B, jun D, Krox 20 e Krox 24 (OFFEN *et al.*, 2000). A

maioria dos cânceres é conhecida por expressar em grande quantidade proteínas anti-apoptóticas, como as proteínas inibidoras de apoptose (IAP's), a fim de proteger as células da apoptose. A survivina é a menor proteína dessa família, e tem sido relatada como supressora das atividades da caspase 9 e caspase 3, enzimas-chave na sinalização apoptótica (FUKADA *et al.* 2007).

Outro fator importante nesse cenário refere-se à proteína p53. Na proliferação celular, essa proteína desempenha um papel crucial, checando a integridade do DNA, e disparando mecanismos que eliminam, por exemplo, as bases de DNA oxidadas que causam mutações. Quando o dano celular é muito intenso, a proteína p53 leva a célula à morte por apoptose (VALKO *et al.*, 2006).

Durante a fase inicial da apoptose, o sinal de morte celular ativa uma cascata intracelular de eventos que podem envolver aumento nos níveis de oxi-radicaís e íons cálcio, produção de Par-4 e translocação de membros da família pró-apoptótica *Bcl-2* (*Bax* e *Bad*). Certas caspases (caspase 8, por exemplo) podem atuar também antes das mudanças mitocondriais. A fase efetiva da apoptose envolve aumento mitocondrial nos níveis de íons cálcio e oxi-radicaís, formação de poros de transição de permeabilidade (PTP) na membrana mitocondrial e liberação de citocromo C no citosol. O citocromo C forma um complexo com o fator de ativação de protease apoptótica (Apaf-1) e caspase-9. A caspase-9 ativada, por sua vez, ativa a caspase-3, que inicia a fase de degradação da apoptose, na qual várias caspases e outros substratos enzimáticos são clivados, resultando em mudanças características na membrana plasmática. Finalmente, a cromatina nuclear se torna condensada e fragmentada (MATTSON, 2000).

Um exemplo que justifica a possível proteção de células tumorais contra a apoptose celular é o fato de que mais da metade dos cânceres possuem defeitos na regulação de genes responsáveis pela expressão da proteína p53, o que aumenta sua viabilidade e a progressão do tumor, bem como as tornam resistentes à quimioterapia (GIGLIO, 2001; VALKO *et al.*, 2006).

### **2.3 Quimioprevenção**

A quimioprevenção foi primeiramente definida por Sporn (1976, citado por Albini & Sporn, 2007) como o “Uso de agentes químicos, biológicos, naturais ou sintéticos, com o intuito de prevenir, reverter ou suprimir a progressão carcinogênica para câncer invasivo”.

Como estratégias e alvos para quimioprevenção, a principal e mais citada é a lesão pré-maligna, como, por exemplo, a lesão intra-epitelial, definida como uma lesão não invasiva com anormalidades genéticas, perda de controle celular e algumas características fenotípicas de câncer invasivo, sendo considerado um sinal substancial para o desenvolvimento do câncer invasivo (O'SHAUGHNESSY, *et al.*, 2002). Exemplos de lesões intra-epiteliais que conferem alto risco de progressão em humanos são os adenomas cólon-retais, carcinoma ductal de mama *in situ*, displasia oral, neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (PIN), esôfago de Barret e nevo displásico. O risco de progressão é mais bem estimado ao se combinar a lesão intra-epitelial com outros fatores de risco, como o histórico familiar e hábitos predisponentes (KELLOF & SIGMAN, 2007).

Tentativas de quimioprevenção têm sido definidas em pessoas saudáveis cujo histórico familiar de câncer é forte ou ainda indivíduos particularmente suscetíveis, por outras razões. Um grupo promissor de agentes com atividade preventiva para o câncer inclui os antiinflamatórios não esteroidais (WANG & DUBOIS, 2006).

### **2.4 Celecoxibe**

O mecanismo de ação antiinflamatório dos conhecidos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) foi proposto por Vane, em 1971, onde foi demonstrada a habilidade desses fármacos em inibir a atividade da enzima ciclooxigenase (COX), também denominada prostaglandina H sintase. Dentro deste processo, a COX catalisa o primeiro passo na síntese de prostanóides, ao converter o ácido

araquidônico em prostaglandina  $H_2$ , substrato comum para a síntese de prostaglandinas específicas (VAN RYNM, TRUMMLITZ & PAIRET, 2000).

Duas isoenzimas estão presentes nos mamíferos: a COX-1, que é expressa constitutivamente, e a COX-2, que é expressa em resposta a certos estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos, como citocinas, mitógenos, fatores de crescimento e promotores de tumor. Enquanto a COX-1 está envolvida na homeostase de várias funções fisiológicas, a COX-2 é responsável por processos inflamatórios (TAKETO, 1998a; GASPARINI *et al.*, 2003). Outra isoenzima, a COX-3, tem sido pesquisada é possivelmente uma variante do gene da COX-1, podendo ser seletivamente inibida por fármacos analgésicos/antipiréticos como o acetaminofeno, antipirina e dipirona, além de ser potencialmente inibida por algumas drogas antiinflamatórias não esteroidais (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

A COX-1 e a COX-2 são muito semelhantes, uma vez que a seqüência de aminoácidos é muito próxima, levando a uma estrutura similar. Ambas são homodímeros. Cada monômero consiste de três sítios: um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico, um domínio de ligação à membrana e um domínio catalítico que contém o local de ação da enzima. A estrutura também revela um canal que se estende do centro do domínio catalítico até a superfície externa da membrana de ligação. Essa região que acaba por permitir que o ácido araquidônico acesse o domínio de ação, onde é convertido à prostaglandina  $G_2$  e em seguida reduzida à prostaglandina  $H_2$ . Muitos antiinflamatórios competem pelo ácido araquidônico ao se ligarem ao sítio ativo da enzima (VAN RYNM, TRUMMLITZ & PAIRET, 2000). Dentro do canal hidrofóbico da enzima, uma única diferença de aminoácidos tem sido considerada crítica na seletividade de várias drogas à COX-2. Assim, a molécula de valina, presente em COX-2 e de menor tamanho que a de isoleucina, encontrada em COX-1, permite que inibidores maiores se liguem mais rapidamente em COX-2 (HINZ & BRUNE, 2002).

O celecoxibe é um antiinflamatório não esteroideal seletivo para COX-2, considerado um inibidor irreversível da enzima, de ação lenta e tempo-dependente. É quimicamente classificado como diarilheterocíclico, cuja especificidade para COX-

2 relaciona-se, além da ocupação da valina na posição 509, a uma interação na região 498 do aminoácido arginina (VAN RYNYM, TRUMMLITZ & PAIRET, 2000; HINZ & BRUNE, 2002).

As principais indicações para a utilização dessa nova geração de AINES, onde, além do celecoxibe, estão o rofecoxibe, parecoxibe e valdecoxibe, são afecções músculo-esqueléticas, como osteoartrite e artrite reumatóide, controle de dor pós-operatória em cirurgias ortopédicas e dentárias, dismenorréia e dor aguda moderada ou grave inespecífica (PFIZER, 2006).

Além do efeito antiinflamatório, alguns estudos recentes revelam que a inibição da formação de mediadores inflamatórios pode prejudicar o desenvolvimento de tumores, e especialmente pode reduzir a perda de peso associada a neoplasias. Davis *et al.* (2004) relatam que o celecoxibe rapidamente reverteu a perda de peso em dois modelos de caquexia em murinos, o Colon 25 e 1483-HNSCC, sugerindo um possível uso terapêutico do celecoxibe para tratamento da caquexia associada a tumores. Wenger *et al.* (2002), descrevem que a combinação de celecoxibe com um inibidor seletivo da 5-lipooxigenase pode ser usada para o controle de metástases hepáticas provenientes de câncer pancreático. Ainda, pacientes com adenocarcinoma pulmonar tratados com celecoxibe e progesterona apresentaram melhoras nos sinais clínicos da síndrome sistêmica imune-metabólica associada ao adenocarcinoma (CERCHIATTI *et al.*, 2004).

O celecoxibe foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em dezembro de 1999 como um agente quimiopreventivo na dose de 400mg, duas vezes ao dia. É o único dentre os AINES que foi aprovado como tratamento adjuvante em pacientes com pólipos adenomatosos familiares (PAF) (GASPARINI *et al.*, 2003; GROSH *et al.*, 2006). O celecoxibe é agente quimiopreventivo eficaz, pois pode atuar nos estágios iniciais da carcinogênese (iniciação e pós-iniciação) e nos mais tardios (promoção e progressão) (REDDY *et al.*, 2000). Além do processo da carcinogênese, o celecoxibe atua em tumores estabelecidos. Em geral o seu possível mecanismo anticarcinogênico envolve bloqueio da proliferação celular e da

angiogênese, indução da apoptose e modulação da resposta imune, e tais mecanismos dependem ou não da inibição da COX-2 (GROSH *et al.*, 2006).

## **2.5 Tumor Walker-256 em ratos**

O tumor Walker-256 (W256) é um carcinossarcoma de crescimento rápido, e a sua implantação em ratos tem sido considerada um modelo adequado para estudar a síndrome da caquexia e tratamentos antineoplásicos, por ser espécie-específica e facilmente transplantado (GUAITANI *et al.* 1982; MUND, 2004). Em curto espaço de tempo após sua implantação verificam-se redução no peso do animal, dificuldade de ingestão adequada de alimento (anorexia), catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Aos 14 dias após o implante a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO *et al.*, 2002).

Esse tumor foi observado pela primeira vez em 1928, por George Walker, nas glândulas mamárias de uma rata gestante. Em 1953 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana. Mais tarde, em 1967, a passagem do tumor da forma sólida para a ascítica foi descrita por Agostino e Clifton. Assim, as células tumorais na forma ascítica poderiam novamente ser injetadas intraperitonealmente em outros animais e estas mesmas células poderiam, ainda, ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, sempre com o desenvolvimento do tumor sólido (MUND, 2004).

Duas variantes de W256 foram descritas, sendo designadas A e AR. A variante A é mais agressiva, possui uma taxa maior de crescimento e pode induzir efeitos sistêmicos como anorexia, baixos níveis de hemoglobina e retenção de sódio e água, seguida de perda de peso e morte. A linhagem regressiva AR foi obtida após várias passagens de células tumorais W256 na cavidade intraperitoneal de ratos. Os mecanismos envolvidos na progressão tumoral nesse modelo ainda não estão completamente elucidados, mas um estudo sugeriu que a agressividade da variante A está relacionada à modulação por citocinas, principalmente uma menor expressão de INF- $\gamma$ , que facilita o crescimento tumoral.

Além disso, a IL-12 parece estar expressa nas duas linhagens (PERROUD *et al.*, 2006).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar o crescimento tumoral e as alterações provocadas pelo celecoxibe frente ao modelo de carcinoma Walker-256.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar o crescimento tumoral em ratos tratados e não tratados com celecoxibe e acompanhar o peso ponderal e a taxa de sobrevivência;

2. Investigar o envolvimento de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, no decorrer do processo tumoral;

3. Avaliar a expressão da enzima COX-2 em células tumorais e células hepáticas em animais tratados ou não com o celecoxibe;

4. Investigar a natureza do estresse oxidativo e suas implicações no desenvolvimento tumoral e no metabolismo hepático, através de medidas de peroxidação lipídica e atividades enzimáticas da glutathione-S-transferase, superóxido dismutase e catalase; bem como pela determinação da atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória.

5. Avaliar a ação do celecoxibe em vias envolvidas na apoptose celular através da detecção da proteína anti-apoptótica *Bcl-x<sub>L</sub>* e visualização de alterações celulares por técnicas histológicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Anteriormente à realização dos experimentos, todos os protocolos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, para anuência dos métodos e concordância segundo os princípios éticos do uso de animais de laboratório estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi certificado com o número 153 deste comitê.

### 4.1 Grupos de tratamento e inoculação do tumor Walker-256

Ratos machos adultos, linhagem Wistar, com peso entre 200 e 300g, foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos no biotério da UFPR ou nas salas de manutenção de animais no Departamento de Farmacologia, e alimentados com ração balanceada e supridos com água *ad libitum*.

A manutenção das células Walker-256 foi feita através de passagens semanais por inoculação intraperitoneal (IP). As células foram colhidas assepticamente em solução salina tamponada em pH 7,4. Após cinco a sete dias de crescimento na forma ascítica, o líquido colhido foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1,0 mL de tampão PBS (fosfato 16,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM), e então se verificou a viabilidade das células tumorais pelo método de exclusão do azul de Tripán numa câmara de Neubauer. Para o nosso propósito, células presentes em quatro campos foram contadas. Fez-se a média da contagem dos quatro campos e em seguida o cálculo: número de células / mL = média dos quatro quadrantes  $\times 10^4 \times 200$ . Sabendo-se a quantidade de células presentes em 1,0 mL de solução, calculou-se o volume necessário para inocular  $10^7$  células por via intraperitoneal (i.p.), para a manutenção das células. Para implantação nos animais experimentais, as células do carcinoma foram injetadas subcutaneamente ( $10^7$  células por rato), no membro pélvico direito dos animais. Os tratamentos foram iniciados um dia após o implante, tendo duração de 14 dias. O celecoxibe (Celebra® - Laboratório Pfizer) foi dissolvido em tampão Tris pH 8,6 e

administrado por gavagem, diariamente, em doses de 25 mg/kg ao dia. Aos animais do Grupo Controle, foi administrado apenas tampão Tris pH 8,6. Devido aos riscos que envolvem a manipulação de fármacos quimioterápicos clássicos, optou-se pela não utilização de um Grupo Controle Positivo. Em alguns parâmetros, no entanto, um Grupo denominado Basal foi adicionado, sendo esse composto por indivíduos não inoculados com tumor, mas tratados com tampão Tris.

