

ANDREW SILVA DA CUNHA

Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

ANDREW SILVA DA CUNHA

Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Alison Colquhoun

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cunha, Andrew Silva da.

Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas Cox-1, Cox-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES / Andrew Silva da Cunha. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Alison Colquhoun.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Metabolismo da célula tumoral.

Versão do título para o inglês: Analysis of the role of prostaglandin E2 receptors in the proliferation and apoptosis of human glioma, and expression of the enzymes COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 and cPGES.

1. Neoplasias Cerebrais 2. Prostaglandinas I. Colquhoun, Profa. Dra. Alison II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0139/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andrew Silva da Cunha.

Título da Dissertação: Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas Cox-1, Cox-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES.

Orientador(a): Profa. Dra. Alison Colquhoun.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ich.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 352/09 referente ao projeto intitulado: "*Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e dos efeitos do ácido gama-linolenico sobre a expressão das enzimas Cox-1, Cox-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES*" sob a responsabilidade de **Andrew Silva da Cunha**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de dezembro de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

A Chave alquímica que transforma o conhecimento em sabedoria é a prática.

Sri