Animais em tratamento tiveram seu peso diário verificado, bem como o peso do tumor ao final do período de tratamento foi mensurado em balança analítica para avaliar a real variação de peso ao longo do período. O volume do tumor foi calculado, através da medida dos diâmetros (com régua), segundo a descrição de Mizuno *et al.*, (1999), pela fórmula  $[V(\text{cm}^3) = (4\pi/3.a^2.(b/2))]$ ; onde *a* é o menor diâmetro e *b* é o maior diâmetro.

O efeito inibitório, em porcentagem, do crescimento tumoral, foi calculado utilizando a fórmula  $(1-T/C) \times 100$ , onde T é o volume do tumor do grupo testado celecoxibe e C o volume do grupo controle.

Além da observação e pesagem, amostras de tumor foram coletadas e armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises. Amostras de fígado também foram submetidas ao mesmo procedimento para esses propósitos.

#### **4.2 Taxa de sobrevivência**

Um grupo de tratamento à parte daquele previsto no item anterior foi utilizado para avaliar a taxa de sobrevivência dos animais, com os objetivos de comparar a mortalidade dos animais tratados ou não com o celecoxibe, verificar a viabilidade das células de tumor Walker-256 utilizadas no experimento, assim como avaliar se os animais estavam respondendo de maneira homogênea ao modelo experimental. Para tanto, a inoculação subcutânea e o início do tratamento foram realizados como descrito anteriormente, com sete animais por grupo. Todavia, o tempo de tratamento foi de 30 dias ao invés de 14 dias. Animais que morreram durante esse período foram contabilizados. Ao final dos 30 dias, os animais que sobreviveram sofreram eutanásia, por anestesia com tiopental seguida de decapitação.

### **4.3 Expressão da enzima COX-2 por *Western blotting***

Com o objetivo de verificar possíveis alterações na expressão da proteína COX-2 nos tumores e no fígado, foi utilizada a técnica de *western blotting*, no Departamento de Farmacologia do ICB da Universidade de São Paulo. Para isso, amostras de tecido (tumor e fígado) foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM, contendo 1 mM de PMSF, um inibidor de serino-proteases (tripsina, quimotripsina, trombina e papaína). Em seguida, as amostras foram centrifugadas, em centrífuga Eppendorf modelo 2412 (Eppendorf, Califórnia, EUA) a 1000g por 5 minutos e os sobrenadantes utilizados para as análises de COX-2.

A concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos foi determinada através do método de Bradford (1976), descrito a seguir.

Para o primeiro estágio da técnica, que é a eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, as amostras foram diluídas em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4, na concentração final de 50 µg de proteína para cada 20 µL de amostra. A esta solução, foram acrescentadas 30 µL de tampão de amostra. Assim, essas amostras foram aplicadas no gel de eletroforese (10 µL de cada amostra). As proteínas foram separadas por eletroforese aplicando-se uma corrente constante de 35 mA durante aproximadamente duas horas. Após a eletroforese, iniciou-se a transferência das amostras do gel para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana, juntamente com um sistema de transferência, é mergulhada no tampão de transferência, ligado à fonte de 150 mA, durante duas horas. Após esse período, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau 2%, a fim de verificar a eficiência da transferência, como foi realizado com as amostras de tumor.

O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito incubando-se as membranas em solução de caseína 0,2% preparada em tampão TBS-t pH 7,4 (20 mM de Tris-HCl, 8% de NaCl contendo 0,1% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. As próximas etapas consistiram na incubação das membranas com os anticorpos. O primeiro anticorpo utilizado foi o anti-COX-2 (Mice policlonal IgG – Laboratório Santa Cruz), na diluição de 1000 ng/mL em TBS-t, durante 16 horas, sob agitação contínua a 18°C. O anticorpo secundário utilizado em seguida foi o

anticamundongo conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:3000 em TBS-t por duas horas. As membranas foram posteriormente lavadas com o mesmo tampão e submetidas à revelação das bandas imunorreativas. A captação dos sinais de quimioluminescência foi feita num sistema Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, Califórnia, EUA). A partir dessas imagens, as bandas foram analisadas por densitometria.

#### **4.4 Quantificação de prostaglandina E2**

A determinação da concentração da prostaglandina E2 foi realizada por kit para ELISA, seguindo-se as instruções do fabricante (Cayman Chemical – USA). A amostra utilizada foi a urina, colhida através da utilização de gaiolas metabólicas individuais durante 12 horas, e o tecido tumoral dos animais, colhido após eutanásia com tiopental (via i.p.) e estocados conforme instruções do kit.

#### **4.5 Estresse oxidativo**

##### *4.5.1 Estudo in vitro da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)*

A reatividade do celecoxibe (concentrações de 10 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) com o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por Chen *et al* (1999), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de 750  $\mu\text{L}$  de solução teste (EHS e EHSp) e 250  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de DPPH (1mg em 25 ml). Após 5 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido. A solução do agente redutor, ácido ascórbico (50  $\mu\text{g/ml}$ ), foi utilizada como controle positivo do teste e como controle negativo foi utilizada a água destilada.

##### *4.5.2 Catalase (CAT)*

Para análise bioquímica da Catalase, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas

a velocidade de 10000 g durante 10 minutos. As amostras de tecido tumoral foram homogeneizadas com o mesmo tampão e na mesma diluição que do fígado, e centrifugadas a velocidade de 5000 g durante 5 minutos. A homogeneização foi feita em gelo e a centrifugação refrigerada a 4°C.

A atividade da catalase foi quantificada de acordo com Aebi (1984). Para isso, os sobrenadantes das amostras já homogeneizadas foram novamente diluídos em uma proporção de 1:10 (10µL de amostra em 90 µL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,5) e, em seguida, 20 µL de amostra foram adicionadas a 980 µL de solução reação, que contém, a cada 50 mL: 2,5 mL de Tampão Tris-EDTA (Tris 1M, EDTA 5mM), 47,35 mL de água miliqué e 172,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (30mM, aproximadamente). A reação foi monitorizada por 60 segundos para fígado e 90 segundos para o tumor, a 240 nm em espectrofotômetro Modelo Ultrospec 4300 pro (Amersham Biosciences), utilizando cubeta de quartzo, sendo que para o cálculo da atividade o coeficiente de extinção usado foi de 41 mmolar<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

#### 4.5.3 Superóxido-dismutase (SOD)

Para análise bioquímica da Superóxido Dismutase, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas a velocidade de 10000 g durante 10 minutos. As amostras de tecido tumoral foram homogeneizadas com o mesmo tampão e na mesma diluição que o fígado, e centrifugadas a velocidade de 5000 g durante 5 minutos. A homogeneização foi feita em gelo e a centrifugação refrigerada a 4°C.

A atividade dessa enzima foi quantificada através da capacidade da superóxido-dismutase presente no tecido (fígado ou tumor) em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol. Para isso, amostras homogeneizadas são adicionadas à solução contendo tampão Tris HCl-EDTA (200 mM de tampão Tris HCl e 2 mM de EDTA), em seguida agitadas em vórtex e adicionadas a 100 µL de solução com pirogalol 15 mM. Após incubação de 20 minutos a 25°C, a reação foi parada com 50 µL de solução de HCl a 1N, e as amostras centrifugadas por 4 minutos a 14000 rpm. A leitura foi feita em seguida em leitor de microplaca modelo

Sunrise Remote (Tecan Deutschland GMBH) a 440 nm. A quantidade de enzima que inibiu a reação em 50% ( $IC_{50}$ ) foi definida como uma unidade de SOD, e a atividade da enzima foi dada em unidades de SOD por miligrama de proteína total (U SOD.mg.ptn<sup>-1</sup>).

#### 4.5.4 Glutathione-S-transferase (GST)

Para análise bioquímica de glutathione-S-transferase, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 6,5, a uma diluição de 1:10, e centrifugadas a velocidade de 10000 g durante 10 minutos. As amostras de tecido tumoral foram homogeneizadas com o mesmo tampão e na mesma diluição que no fígado, e centrifugadas em velocidade de 5000 g durante 5 minutos. A homogeneização foi feita em gelo e a centrifugação a 4°C.

As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a GSH (glutathione na forma reduzida), formando um tioéter que pode ser monitorizado pelo aumento de absorvância, segundo método de HABIG *et al.* (1974). Assim, 200 µL de solução-reação contendo 3 mM de CDNB (diluído em etanol PA) e 3 mM de GSH (diluída em tampão fosfato) foram adicionados a 100 µL de sobrenadante (diluído em uma proporção de 1:100 para o fígado e 1:5 para o tumor). Em seguida, seguiu-se a leitura em microplaca utilizando-se leitor Sunrise Remote (Tecan Deutschland GMBH), onde se avaliou o aumento linear da absorvância a 340 nm, usando o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

#### 4.5.5 Peroxidação pelo método do xilenol laranja (versão 2)

A taxa de peroxidação lipídica foi mensurada pelo método FOX2, aperfeiçoada do método descrito por JIANG *et al.* (1991). Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica.

A oxidação do ferro no ensaio do xilenol laranja versão 2, associado com o redutor seletivo de hidroperóxidos trifenílfosfina (TPP), foi empregado para determinar hidroperóxidos totais (ROOH). O método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico pelos ROOH's sob condições ácidas. Íons férricos formam um

complexo com o xilenol laranja, que é um indicador desses íons, gerando um complexo azul púrpura em uma absorbância máxima de 550-600 nm (SÖDERGREN *et al.*, 1998).

Amostras de tumor Walker-256 e fígado foram homogeneizadas em metanol PA, em uma proporção de 1:5 (300 miligramas de tecido para 1,5 mL de metanol) em homogeneizador Politron – 25000 rpm.min<sup>-1</sup>, centrifugadas a 5000 g por 5 minutos a 4°C. A seguir, adicionou-se 90 µL do sobrenadante a seis tubos tipo *ependorf*, sendo que três continham 10 µL de metanol PA e três 10 µL de TPP 10mM. Essas amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 30 minutos. Posteriormente, se adicionou às mesmas 900 µL de reativo de FOX-2, contendo: MeOH 90%, 100 µM xilenol laranja, 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de BHT e 250 µM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As amostras foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lidas em espectrofotômetro modelo Ultrospec 4300 pro (560 nm). O cálculo para determinação da quantidade de peroxidação lipídica no tecido tumoral ou hepático foi realizado utilizando-se coeficiente de extinção molar (4,3 x 10<sup>-4</sup> M), em comparação com a curva-padrão do peróxido de hidrogênio.

#### 4.5.6 Concentração Protéica

A quantificação de proteínas teciduais (fígado ou tumor) dos itens anteriores foi feita em microplacas, segundo Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão. Quando necessário, as amostras foram diluídas, para não extrapolar a curva da proteína padrão. Da amostra, foram necessários 10 µL em cada poço da microplaca, que reagiram com 250 µL de solução de Bradford. A leitura foi realizada em leitor de ELISA modelo Sunrise Remote (Tecan Deutschland GMBH), a 595 nm.

#### 4.5.7 Isolamento de mitocôndrias em fígado de rato e determinação da atividade enzimática mitocondrial

Mitocôndrias de fígado de rato foram isoladas como descrito por Voss *et.al.* (1961), com algumas modificações, utilizando-se como meio de extração: D-Manitol

250 mmol/L, tampão HEPES 10 mmol/L, pH 7,2, EGTA 1 mmol/L e BSA 0,1g%. Para a obtenção das mitocôndrias, os animais foram eutanasiados por decapitação e o fígado removido e lavado com o meio de isolamento, conservado em banho de gelo. Depois de lavado, o órgão foi picado com tesoura e homogeneizado em van Potter-Elvehjen. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3200 g a 4°C (centrífuga Hitachi, modelo himac CR 21E), durante 5 minutos. Nesta primeira etapa de centrifugação, desprezou-se o sedimento, que continha restos de células intactas, membranas e núcleos, e o sobrenadante que continha as mitocôndrias foi centrifugado novamente a 12600 g por 10 minutos. O precipitado obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspensão e lavado duas vezes em meio de extração por centrifugação a 8100 g, durante 10 minutos, a 4°C. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Por fim, foi obtida a suspensão mitocondrial e obtida sua concentração protéica foi analisada através do método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina como padrão. A atividade das enzimas ligadas à cadeia respiratória foi determinada polarograficamente em oxígrafo Gilson, utilizando um eletrodo de oxigênio tipo Clark (Yellow Springs Instruments Co.), acoplado a um registrador, pertencentes ao Departamento de Bioquímica da UFPR. Para estas análises, quatro grupos de animais foram utilizados: (A) Basal (com ratos hígidos); (B) Celecoxibe em ratos hígidos, sem tumor; (C) Controle (com tumor, tratados com tampão Tris apenas); e (D) Celecoxibe com tumor.

#### 4.5.7.1 NADH oxidase (NADH: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade da NADH oxidase foi determinada pelo método polarográfico de Singer (1974). O sistema de reação era composto por tampão fosfato 80 mmol/L (pH 7,4), EDTA 50 mmol/L, NADH 0,17 mmol/L e 2,0 mg de proteína mitocondrial. A reação ocorreu em temperatura controlada de 28°C, em volume final de 1,3 mL, sendo iniciada pela adição de proteína mitocondrial. A velocidade de oxidação do NADH, que se traduziu na velocidade de consumo de oxigênio, foi acompanhada polarograficamente. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles de oxigênio

consumido/min.mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando a solubilidade do oxigênio em água, a 28 °C e 1 atm, 235 µmol/L (ESTRABOOK, 1967).

#### 4.5.7.2 Succinato oxidase (Succinato: Oxigênio Óxido-Redutase)

A atividade do complexo succinato oxidase foi determinada através do registro polarográfico do consumo de O<sub>2</sub> pelo método de Singer (1974). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 80 mmol/L, pH 7,4, succinato de sódio 10 mmol/L e 2,0 mg de proteína mitocondrial. Os experimentos, assim como no anterior, foram realizados em volume final de 1,3 mL. A reação ocorreu a 28°C e foi iniciada pela adição do substrato (succinato). Os resultados são expressos em µmoles de oxigênio consumido/min.mg<sup>-1</sup> de proteína mitocondrial, considerando a solubilidade do O<sub>2</sub> na água, a 28°C e 1 atm, 235 µmol/L (ESTABROOK, 1967).

## 4.6 Apoptose celular

Para o experimento de imunodeteção aplicada à apoptose, foi utilizado método padrão de *western blotting* descrito por Sambrook *et al.* (1989). Amostras de 50 µg de proteína tecidual foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS a 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, as quais reagiram com anticorpos específicos contra as proteínas *Bcl-X<sub>L</sub>*. A seguir, com o apropriado anticorpo secundário conjugado com peroxidase, foi feita a visualização com sinais de quimioluminescência, no sistema Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, Califórnia, EUA).

## 4.7 Análise histopatológica hepática e tumoral

### 4.7.1 Coloração de hematoxilina e eosina

Cortes transversais do lóbulo direito do fígado foram obtidos e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial, por três horas. Na seqüência, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos, e permaneceu em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no etanol absoluto

contendo xilol na mesma proporção. Após as 16 horas, o material sofreu diafanização em xilol, três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. O material foi então impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58°C.

Com relação aos cortes de tumor Walker-256, amostras de áreas centrais do tumor, sem evidência macroscópica de necrose avançada, foram obtidas e fixadas com Bouin, fixador composto de ácido pícrico (75 mL), formaldeído (25 mL) e ácido acético glacial (5 mL), onde o tecido ficou imerso por 24 horas. Após, foram feitos banhos sucessivos das peças em etanol 70%, empiricamente até que o líquido que continha as peças passasse de uma cor amarelada (devido ao ácido pícrico) a uma aparência límpida. Em seguida, banhos contendo etanol em diferentes concentrações – 80, 90, 95% até o etanol absoluto – foram realizados, em intervalos de 30 minutos cada banho. Após, o tecido ficou em uma mistura homogênea de etanol e xilol por 16 horas, passou por três banhos de xilol com duração de 20 minutos cada um, para seguir para a impregnação em parafina líquida, por três horas, a 58°C.

Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com 3,0 µm de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris (Merck), por 60 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente com água destilada para posterior coloração com eosina (Merck) durante 1 minuto, segundo Beutler *et al.* (1995) e Culling *et al.* (1985). Após a coloração, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico, no laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 4.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a fixação em líquido Karnowski (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C), as peças foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a 4°C. Em seguida, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 1 hora. A contração em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão foram em resina Epon-812 (LUFT, 1961).

Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultra-finos foram então contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (REYBOLDS, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

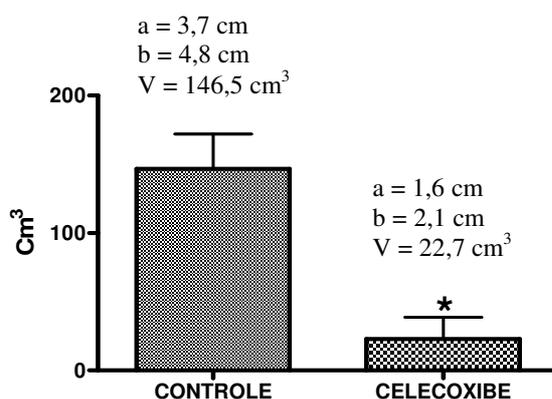
Para a comparação e análise estatística entre os grupos controle e tratamento foi utilizado o teste *t-Student*. Quando mais de dois grupos foram comparados, como, por exemplo, ao se comparar animais com tumor tratados e não tratados, com animais não inoculados (hígidos), fez-se Análise de Variância (ANOVA de uma via), seguindo-se *post hoc* de Bonferroni. Ambos os testes consideraram 95% ( $p < 0,05$ ) o nível de significância.

Para a taxa de sobrevivência, o método utilizado foi o Kaplan-Meier, e as curvas de sobrevivência foram comparadas através do teste logrank. Este teste, semelhante ao teste de Mantel-Haenszel quando se comparam dois grupos, gera um valor de  $p$  que testa a hipótese nula, que por sua vez postula que as duas curvas são iguais. Para a confecção de todos os gráficos, o programa utilizado foi o Prisma (*Graph Pad Prism 4*).

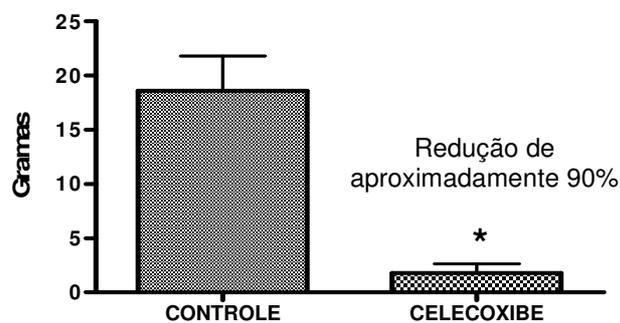
Com relação à histopatologia, as análises foram descritivas, tanto por microscopia óptica quanto eletrônica.

## 6. RESULTADOS

Os primeiros parâmetros avaliados foram o peso e o volume tumoral nos grupos tratado com celecoxibe e não tratado (controle), e valores significativamente menores de volume tumoral, condizentes com a massa, foram encontrados nos animais tratados, como pode ser visto nas figuras 01 e 02, respectivamente. As médias de diâmetros dos tumores (Figura 01) foram utilizadas para o cálculo do volume e da supressão tumoral, segundo a fórmula proposta por Mizuno *et al.* (1999). Tendo em vista os tratamentos, chegou-se à supressão de aproximadamente 84,5% no grupo tratado com o celecoxibe em relação ao grupo controle, segundo a fórmula proposta por Mizuno *et al.*(1999).

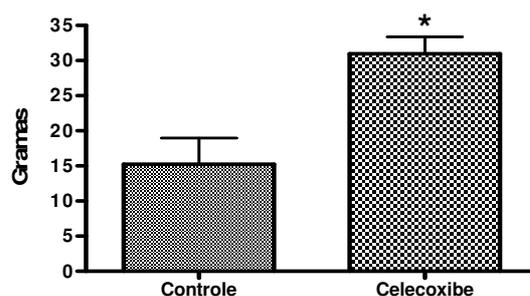


**Figura 01.** Volume do tumor Walker-256 dos grupos controle e celecoxibe ao final do tratamento, em  $\text{cm}^3$ , sendo *a* o menor, *b* o maior diâmetro do tumor e *V* o volume. Dados expressos em média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N = 07



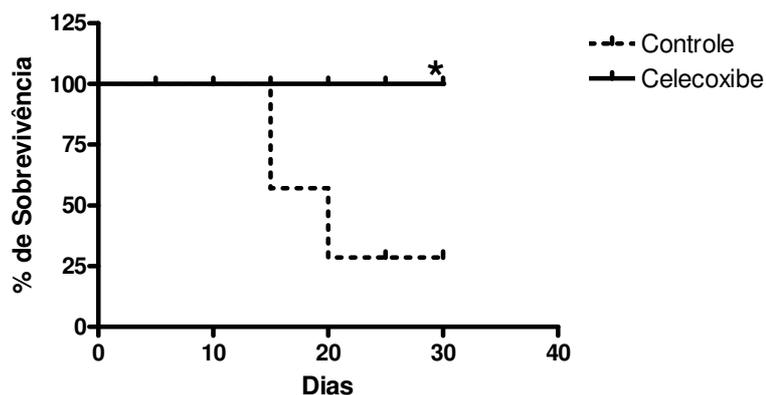
**Figura 02.** Valores de massa tumoral, em gramas, dos grupos controle e celecoxibe, ao final do tratamento. Dados expressos em média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N= 05.

Outro resultado importante no modelo de neoplasia usado neste trabalho foi a diferença de ganho de peso dos animais do primeiro ao último dia de experimento, uma vez que este modelo é de caquexia, e a perda de peso ou ausência de ganho é um de seus principais sinais. A variação de peso dos animais durante o tratamento, descontando o peso final do tumor, está ilustrada na figura 03, e revela um maior ganho de peso nos animais tratados com o celecoxibe, ganho este de aproximadamente 50%.



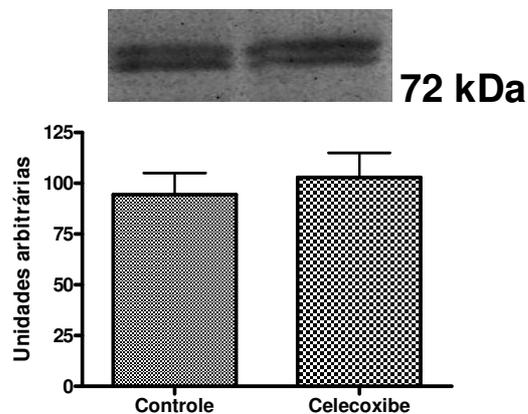
**Figura 03.** Variação de peso dos grupos controle e celecoxibe durante o período de tratamento; calculada pela diferença entre o peso no primeiro e 14º dia de experimento, descontado o peso final do tumor. Dados expressos em média  $\pm$  epm. Teste *t* de Student. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N = 07.

Com relação à taxa de sobrevivência dos animais no período de 30 dias, também houve diferença significativa entre os grupos. Todos os animais do grupo celecoxibe sobreviveram, enquanto os do grupo controle, com exceção de um, ou 25%, morreram até o vigésimo dia de tratamento, conforme mostra a figura 04.

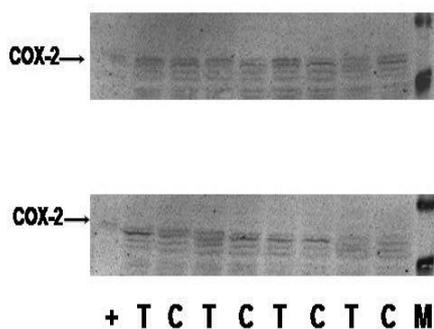


**Figura 04.** Taxa de sobrevivência dos grupos controle e celecoxibe durante o período de 30 dias de tratamento. Dados expressos em porcentagem. Teste Logrank (método de Kaplan e Meier) \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N = 07.

Para tentar esclarecer o mecanismo de ação antitumoral do celecoxibe foi avaliada a expressão da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) através de *western blotting*. A figura 05 evidencia a expressão dessa proteína em tecido tumoral, que foi similar nos dois grupos, enquanto na figura 06 é possível verificar que a expressão de COX-2 no fígado foi muito baixa, de modo que as bandas não puderam ser mensuradas por densitometria.

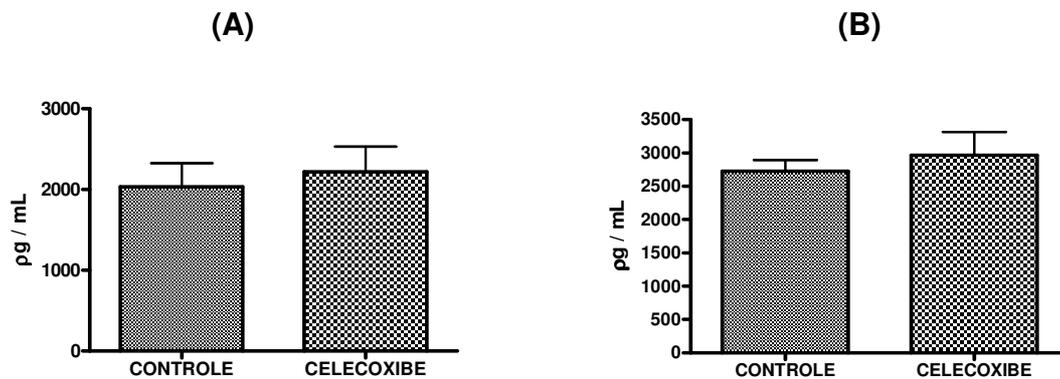


**Figura 05.** Expressão tecidual da enzima ciclooxigenase-2 por *western blotting* em tecido tumoral, convertida em unidades arbitrárias através de densitometria, nos grupos Controle e Celecoxibe. Teste *t* de Student, significativo quando  $p < 0,05$ .  $N = 07$ .



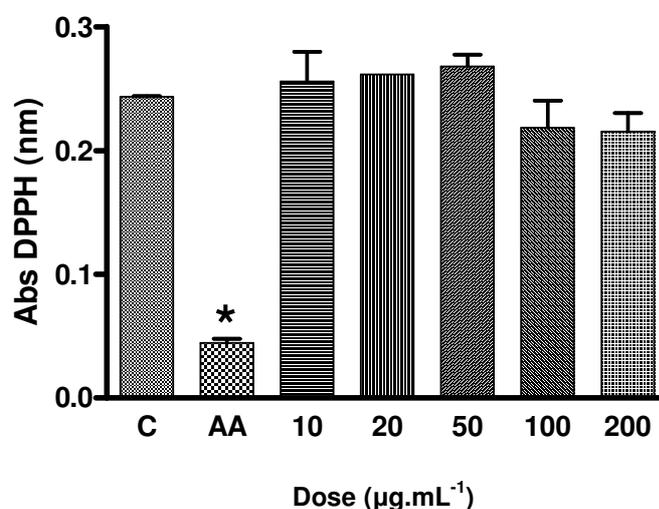
**Figura 06.** Fracas bandas de *western blotting*, evidenciando a baixa expressão de COX-2 em tecido hepático. T = tratado com celecoxibe, C = controle (tumor), M = marcador de peso protéico.

Além de avaliar propriamente a expressão de COX-2, sua atividade foi testada através da mensuração de um de seus principais produtos, a prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), tanto no tumor quanto na urina. Conforme verificado na figura 07, não houve diferença significativa entre os grupos em ambas as avaliações.



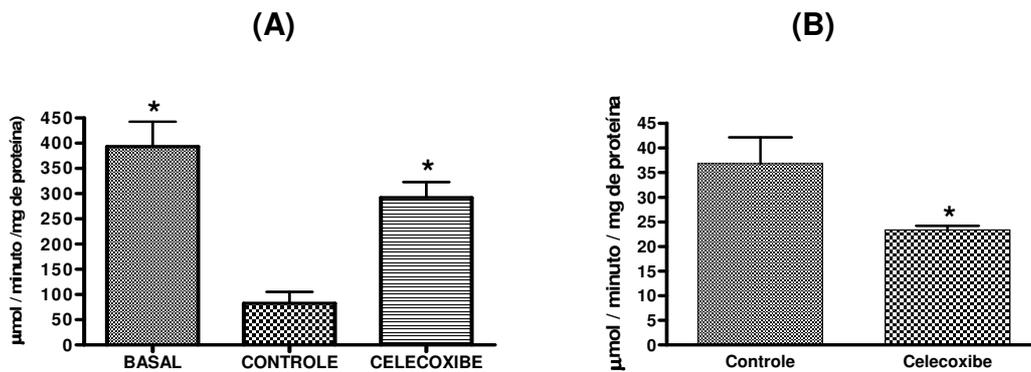
**Figura 07.** Valores de prostaglandina E<sub>2</sub> (pg/mL) na urina, representada no gráfico A, e em tecido tumoral, representada no gráfico B, nos grupos controle e celecoxibe. Teste *t* de Student, significativo quando  $p < 0,05$ . N = 05.

Além da atividade anti-COX-2, outra hipótese testada neste estudo para explicar a atividade antitumoral do celecoxibe foi a atividade antioxidante. O resultado do primeiro ensaio realizado, que avaliou a capacidade do celecoxibe em seqüestrar espécies reativas, está ilustrado da figura 08, e mostra que nas diferentes concentrações testadas (10 a 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) não houve qualquer atividade antioxidante *per se*, especialmente ao se comparar com o controle positivo (Ácido Ascórbico 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).



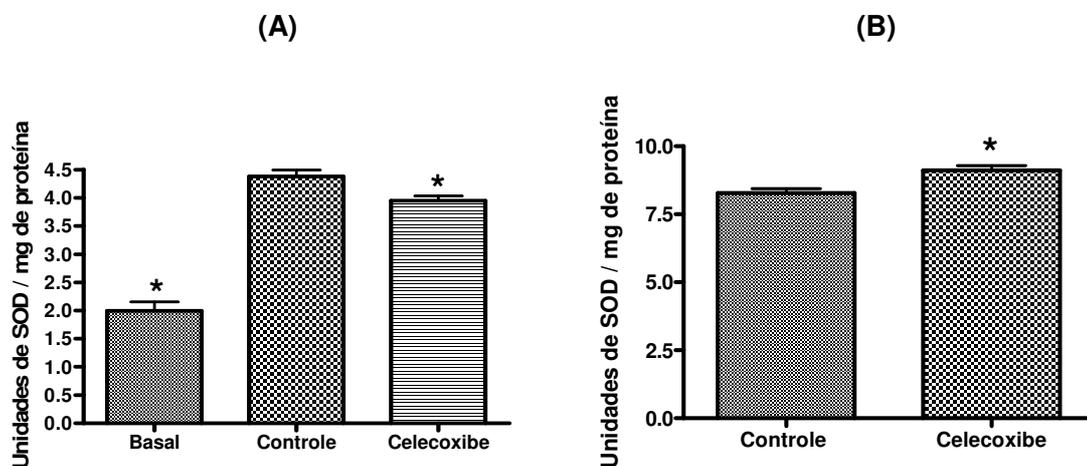
**Figura 08.** Avaliação da atividade seqüestradora do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelo celecoxibe. Como controle negativo, foi utilizado o diluente, Tampão Tris, representado por C. Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico, representado no gráfico como AA. Os valores 10, 20, 50, 100 e 200 representam as concentrações de celecoxibe, em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via. \* $p < 0,05$ , em relação aos outros grupos.

A mensuração das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, no entanto, evidenciou que houve diferença estatística na atividade da catalase hepática, como mostra a figura 09A. Observa-se, inclusive, que não houve diferença estatística entre os grupos celecoxibe e basal, sendo este composto por animais hígidos, não inoculados com tumor e tratados apenas com o veículo. A atividade dessa mesma enzima foi também avaliada no tecido tumoral, e o seu resultado pode ser observado na figura 09B. Observou-se que a atividade da catalase, expressa por  $\mu\text{mol}/\text{min.mg}^{-1}$  de proteína, no tecido tumoral foi bem menor do que no tecido hepático, mostrando que essa enzima é consideravelmente mais ativa no fígado do que no tumor Walker-256, e o tratamento com o celecoxibe reduziu ainda mais sua atividade no tumor.



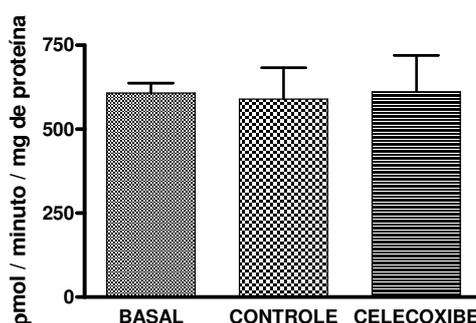
**Figura 09.** Atividade da enzima catalase hepática no gráfico (A), e tumoral no gráfico (B), após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via, *post-hoc* Bonferroni (A) ou teste *t* de Student (B). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle. N = 05.

A atividade da superóxido-dismutase (SOD) foi também avaliada no fígado e no tumor. Na figura 10 é evidenciada maior atividade desta enzima no tecido tumoral do que no tecido hepático, diferindo dos resultados da CAT.



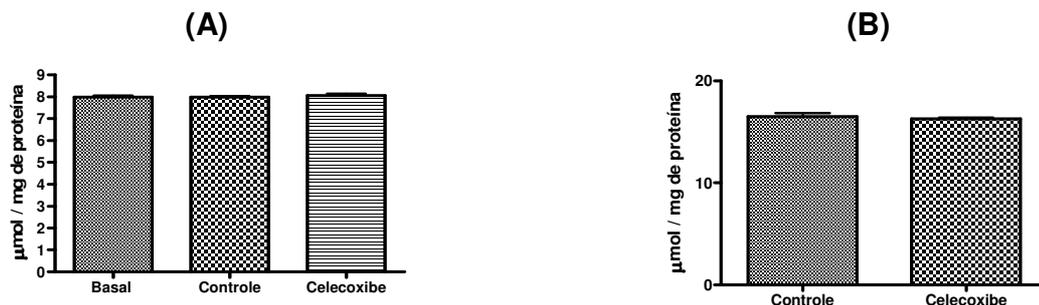
**Figura 10.** Atividade da enzima superóxido-dismutase hepática (A) e tumoral (B) após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via, *post-hoc* Bonferroni (A) ou teste *t* de Student (B). \* $p < 0,05$  significativo em relação ao grupo controle. N = 05.

A atividade enzimática da glutationa-S-transferase (GST) hepática está mostrada na figura 11, e não houve diferença entre os grupos. Ao se avaliar a mesma enzima no tumor, não se conseguiu reação e leitura espectrofotométrica, provavelmente por que o tecido do tumor Walker-256 não a expressa. Por esta razão os dados não estão apresentados.



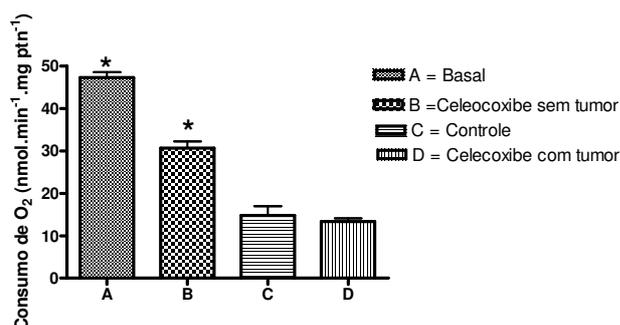
**Figura 11.** Atividade enzimática de glutathione S-transferase (GST), em fígado, após tratamento com o celecoxibe, comparada com os grupos controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via, significativo quando  $p < 0,05$ . N = 07.

Os dados referentes ao ensaio de peroxidação lipídica (LPO) estão apresentados na figura 12, e também não mostram diferença entre os grupos, tanto no fígado quanto no tumor.

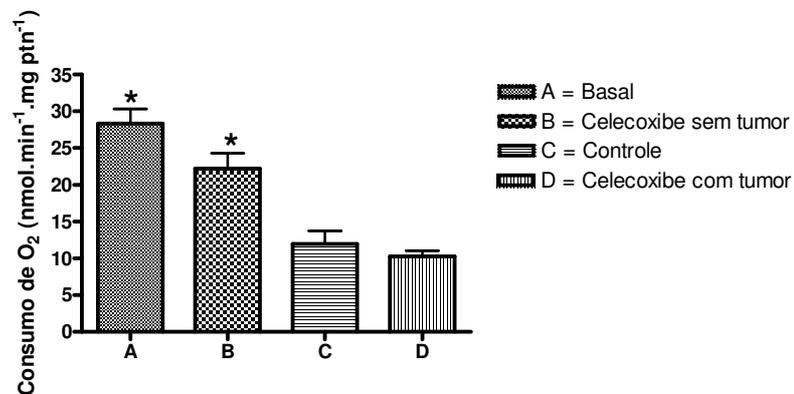


**Figura 12:** Taxa de peroxidação lipídica (LPO) em tecido hepático, representada no gráfico (A), e tecido tumoral, representada no gráfico (B), após tratamento com o celecoxibe, comparadas com o grupo controle (animais com tumor e tratados com tampão tris) e basal (animais sem tumor tratados com tampão tris). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via (A) e Teste *t* de Student (B), significativos quando  $p < 0,05$ . N = 05.

Com mitocôndrias isoladas de células hepáticas dos animais, foram avaliadas as atividades de NADH oxidase e succinato oxidase, mostradas nas figuras 13 e 14 como consumo de oxigênio pelas mitocôndrias durante o ensaio. Ambas as enzimas tiveram o mesmo comportamento, ou seja, as atividades foram reduzidas pelo tratamento com celecoxibe em animais sem tumor, foram ainda mais reduzidas na presença do tumor e não foram recuperadas pelo celecoxibe diante do tumor.

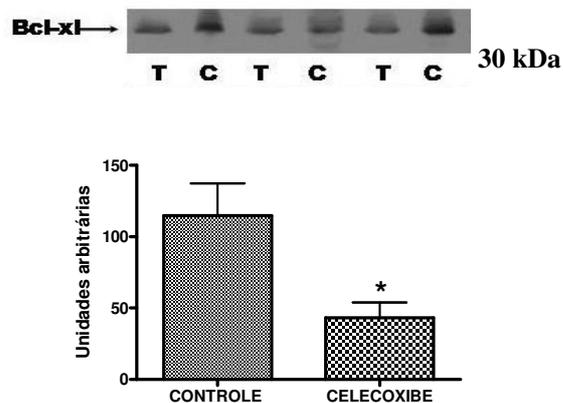


**Figura 13.** Atividade da enzima NADH oxidase, medida em consumo de oxigênio pelo método polarográfico, em mitocôndrias hepáticas isoladas após 14 dias de tratamento nos grupos A (Basal = animais hígidos tratados com tampão tris), B (animais hígidos tratados com celecoxibe), C (animais com tumor tratados com tampão tris) e D (animais com tumor tratados com celecoxibe). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via, *post hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$ .



**Figura 14.** Atividade da enzima Succinato oxidase, medida em consumo de oxigênio pelo método polarográfico, em mitocôndrias hepáticas isoladas após 14 dias de tratamento nos grupos A (Basal = animais hígidos tratados com tampão tris), B (animais hígidos tratados com celecoxibe), C (animais com tumor tratados com tampão tris) e D (animais com tumor tratados com celecoxibe). Dados expressos em média  $\pm$  epm. ANOVA de uma via, *post hoc* de Bonferroni. \* $p < 0,05$ .

Com relação à influência do celecoxibe na apoptose celular, a figura 15 mostra a expressão de *Bcl-X<sub>L</sub>* em tumor, através de *western blotting*, a qual foi significativamente menor nos tumores de animais tratados.

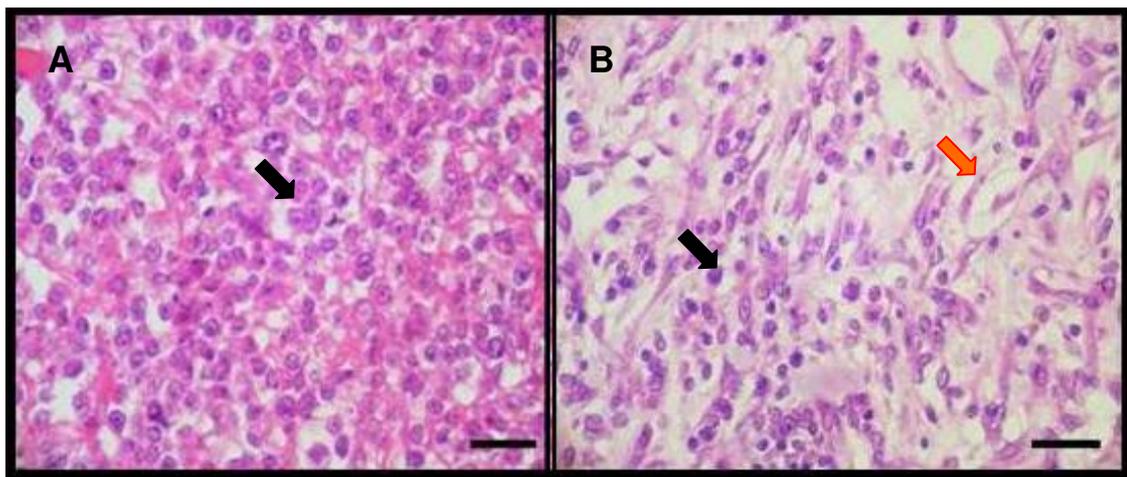


**Figura 15.** Expressão da enzima antiapoptótica *Bcl-X<sub>L</sub>*, em tecido tumoral, convertida em unidades arbitrárias através de densitometria, nos grupos controle (C) e tratado com celecoxibe (T). Teste *t* de Student. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle. N = 05.

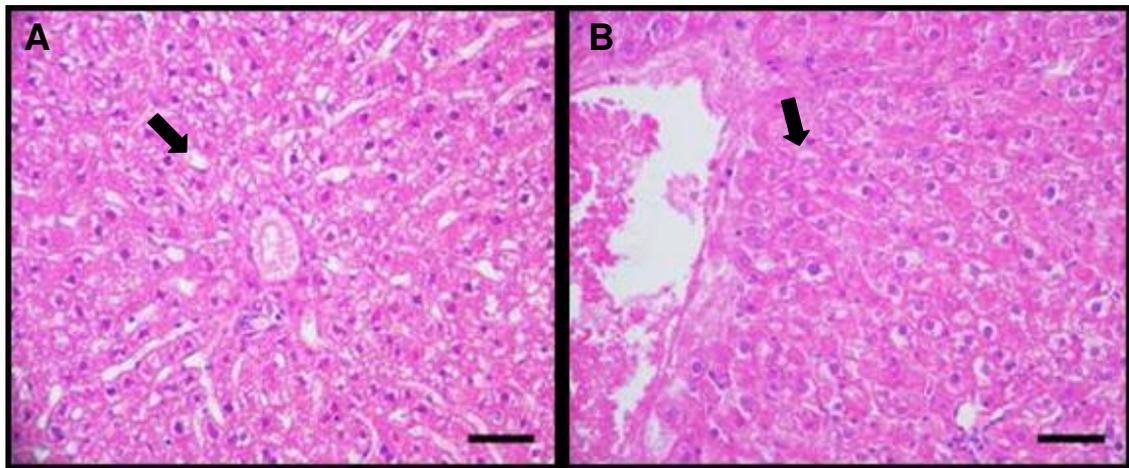
A análise histopatológica de fígado evidenciou alterações em hepatócitos do grupo tratado com celecoxibe, como tumefação e presença de vacúolos, provavelmente de gordura (para confirmação dessa característica, é necessária a utilização de coloração histológica especial). Com relação à análise histopatológica realizada nos tumores, foram observadas características comuns aos dois grupos, como células redondas ou poliédricas com centro eosinofílico, núcleo pouco delimitado e alta relação núcleo: citoplasma. As células possuíam moderado a acentuado pleomorfismo celular. O núcleo em geral apresentava-se central, oval, com cromatina periférica, um a três nucléolos grandes e conspícuos, além de acentuada anisocariose. Entre as células, presença de finos feixes de tecido conjuntivo e moderada quantidade de vasos, e em muitas áreas acentuado número de figuras de necrose. Em alguns cortes, proliferação de células fusiformes, com citoplasma alongado e núcleo oval ao redor de pequenos grupos de células individuais, muitas vezes formados por material condróide levemente basofílico, estava presente. Em algumas áreas havia células neoplásicas no interior de vasos e adipócitos dispersos. A classificação dos tumores se baseou nas características celulares: quando se observava células fusiformes mesenquimais e células poliédricas epiteliais malignas, classificava-se como carcinossarcoma. Quando somente células epiteliais eram observadas, a classificação era de carcinoma. Importante salientar que essa classificação foi para os fragmentos analisados. Assim, a classificação da lâmina deu-se pela maior quantidade de fragmentos com determinada característica. O quadro abaixo revela características das lâminas analisadas, de tumor e de fígado de animais tratados e não tratados, e as figuras 16 e 17 evidenciam algumas características celulares encontradas na histopatologia, no tecido tumoral e no fígado, respectivamente.

<b>Tumor</b>		
<i>Características observadas</i>	<i>Controle</i>	<i>Tratamento</i>
Classificação	Carcinossarcoma	Carcinoma
Necrose	Multifocal ++	Multifocal ++
Observações		Infiltração de heterófilos ++
<b>Fígado</b>		
<i>Características observadas</i>	<i>Controle</i>	<i>Tratamento</i>
Tumefação	-	Centrolobular e celular difusa ++
Observações		Degeneração vacuolar centrolobular ++

**Quadro 01.** Características histopatológicas avaliadas em cortes de fígado e tumor Walker-256 em ratos tratados com celecoxibe e controle.

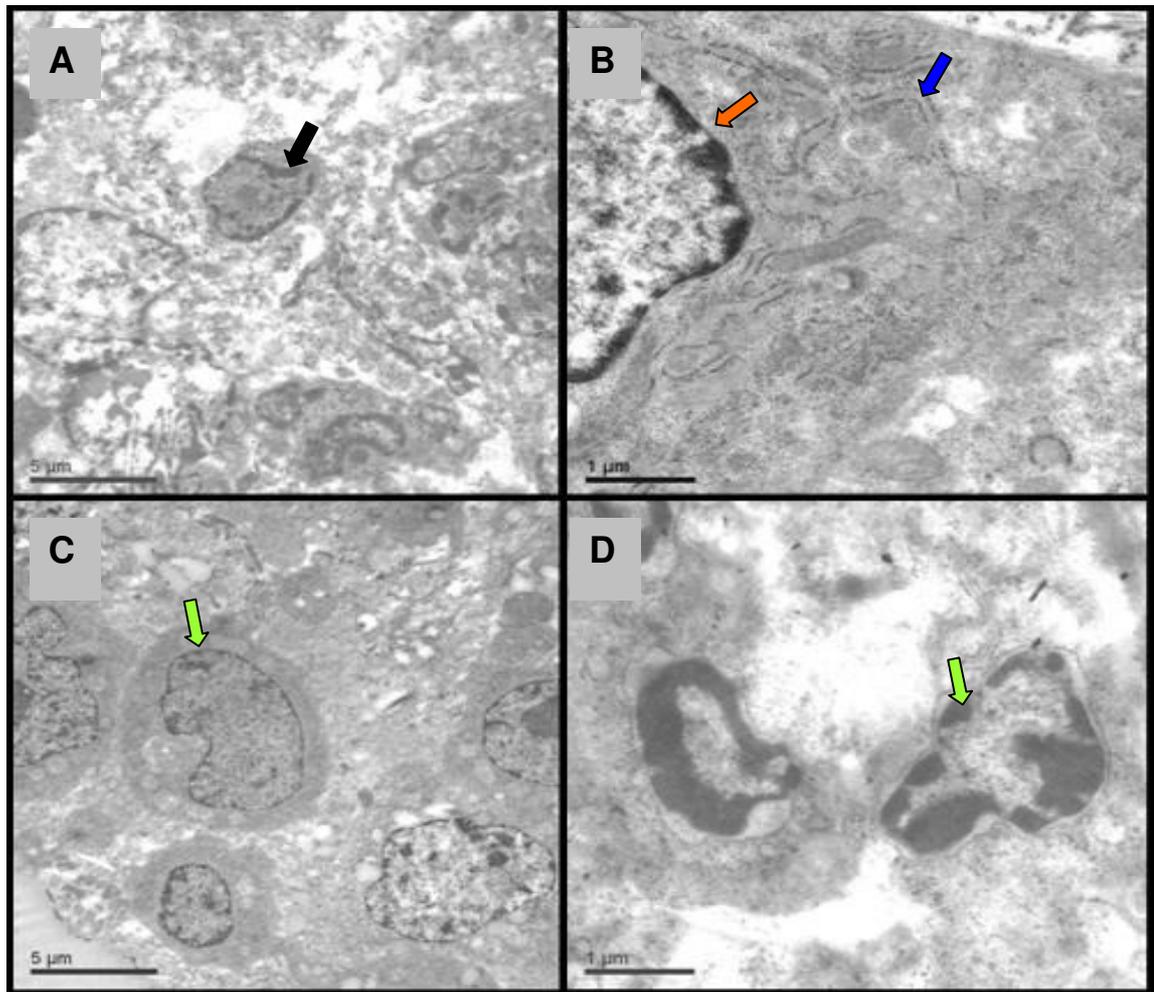


**Figura 16.** Microscopia óptica de células do tumor Walker-256, mostrando o predomínio de células epiteliais em (A), de animais do grupo Celecoxibe e destacado na seta preta, considerado assim um carcinoma. Em (B), destaca-se a presença de células epiteliais (seta negra) juntamente com mesenquimais (seta vermelha), sendo essa lâmina proveniente de tumor de animal pertencente ao grupo Controle, e esse fragmento classificado como carcinossarcoma.



**Figura 17.** Microscopia óptica de fígado de ratos tratados com celecoxibe, revelando a presença de vacuolização celular, em (A), como destacado pela seta; e tumefação celular, indicada em (B) pela seta. Ambas as alterações são sugestivas de degeneração gordurosa.

A análise em microscopia eletrônica (Figura 18), feita apenas em tecido tumoral, revelou importantes alterações em células de tumores de ratos tratados com o celecoxibe; como fragmentação da heterocromatina; alteração de envoltório nuclear; intensa vacuolização citoplasmática, apesar da presença de algumas mitocôndrias; indefinição de contornos celulares; e núcleos em processo de destruição, além da perda da arquitetura celular, não sendo possível identificar, nos tumores de animais tratados, algumas organelas citoplasmáticas que eram facilmente visualizadas nas figuras de tumores dos animais do grupo controle. Essas alterações observadas podem ser indícios de apoptose celular.



**Figura 17.** Microscopia eletrônica de células do tumor Walker-256. **A** = grupo controle, evidenciando núcleo eucromático e heterocromatina periférica, destacada pela seta preta. **B** = grupo controle, mostrando citoplasma intacto, poros nucleares (indicado pela seta vermelha) e organelas preservadas, como o retículo endoplasmático indicado pela seta azul. **C** = grupo celecoxibe, mostrando heterocromatização (seta verde), além de não ser possível identificar organelas como em B; e **D** = heterocromatização (seta verde) e perda da arquitetura normal da célula.

## 7. DISCUSSÃO

Existem muitos relatos na literatura afirmando os efeitos do celecoxibe em tumores, pois pode diminuir a gravidade e os sinais da doença instalada em diversos órgãos (YEE *et al.*, 2005; ARELLANES-ROBLEDO *et al.*, 2006; FULZELE *et al.*, 2006; GEE *et al.*, 2006; HARRIS *et al.*, 2006; LIU *et al.* 2005; TOTH & COLES, 2006; ACCO *et al.*, 2007). Em um levantamento clínico, o uso do celecoxibe e do rofecoxibe reduziu de modo significativo (71%) o risco de câncer de mama, mostrando o grande potencial quimiopreventivo destes AINES (HARRIS *et al.*, 2006). Em camundongos inoculados com um agente cancerígeno (1,2-DMH), o uso de celecoxibe na dieta promoveu efeito semelhante. Neste estudo, o aparecimento de neoplasias intestinais diagnosticadas como adenomas polipóides e adenocarcinomas de ceco, cólon e reto, reduziu em 26 a 35 semanas após o estímulo carcinogênico diante do tratamento com celecoxibe (TOTH & COLES, 2006).

Em tumor pulmonar experimental de camundongos, o celecoxibe foi testado em duas vias de administração, oral e aerossol, em combinação com docetaxel intravenoso, e ambas as formas farmacêuticas mostraram a mesma eficácia terapêutica. Na forma de aerossol, no entanto, uma menor dose é necessária, o que pode ser promissor para o tratamento de câncer pulmonar (FULZELE *et al.*, 2006).

Em um estudo que investigou os efeitos quimiopreventivos do celecoxibe em lesões pré-neoplásicas induzidas por hepatocarcinogênese química, houve decréscimo das lesões, em área e número (ARELLANES-ROBLEDO *et al.*, 2006). Segundo Liu *et al.* (2005), o celecoxibe pode inibir a proliferação celular e a indução de apoptose de células de hepatoma de maneira dose e tempo-dependente. Outro estudo, com linhagem celular do mesmo carcinoma (células NPC/CNE2), mostrou que o efeito do celecoxibe é tempo-dependente, pois a primeira dose do fármaco, em 6 horas após terapia fotodinâmica mostrou maior controle tumoral. Entretanto, os tumores que receberam a dose inicial de celecoxibe em 24 horas após o tratamento não tiveram este mesmo controle de crescimento (YEE *et al.*, 2005).

Finalmente, um ensaio *in vitro*, utilizando linhagens celulares de tumor de bexiga humano *UM-UC-1*, *-3*, e *-6*, foi feito com dois inibidores seletivos da COX-2, NS-398 e celecoxibe (100  $\mu$ M), e ambos produziram inibição do crescimento de modo dose-dependente (GEE *et al.*, 2006). Através dos resultados apresentados no presente trabalho, percebe-se a capacidade do celecoxibe em diminuir o volume e a massa do tumor Walker-256. Na dose utilizada (25 mg/kg ao dia) provocou inibição de 84,5% no crescimento tumoral, superior à redução previamente publicada (75%) com 12,5 mg/kg de celecoxibe ao dia - lembrando que nesse estudo citado foi utilizada a dose de 25 mg/kg ao dia também e não houve diferença com a de 12,5 mg/kg ao dia (ACCO *et al.*, 2007). Os resultados do presente trabalho, em relação à redução tumoral, foram também superiores à obtida com óleo de peixe na dieta de ratos com o mesmo tumor, que foi de 60% (TOGNI *et al.*, 2003). Estes dados legitimam o papel antitumoral do fármaco em questão, sendo possível acrescentar o modelo do tumor Walker-256 à lista de neoplasias sensíveis ao celecoxibe.

Segundo Acco *et al.* (2007), além da redução tumoral, o celecoxibe permitiu a preservação do ganho de peso dos animais com Walker-256 e manteve importantes vias metabólicas hepáticas em níveis comparáveis a condições normais, recuperando a ureogênese, a neoglicogênese e a glicogenólise, reduzindo a amoniogênese, normalizando o consumo de oxigênio de hepatócitos e recuperando a produção de piruvato e lactato hepáticos. A glicólise e a transformação hepática de alanina encontram-se diminuídas quando Walker-256 está presente, caracterizando a condição de caquexia induzida pelo tumor. Os animais tratados tiveram essas vias restabelecidas pelo tratamento com o celecoxibe. Assim, as alterações histológicas encontradas no presente estudo com o uso do celecoxibe, como vacuolização e tumefação de hepatócitos, parecem não interferir em vias metabólicas hepáticas básicas. A esteatose foi descrita em ratos que receberam celecoxibe em uma dose diária de 20 mg/kg - semelhante à usada neste trabalho (25 mg/kg ao dia) - por seis semanas, sendo essa alteração histológica grandemente potencializada pelo etanol (BYKOV *et al.*, 2006), e vacúolos citoplasmáticos também foram visualizados em células SKOV3 de câncer ovariano

após tratamento com celecoxibe (WANG *et al.*, 2007). Vários genes hepáticos envolvidos no metabolismo de gorduras foram verificados no estudo de Lu & Aecher (2007), sendo o gene da ácido-graxo-sintase o único *down*-regulado pelo celecoxibe, administrado durante 15 semanas a ratos Sprague-Dawley, indicando que este fármaco pode interferir no metabolismo lipídico.

Investigação prévia mostrou que o celecoxibe é relativamente seguro e pouco hepatotóxico, e mesmo sendo metabolizado no fígado (CYP2C9), não produz alterações plasmáticas significativas de indicadores clássicos da função hepática, como alanina aminotransferase (ALT) e bilirrubina, inclusive durante o uso prolongado (dois anos) (MADDREY *et al.*, 2007). A tênue interferência hepática e a manutenção de vias metabólicas podem explicar, ao menos em parte, a melhora clínica dos pacientes tratados com esse fármaco, assim como pode justificar neste estudo o ganho de peso e a alta taxa de sobrevivência (100%) dos animais após 30 dias de tratamento, uma vez que a caquexia é o principal fator neste modelo de câncer que induz à morte. Resultado menos efetivo foi obtido com suplementação de óleo de peixe na dieta de ratos com Walker-256, nos quais a taxa de sobrevivência ao longo do mesmo período foi de 50% (TOGNI *et al.*, 2003). Um relato prévio com os antiinflamatórios indometacina, ibuprofeno e aspirina neste mesmo modelo de câncer, já sugeria que os inibidores de prostaglandinas poderiam melhorar o quadro de caquexia em câncer (HOMEM-DE-BITTENCOURT JR *et al.*, 1989).

Ambos os efeitos, terapêuticos e colaterais, de antiinflamatórios não esteroidais (AINES), como o celecoxibe, são principalmente dependentes da inibição da COX (SÜLEYMAN, DEMIRCAN e KARAGÖZ, 2007). A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), derivada da COX-2, pode promover crescimento do tumor pela ligação a seus receptores e ativação de vias de sinalização que controlam a proliferação celular, migração, apoptose e/ou angiogênese. AINES inibem esses processos mediados pela PGE<sub>2</sub>, e estudos pré-clínicos confirmaram que antiinflamatórios, seletivos ou não para COX-2, diminuíram o risco de câncer cólon-retal, assim como de outros tumores através da redução da síntese de PGE<sub>2</sub> (WANG & DuBOIS,

2006). No presente trabalho, não houve diferença significativa entre os grupos tanto na expressão da enzima COX-2 tumoral quanto na sua atividade, medida através do nível de PGE<sub>2</sub> no tumor e na urina. Um trabalho prévio falhou em demonstrar quantidades significativas de PGE<sub>2</sub> em células Walker-256 em cultura usando outros métodos de detecção, radioimunoensaio e cromatografia líquida de alta performance (VARANI & PERONE, 1985). Esses dados indicam que o celecoxibe deve agir em células do tumor Walker-256 de modo COX-2-independente, o que confirma outra pesquisa, na qual o envolvimento das enzimas lipooxigenases (LOXs), mas não das ciclooxigenases, nas células Walker-256 foi bem estabelecido. Pronunciada apoptose destas células em cultura foi conseguida pela adição de inibidores de LOXs, enquanto a adição de inibidores de COXs (indometacina e ibuprofeno) não induziram morte celular nas doses testadas (5 a 100 µM) (TANG, CHEN e HON, 1996). Este modo de ação foi também sugerido em cultura de outras linhagens tumorais, pois a inibição do crescimento celular induzida pelo celecoxibe foi revertida pela adição de PGE<sub>2</sub> exógena em linhagem pouco invasiva (MDA-MB-468), mas não nas células altamente invasivas (MDA-MB-231). Isto indica que o modo de ação do celecoxibe pode ser extremamente complexo e diferir consideravelmente entre os tipos celulares tumorais (BASU *et al.*, 2005).

Na mesma linha de raciocínio, um estudo *in vitro* investigou o efeito do celecoxibe em três linhagens de carcinoma de nasofaringe: HK-1, Hone-1 e CNE-2. O celecoxibe inibiu o crescimento de todas as linhagens celulares de modo dose-dependente. Esta inibição mostrou-se, no entanto, independente dos níveis de COX-2 expressa nas células (CHAN *et al.*, 2005). Sauter *et al.* (2004), em um estudo feito em mulheres com alto risco para desenvolver câncer de mama, demonstraram que o celecoxibe não foi capaz de diminuir níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> em aspirados locais e também no plasma. Os autores atribuíram esse resultado a algumas hipóteses, como o grande intervalo decorrido entre a última administração e a coleta de material, em relação ao tempo de meia-vida do fármaco (11,2 horas). No nosso caso, o intervalo entre a última administração da droga e a mensuração de PGE<sub>2</sub> foi maior que 24 horas, podendo então ter influenciado a

detecção de algum efeito na atividade da enzima. Análises com colheita de material em um tempo menor após a última administração poderiam confirmar ou descartar essa hipótese.

Adicionalmente, a expressão de COX-2 no fígado foi muito baixa, a ponto de não ser quantificada por densitometria após o ensaio de western blotting. O resultado pode ser explicado por que esta enzima é constitutivamente expressa nos rins, cérebro, medula espinhal, ducto deferente, útero e ilhotas pancreáticas (FOSSLIEN, 2000), não sendo o fígado órgão primário de expressão da COX-2 e, portanto, também não deve ser alvo específico das ações do celecoxibe (ACCO *et al.*, 2007). Células endoteliais de sinusóides, no entanto, sintetizam um composto prostaglandina-*like*, que previne a agregação plaquetária dentro dos sinusóides (BARTOLINI *et al.*, 1978), e hepatócitos produzem PGE<sub>2</sub>, inclusive na presença do celecoxibe, segundo uma pesquisa em ratos Sprague-Dawley que receberam a droga por 15 semanas (LU & ARCHER, 2007).

Deasy *et al.* (2007) utilizando antiinflamatórios não esteroidais em células de carcinoma de esôfago, demonstraram um efeito antiproliferativo independente da produção de prostaglandinas, e conseqüentemente independente de COX-2. Os autores postularam a idéia de que as concentrações necessárias para obter o efeito antiproliferativo são bem maiores do que as doses antiinflamatórias. De fato, a dose utilizada em nosso trabalho (25 mg/kg) é maior do que a dose antiinflamatória, pois foi calculada alometricamente partindo-se da dose quimiopreventiva (400 a 800 mg/dia) máxima de humanos.

Muito se discute a respeito da ação antitumoral do celecoxibe independentemente da atividade e expressão de COX-2, e uma das possibilidades aventadas para explicar tais efeitos é o mecanismo antioxidante (KIRKOVA *et al.*, 2007). Nossos resultados no ensaio *in vitro* com o radical DPPH, no entanto, demonstraram que o celecoxibe não apresentou atividade antioxidante *per se*, sugerindo então que possa ter efeito sobre a atividade de enzimas anti ou pró-oxidantes, uma vez que espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel efetivo na patogênese de diferentes tipos de doenças, incluindo o câncer.

Radicais livres induzidos pela peroxidação lipídica causam perda na homeostase ao modificarem a estrutura e a função da membrana celular. No entanto, células mamíferas possuem mecanismos de defesa antioxidantes elaborados, a fim de neutralizar os efeitos deletérios desses radicais livres (MANOHARAN *et al.*, 2005).

É muito reconhecido o papel dual das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que pode ser benéfico ou deletério. Essa característica ambígua é substanciada pela evidência da ação dessas espécies como mensageiros em cascatas de sinalização, onde induzem ou mantêm o fenótipo oncogênico de células tumorais, mas também podem participar da senescência e apoptose celular, e assim agir como espécies antitumorais também (VALKO *et al.*, 2006). Via de regra, no entanto, a produção cumulativa de espécies reativas de oxigênio em muitas células tumorais está ligada à regulação *redox* alterada nas cascatas de sinalização. Uma menor atividade no núcleo e nas mitocôndrias não apenas facilita o escape da apoptose como também produz um potencial de proliferação, através da ativação de sinais de sobrevivência celular mediados por fatores de transcrição nuclear sensíveis a mecanismos de *redox*. Assim, pode-se esperar níveis diminuídos de enzimas antioxidantes em pacientes com câncer (VALKO *et al.*, 2006).

Muitas células tumorais apresentam níveis aumentados de metabolismo comparado a células normais, o que pode levar a maior formação de espécies reativas de oxigênio. A SOD-manganês é encontrada na matriz mitocondrial e parece estar depletada em muitos tumores quando comparada a tecidos normais, e a atividade da SOD citoplasmática (CuZnSOD) varia muito conforme o tipo celular tumoral. Isto sugere que uma grande quantidade de superóxido ( $O_2^\bullet$ ) é encontrada em muitas células de câncer e que, na ausência da atividade de SOD esse  $O_2^\bullet$  pode então gerar peroxinitrito ( $OONO^-$ ) e radical per-hidroxil ( $HO_2^\bullet$ ), que por sua vez desempenham importante papel na formação tumoral. Foi demonstrado também que o retorno da atividade dessas enzimas a níveis encontrados em células não malignas resultou na conversão do excesso de  $O_2^\bullet$  para  $H_2O_2$ , o que levou à diminuição do crescimento tumoral em alguns modelos estudados (DEVEREUX *et*

*al.*, 2007). Nossos resultados demonstram aumento da atividade da SOD no tecido tumoral no grupo tratado ( $9,113 \pm 0,171$  U SOD.mg ptn<sup>-1</sup>), em relação ao controle ( $8,277 \pm 0,164$  U SOD.mg ptn<sup>-1</sup>), sugerindo que ocorreu um aumento na atividade antioxidante do tumor, como resposta à geração de ânion superóxido. Resultado semelhante foi encontrado em tecido hepático num modelo de isquemia e reperfusão (OSTURK *et al.*, 2006), e o aumento consubstancial da geração de O<sub>2</sub><sup>°</sup> foi também reportada em fígado com hepatocarcinoma (KONSTANTINOV *et al.*, 1987). No caso dos animais com tumor Walker-256, a geração de O<sub>2</sub><sup>°</sup> não deve ocorrer nos segmentos succinato oxidase e NADH oxidase da cadeia respiratória, pois a atividade destas enzimas está reduzida nos animais com tumor, e o celecoxibe não foi capaz de reverter este quadro. Inclusive, em fígado de animais sadios, na ausência de tumor, o celecoxibe também reduziu a atividade de ambas em relação ao grupo basal. A mensuração destas enzimas mitocondriais diretamente no tumor não foi feita, embora possa haver diferença na quantidade de proteínas mitocondriais em células tumorais (LUCIAKOVÁ & KUZELA, 1992), na atividade enzimática e nos peptídeos de alto peso molecular que constituem mitocôndrias, como já foi demonstrado em tumor de mama em comparação com células de glândula mamária normal (WHITE & NANDI, 1976).

O tumor Walker-256, em animais não tratados, é capaz de elevar os níveis de SOD também no hipotálamo, cerebelo e hipocampo (FREITAS *et al.*, 2001). Nossos resultados demonstram que esse aumento pode também ocorrer no tecido hepático, pois o valor médio encontrado para a SOD hepática em animais com tumor ( $4,377 \pm 0,1136$  U SOD.mg ptn<sup>-1</sup>) é o dobro do valor em animais sadios ( $1,992 \pm 0,1600$  U SOD.mg ptn<sup>-1</sup>). Nos animais com tumor, o tratamento com o celecoxibe diminuiu a atividade dessa enzima no fígado ( $3,946 \pm 0,088$  U SOD. mg ptn<sup>-1</sup>), indicando, provavelmente, menor geração do substrato (O<sub>2</sub><sup>°</sup>) para enzima.

A catalase é uma enzima que promove eficientemente a conversão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à água e oxigênio molecular. Segundo Valko *et al.* (2006), a capacidade diminuída de uma variedade de tumores em detoxificar o peróxido de hidrogênio está ligada a menores níveis de catalase. É possível inferir

pelos nossos dados que os animais tratados com celecoxibe tiveram seus níveis hepáticos de catalase aumentados ( $292,0 \pm 31,03$  mmol/minuto. mg ptn<sup>-1</sup>) em relação ao controle ( $82,48 \pm 22,9$  mmol/minuto. mg ptn<sup>-1</sup>), o que sugere uma resposta ao quadro oxidante sistêmico desencadeado pelo tumor. Este estado oxidante foi atestado por Freitas *et al.* (2001) em hipotálamo e cerebelo de ratos inoculados com tumor Walker-256 subcutâneo. A atividade específica da catalase neste modelo é bem maior no tecido hepático do que no tumoral (Figura 09), afirmando o potencial do fígado como órgão antioxidante em um quadro patológico sistêmico, como a malignidade do tumor Walker-256. O celecoxibe exibiu atividade antioxidante ao restabelecer os níveis de catalase hepática nos animais tratados. Osturk *et al.* (2006) também verificaram essa propriedade do fármaco, através de aumento significativo na atividade dessa enzima em amostras de fígado de ratos submetidos à lesão de isquemia e reperfusão.

Com relação à menor atividade específica da catalase tumoral no grupo tratado, levanta-se também a hipótese de que o peróxido de hidrogênio, sendo uma molécula mais solúvel que outras espécies reativas (VALKO *et al.*, 2006), possa ter atravessado mais facilmente as membranas celulares e, ao ser produzido em excesso no tumor, pela dismutação do ânion superóxido, tenha sido neutralizado no tecido hepático ou nos eritrócitos, onde a atividade da catalase é bem mais pronunciada, conforme demonstrado e discutido anteriormente. Dosagens de níveis de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio nesses tecidos terão valioso papel na complementação do presente trabalho, pois nossos resultados fornecem apenas um valor indireto dessas moléculas ao mensurar as atividades das enzimas cujos substratos são essas espécies reativas.

A GST é outra enzima que participa na defesa das células normais contra uma variedade de carcinógenos endógenos e ambientais, pela reação de conjugação entre a GSH e eletrófilos reativos ou oxidantes. A inativação do gene GSTP1 parece acompanhar a carcinogênese do câncer de próstata. Isso leva à possibilidade que a deficiência da atividade da enzima GST em células epiteliais da próstata possa limitar a capacidade dessas na defesa eletrófila e oxidante. As

células que não expressam o gene GSTP1 têm um significativo aumento na acumulação de bases de DNA oxidadas com potencial mutagênico, após a exposição prolongada à baixa radiação, em comparação às células que expressam a GSTP1 (DEWEESE, HRUSZKEWYCZ & MARNETT, 2001). Em relação à enzima GST, neste estudo não houve nenhuma diferença significativa na atividade da GST hepática nos animais tratados com o celecoxibe ( $610,7 \pm 108,5$  pmol/minuto.mg de proteína<sup>-1</sup>) em comparação ao controle ( $588,87 \pm 93,07$  pmol/minuto.mg de proteína<sup>-1</sup>) e ao basal ( $607,5 \pm 29,52$  pmol/minuto.mg de proteína<sup>-1</sup>). A GST tem um papel relevante nas defesas antioxidantes e sua inativação está envolvida na carcinogênese, entretanto, essa enzima não parece ser alvo dos efeitos do celecoxibe no estresse oxidativo, e tampouco foi possível mensurar sua atividade em tecido tumoral. Uma análise complementar a este estudo seria a avaliação da atividade de outra enzima antioxidante primária, a glutathiona peroxidase (Gpx), ou ainda a mensuração de níveis da molécula antioxidante glutathiona reduzida (GSH).

Outro aspecto a ser considerado no estresse oxidativo é o caráter lesivo da lipoperoxidação (LPO) especialmente sobre membranas. Nossos dados, porém, mostram que não houve diferença na LPO entre os grupos avaliados, tanto no fígado quanto no tumor, corroborando os achados de Kirkova *et al.* (2007) em células de mucosa gástrica e de cólon. Apesar disto, a geração de peróxidos no tecido tumoral teve o dobro do valor encontrado no fígado, o que pode explicar, pelo menos em parte, os danos em envoltório nuclear e membranas (indefinição de contornos celulares) observados em microscopia eletrônica das células tumorais de animais tratados com o celecoxibe. A presença de LPO amplifica os processos de radicais livres, pois de quatro a 10 eventos de propagação podem resultar da iniciação de um simples radical (MYERS, 1997), sugerindo que o aumento da SOD tumoral, especialmente nos animais tratados com o celecoxibe, é uma resposta à maior geração de substrato desencadeada pela LPO. Nossos dados mostram que os valores de LPO se correlacionam positivamente com os de SOD, pois ambos estão aproximadamente duas vezes mais elevados no tumor do que no fígado.

Os radicais livres são reconhecidos também como importantes produtos da biotransformação que participam da patogênese de lesões hepáticas quimicamente induzidas em humanos e animais. Como o fígado é o principal órgão biotransformador do organismo, disrupções bioquímicas devido ao aparecimento de metabólitos reativos podem ocorrer, mesmo que muitas dessas espécies químicas não sejam nem identificadas (PLAA, 1997), e as mitocôndrias são organelas que tanto geram quanto sofrem efeitos destas espécies reativas. Neste trabalho, os resultados obtidos com mitocôndrias isoladas mostram que a atividade das enzimas hepáticas succinato oxidase e NADH oxidase está reduzida cerca de três vezes na presença do tumor, o que confirma a mesma redução obtida na citocromo oxidase e succinato desidrogenase em homogenato de hepatocarcinoma (SUN & CEDERBAUM, 1980). O celecoxibe não conseguiu recuperar a atividade de ambas as enzimas na presença do tumor subcutâneo, indicando que o padrão de metabolismo mitocondrial alterado, principalmente quando estimulado pelo succinato, pode influenciar a regulação de outras enzimas (Ex: NADPH) e o transporte de cálcio (FISKUM & PEASE, 1986), alterando outros eventos celulares.

O celecoxibe pode, ainda, atuar no ciclo celular, e conseqüentemente, na indução da apoptose. O tratamento com o fármaco causa acúmulo das células tumorais nas fases G<sub>0</sub> e G<sub>1</sub>, e ao parar a progressão do ciclo celular no *checkpoint* G<sub>1</sub>-S inibe a transição para a fase S. Provavelmente, a inibição do ciclo celular pelo fármaco é devido à diminuição das proteínas ciclina A, B1 e D1 e as cdk-1 e cdk-2, e ao aumento das proteínas inibitórias do ciclo p21 e p27 (GROSH S *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005). Essas atividades no ciclo celular parecem, em parte, ser independentes da inibição da COX-2, pelos seguintes motivos: a concentração requerida de celecoxibe para inibir a proliferação celular é maior do que a concentração requerida para inibir a atividade da COX-2; esses efeitos não foram revertidos com a adição de PGE<sub>2</sub> ou imitados com a inibição da COX-2; e o rofecoxibe não produziu os mesmos efeitos (GROSH *et al.*, 2006).

Outra explicação para os efeitos antitumorais de AINES, como o celecoxibe, baseia-se em estudos em que altas doses desses fármacos inibem o crescimento

tumoral e induzem apoptose através de mecanismos independentes de COX, regulando diferentes alvos, como a atividade da enzima 15-LOX-1,37, o gene antiapoptótico *Bcl-X<sub>L</sub>* e a sinalização do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (WANG & DuBOIS, 2006). Grösch *et al.* (2006) também citam em sua revisão estudos envolvendo o celecoxibe e vias apoptóticas intrínsecas, incluindo menor expressão de proteínas antiapoptóticas, como a *Bcl-2*, *Bcl-X<sub>L</sub>*, *Mcl-1* e survivina, assim como o aumento da expressão de *Bad*, uma proteína pró-apoptótica. Nossos dados corroboram esta afirmação, pois no W256 a expressão de *Bcl-X<sub>L</sub>* foi significativamente menor nos animais tratados com celecoxibe. Yu *et al.* (2003), ao avaliar a quimioprevenção do celecoxibe em modelo de câncer gástrico em ratos, demonstraram que os efeitos antineoplásicos do celecoxibe decorrem da indução de apoptose e inibição na proliferação de células tumorais. Em células de carcinoma hepatocelular o celecoxibe atua sinergicamente com quimioterápicos na indução da apoptose, de uma maneira COX-2 dependente, considerando que a inibição da COX-2 acopla diferentes vias apoptóticas, estimulando sinalização de *death receptors*, ativando caspases ou a apoptose proveniente de mitocôndrias (KERN *et al.*, 2004). A morte celular também pode ser desencadeada por mecanismos COX-2-independentes, pois o OSU-03012, um derivado do celecoxibe desprovido de atividade COX-2-inibidora, também induziu morte celular através de mecanismos caspase-dependentes, principalmente induzindo a expressão de quinase de retículo endoplasmático *PKR-like* (PERK), que medeia a ativação de múltiplas proteases tóxicas (PARK *et al.*, 2008). Este estudo *in vitro* reforça a tese de ação antitumoral COX-2 independente e mediada por mecanismos apoptóticos.

Liu *et al.* (2007), em células de osteossarcoma humano, ao avaliarem o celecoxibe, sozinho e em combinação com o agente quimioterápico cisplatina, observaram que o antiinflamatório causou interrupção da fase G1 da mitose e inibiu significativamente o crescimento celular, assim como potencializou a apoptose induzida pela cisplatina. Esse efeito foi dose-dependente, e mudanças características de morte celular programada por apoptose, como fragmentos de DNA e corpos apoptóticos foram observados através de microscopia eletrônica.

Estes dados vão de encontro aos nossos obtidos por este método, pois a condensação de cromatina nuclear, fragmentação do DNA e alteração do envoltório nuclear são indicativos de apoptose celular (TANG, CHEN e HON, 1996). Ainda, células tratadas com cisplatina tiveram uma menor expressão de COX-2, que por sua vez não foi potencializada pelo celecoxibe. Os autores concluíram através de seus resultados que o celecoxibe exerce sua atividade antitumoral através de mecanismos independentes de COX-2, que podem ser, por sua vez, dependentes de fatores como o regulador de apoptose fosfatidilinositol 3-quinase, além de ter relação com a proteína anti-apoptótica survivina e com a família Bcl-2. Dados obtidos com células de estroma associadas a tumores prostáticos mostraram que o celecoxibe reduziu o nível das proteínas *Bcl-X<sub>L</sub>* e XIAP (DANDEKAR *et al.*, 2005), da mesma maneira que foi observada a redução da *Bcl-X<sub>L</sub>* nas células do tumor W256 neste trabalho.

Fukada *et al.* (2007) em linhagem de câncer cervical humano, também detectaram menores níveis de survivina com o tratamento com o celecoxibe. Além disso, a utilização de um fármaco análogo ao celecoxibe, porém sem atividade inibidora de COX-2, denominado dimetil-celecoxibe, diminuiu também a expressão de survivina tanto em linhagens celulares de tumores humanos (células derivadas de glioblastoma, linfoma, mieloma múltiplo, e carcinomas de mama, cólon e próstata) quanto em modelo animal de glioblastoma (PYRKO *et al.*, 2006). Esses resultados (TANG, CHEN e HON, 1996 ; YU *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2004; GRÖSCH *et al.* 2006 ; PYRKO *et al.*, 2006 ; WANG & DuBOIS, 2006; FUKADA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007) corroboram os encontrados no presente trabalho, como alterações sugestivas de apoptose em célula tumoral através de microscopia eletrônica e diminuição na expressão da proteína antiapoptótica *Bcl-X<sub>L</sub>* no tumor Walker-256 de animais tratados com o celecoxibe. Análise da expressão da proteína survivina pode ser muito útil para elucidar a via de apoptose utilizada pelo celecoxibe nesse modelo de estudo.

## **8. CONCLUSÕES**

Os presentes resultados confirmam o potencial quimiopreventivo do celecoxibe no modelo de tumor Walker-256, assim como o seu papel no restabelecimento das condições orgânicas dos animais tratados, evidenciado através da supressão tumoral, ganho de peso no período de tratamento e taxa de sobrevivência.

O efeito antitumoral no modelo W256 parece ocorrer de modo independente da modulação na atividade da enzima ciclooxygenase-2, mas depende da supressão de vias antiapoptóticas e da regulação da homeostase redox, provocada pelo fármaco ao regular a atividade de enzimas antioxidantes primárias, como catalase e superóxido-dismutase, e ao reduzir a geração de espécies reativas via oxidases mitocondriais.

## REFERÊNCIAS

- ACCO, A *et al.* Action of celecoxib on the hepatic metabolic changes induced by the Walker-256 tumor in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n.101, p. 294–300, 2007.
- AEBI H. Catalase *in vitro*. **Academic Press**, n.105, p.121-126, 1984.
- ALBINI A, SPORN M The tumor microenvironment as a target for chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, n.07 p. 139-147, 2007.
- AMIR M, AGARWAL HK. Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of cancer. **Pharmazie**, n.60(8), p. 563-570, 2005.
- ARELLANES-ROBLEDO J. *et al* Celecoxib induces regression of putative preneoplastic lesions in rat liver. **Anticancer Research**, n.26(2A), p. 1271-80, 2006.
- BAHIA SHA, MATTOS IE, KOIFMAN S. Cancer and wood-related occupational exposure in the Amazon region of Brazil. **Environmental Research**, n. 99:132-140, 2005.
- BARTOLINI G. *et al.* **Biochimica et Biophysica Acta**, n.30, p.325-332, 1978.
- BASU GD. *et al* Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, n.7, p.422–435, 2005.
- BEAUTLER, E *et al.* **Williams Hematology**, McGraw Hill, New York, 1995.
- BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, n.72, p.248-254, 1976.
- BYKOV IL. *et al.* Chronic effects of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, cause enhanced alcohol-induced liver steatosis in rats. **Inflammopharmacology**, n.14(1-2), p.36-41, 2006.
- CERCHIATTI LC. *et al.* Effects of celecoxib, medroxyprogesterone, and dietary intervention on systemic syndromes in patients with advanced lung adenocarcinoma: a pilot study. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.27(1), p.85-95, 2004.
- CHAN CM. *et al.* Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Suppl 2, p.S268-71, 2005.
- CHANDRASEKHARAN NV. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs:cloning, structure, and expression **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol 99, n 21, p 13926–13931, 2002
- CHEN Y. *et al* 1.1-Diphenyl-2- picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2226–2228, 1999.
- CIANCHI F. *et al.* Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 2694–2704, April 15, 2004.
- CNUBBEN, N.H.P *et al.* The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Phamarmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

- COTRIM H. *et al.* A case-control study on the association of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Northeast Brazil. **Revista de Saúde Pública**, n. 26(5), 1992.
- CULLING, C.F.A., ALLISON, R.T., BARR, W.T., **Cellular Pathology Technique**, Butterworth and Co. Ltd, London, 1985.
- CURITIBA, SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE **Boletim Epidemiológico**, Ano XVIII, nº01, 2007.
- DANDEKAR DS, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v.20; n.115(3), p.484-92, 2005.
- DAVIS TW, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. 308(3), p.929-934, 2004.
- DEASY BM. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors demonstrate anti-proliferative effects in oesophageal cancer cells by prostaglandin E2-independent mechanisms **Cancer Letters**, n. 256, p. 246–258, 2007.
- DEVEREUX M, *et al.* Synthesis, catalase, superoxide dismutase and antitumour activities of copper(II) carboxylate complexes incorporating benzimidazole, 1,10-phenanthroline and bipyridine ligands: X-ray crystal structures of [Cu(BZA)2(bipy)(H2O)], [Cu(SalH)2(BZDH)2] and [Cu(CH3COO)2(5,6-DMBZDH)2] (SalH2 = salicylic acid; BZAH = benzoic acid; BZDH = benzimidazole and 5,6-DMBZDH = 5,6-dimethylbenzimidazole) **Polyhedron**, v. 26 p. 4073–4084, 2007.
- DEWEESE, T.L.; HRUSZKEWYCZ, A.M.; MARNETT, L.J. Oxidative stress in chemoprevention trials. **Urology**, v. 57, p.137-140,2001.
- EBERHARDT O, SCHULZ JB. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. **Toxicology Letters**, v.139, p.135-151, 2003.
- ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. **Methods in Enzymology**, New York, v. 10, p. 41-47, 1967.
- FERRARI V, *et al.* Gemcitabine plus celecoxib (GECO) in advanced pancreatic cancer: a phase II trial. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Sep v. 3, p. 1-6. 2005.
- FISKUM G, PEASE A. Hydroperoxide-stimulated release of calcium from rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria. **Cancer Research**, n.46(7), p.3459-63, Jul 1986.
- FOSSLIEN E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, n.7, p.431–502, 2000.
- FRANKS LM. What is cancer? In: Franks LM and Teich NM (eds) **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**, Oxford University Press: 1999, p.04.
- FREITAS JJS. *et al.* Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, n.77, p. 655±663, 2001.
- FUKADA K *et al.* Celecoxib induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in HeLa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.357 p. 1166–1171, 2007.

FULZELE SV. *et al.* Inhalation delivery and anti-tumor activity of celecoxib in human Orthotopic non-Small Cell Lung Cancer xenograft Model. **Pharmaceutical Research**, n.23(9), p.2094-106, Sep 2006. Epub 2006 Aug 11.

GASPARINI, G. *et al.* Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? **The Lancet Oncology**, v.4, p.605-615, 2003.

GATÉ, L. *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.53, p.169-180, 1999.

GEE J. *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer. **Oncology Reports**, n.15(2), p.471-7, Feb 2006.

GIGLIO A. Resistência à quimioterapia: uma revisão para o oncologista. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, n.14, p.32-38, 2001.

GROSH, S. *et al.* COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.15, p. 2742-2744, 2001.

GRÖSH, S. *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Independent Anticarcinogenic Effects os Selective COX-2 Inhibitors **Journal of the National Cancer Institute**, v.98, n 11, p. 736-747, jun 2006.

GUAITANI A. *et al.* Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v.39, p.173-178, 1982.

GUPTA S. *et al.* Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer Research**, v.64(9), p.3334-3343, 2004.

HABIG WH, PAPST MJ, JAKOBY WB. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130-7139, 1974.

HAN, C. *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21<sup>waf1/cip1</sup> and p27<sup>kip1</sup> and cell cycle arrest. **Cancer Research**, v. 64, p.1369-1376,2004.

HARRIS RE, BEEBE-DONK J, ALSHAFIE GA Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **BMC Cancer** v.30,p.6:27, Jan 2006.

HINZ B, BRUNE K Cyclooxygenase-2-10 Years Later **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, n 2, p.367-375, 2002.

HOMEM-DE-BITTENCOURT JUNIOR PI. *et al.* Effects of aspirin-like drugs on Walker 256 tumor growth and cachexia in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.22, n.8, p.1039-42, 1989.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**, 94 p. Rio de Janeiro: 2007.

IWASAKI M. *et al.* Cancer mortality among Japanese immigrants and their descendants in the State of São Paulo, Brazil, 1999-2001. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.34, n.11, p.673-680, 2004.

- JIANG Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.
- KELLOFF GJ, SIGMAN CC Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer-preventive drug development **Nature Reviews Cancer**, v. 07 p 508-518, 2007
- KERN MA. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v.15, n.66(14), p.7059-66, Jul 2004.
- KIRKOVA M, *et al.* In vivo effects of amtolmetin guacyl on lipid peroxidation and antioxidant defence systems. Comparison with non-selective and COX-2 selective NSAIDs. **Autonomic and Autocoid Pharmacology**, v.27, n.2, p.99-104, 2007.
- KONSTANTINOV AA. *et al.* Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.29, n.894(1), p.1-10, Oct 1987.
- KOREKANE H, ATSUSHI N, IMAMURA K Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.412, n.2, p.216-222, 15 April 2003.
- LANGSTEIN HN, NORTON JA. Mechanisms of cancer cachexia. **Hematology/Oncology Clinics North America**, n.5, p.103-123, 1991.
- LEIST M, NICOTERA P The Shape of Cell Death **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 1,p.1-9, 9 Jul 1997.
- LEV N, MELAMED E, OFFEN D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, n.27, p.245-250, 2003.
- LIU NB. *et al.* Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v.28, n. 11(40), p.6281-7, 2005.
- LIU B, SHI Z, FENG J, TAO H Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via downregulation of PI3K/Akt, **Cell Biology International**, 2007, doi:10.1016/j.cellbi.2007.10.008
- LOWRY OH, *et al.* Protein measurement with the polyphenol reagent. **Journal of Biochemical Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU S, ARCHER MC. Celecoxib decreases fatty acid synthase expression via down-regulation of c-Jun N-terminal kinase-1. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v.232(5), p.:643-53, May 2007.
- LUCIAKOVÁ K, KUZELA S. Increased steady-state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v.1, n.205(3), p.1187-93, 1992.
- LUFT, JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, n.9, p.409-414, 1961.

- MADDREY WC. *et al.* The hepatic safety and tolerability of the novel cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. **American Journal of Therapeutics**, n.7, v.151–152, 2000.
- MANOHARAN K, SURESH K, PANJAMURTHY Lipid peroxidation & antioxidants status in patients with oral squamous cell carcinoma **The Indian Journal of Medical Research**, n.122, p 529-534, December 2005.
- MANTOVANI G. *et al.* Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.13, n.10, 2004.
- MASFERRER, J.L. *et al.* Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, v.60, p.1306-1311, 2000.
- MATTSON, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders **MacMillan Magazines**, v.1, 2000.
- MIZUNO M. *et al.* Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochemical and Molecular Biology International**, v.47, p.707-714, 1999.
- MUND RC Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do Tumor de Walker 256 – Identificação dos mediadores participantes desse processo. **Dissertação de Mestrado – Biologia Celular**. UFPR, 2004.
- MYERS CR. Subcellular sites of xenobiotic-induced free-radical generation. In: Wallace KB (Editor). **Free Radical Toxicology**, Taylor & Francis: Washington. n.442, p.25-44, 1997.
- OFFEN D, ELKON H, MELAMED E. Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission**, n.58, p.153-166, 2000.
- OKADA H, MAK TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.8, p.592-603, 2004.
- O'SHAUGHNESSY JA, *et al.* Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. **Clinical Cancer Research**, n.8:314–346, 2002.
- OSTURK H, GEZICI A, OZTURK H The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats **Hepatology Research**, v.34, p. 76–83, 2004
- PARK M. *et al.* OSU-03012 stimulates PERK-dependent increases in HSP70 expression, attenuating its lethal actions in transformed cells. **Molecular Pharmacology**, Jan 8 [In press], 2008.
- PATEL, I.M. *et al.* Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.1999-2007, 2005.
- PENG J, ZHANG GY, XIAO ZQ. Effects of celecoxib on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cell line HT-29. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.29, n.3, p.261-265, 2004.
- PERROUD APAS. *et al.* Cytokine gene expression in Walker 256: A comparison of variants A (aggressive) and AR (regressive). **Cytokine**, 36: 123–133, 2006
- PFIZER Celebra. **Relatório Técnico-Científico**, 2006.

- PLAA, GL. Free-radical-mediated liver injury. In: Wallace KB (Editor). **Free Radical Toxicology**, Taylor & Francis: Washington. v.442 p.175-184, 1997
- PYRKO, P *et al.* Downregulation of survivin expression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo **Molecular Cancer**, v.5, n.19, 2006
- REDDY, B.S. *et al.* Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, Celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. **Cancer Research**, v.60, p.293-297, 2000.
- REYBOLDS, ES, The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, n.17, p.208–212, 1963.
- SAMBROOK, J., FRITISH, E.F., MANNIATIS, T.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, seção 15, p.1847-76. **Cold Spring Harbor**, New York, 1989.
- SAUTER ER *et al.* Lack of Effect of Celecoxib on Prostaglandin E2 Concentrations in Nipple Aspirate Fluid from Women at Increased Risk of Breast Cancer **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.13, n.11, p. 1745-50, 2004.
- SILVA M, SANTANA VS, LOOMIS D. Mortalidade por câncer em militares da Marinha do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.4, p.373-379, 2000.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and a-glycerophosphate dehydrogenases. **Methods of Biochemical Analysis**, Weinheim, v. 22, p.123-175, 1974.
- SÖDERGREN, E *et al.* Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.37, n. 3, p.137-146, Nov 1998.
- SÜLEYMAN H, DEMIRCAN B, KARAGÖZ, A. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, n.59, p. 247-258, 2007.
- SUN, AS, CEDERBAUM AI. Oxidoreductase activities in normal rat liver, tumor-bearing rat liver, and hepatoma HC-252. **Cancer Research**, v.40, n.12, p.4677-81, Dec 1980.
- SWAMY MV, PATLOLLA JM, STEELE, VE, KOPELOVICH L, REDDY BS, RAO CV. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by low doses of atorvastatin and celecoxib given individually and in combination to APCMin mice. **Cancer Research**, v.15, n.66(14), p.7370-7, Jul 2006.
- TAKETO, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis- Part I. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, n. 20, p.1529-1536,1998a.
- TAKETO, M.M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis- Part II. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, n. 21, p.1609-1620,1998b.
- TANG DG, CHEN YQ, HON KV. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences – USA**, v. 93, p. 5241-5246, May 1996.
- TISDALE MJ. Cancer Cachexia. **Anticancer Drugs**, n.4, p.115-125, 1993.

THUN, M.J.; HENLEY S.J.; PATRONO C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of National Cancer Institute**, v.94, n.4, p. 252-266, 2002.

TOGNI V. *et al.* .Cancer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with N-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, v.46, n.1, p.52-8, 2003.

TOTH B, COLES M Inhibition of large intestinal cancers by celecoxib using a serial sacrifice technique. **In Vivo**, v.20, n.4, p.453-7, Jul-Ago 2006.

TSAO AS, KIM ES, HONG WK Chemoprevention of Cancer. **CA - A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, p. 150-180, 2004

VALKO M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer **Chemico-Biological Interactions**, n.160, p.1-40, 2006

VAN RYN J, TRUMMLITZ G, PAIRET M. COX-2 Selectivity and Inflammatory Processes **Current Medicinal Chemistry**, v.07, n.11, p. 1145-1161, 2000.

VARANI J, PERONE P. Response of Walker 256 carcinosarcoma cells to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate: possible regulation by endogenous cyclooxygenase metabolites. **Journal of the National Cancer Institute**, v.74, n.1, p.165-72, Jan 1985.

VICENTINO C. *et al.* Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. **Liver**, n. 22, p.342-350, 2002.

VOSS, D.O; CAMPELO, A.P; BACILA, M. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 4, n. 1, p. 48 - 51, 1961.

WANG D, DuBOIS RN Prostaglandins and Cancer **Gut**, n.55, p.115-122; 2006.

WANG HJ. *et al.* The growth inhibitory effect of non-steroid anti-inflammatory drugs on ovarian cancer. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.38, n.3, p. 428-32, Jun 2007.

WATSON, ML, Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.4, n.4, p.475-478, 1958.

WENGER FA. *et al.* Effects of Celebrex an Zylfo on liver metastasis and lipidperoxidation in pancreatic cancer in Syrian hamsters. **Clinical & Experimental Metastasis**, n.19, p.681-687, 2002.

WHITE MT, NANDI S. Biochemical studies on mitochondria isolated from Normal and Neoplastic Tissues of the Mouse Mammary Gland. **Journal of National Cancer Institute**, v.56, n.1, p.65-73, Jan 1976.

YEE KK, SOO KC, OLIVO M Anti-angiogenic effects of Hypericin-photodynamic therapy in combination with Celebrex in the treatment of human nasopharyngeal carcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 16, n.6, p.993-1002, Dec 2005.

YU, J. *et al.* Chemoprevention of Mnng-induced gastric cancer in rat by celecoxib is independent of COX-2 and PGE2 suppression **Gastroenterology**, v. 124, n.4, suplemento 1, p A117, 2003.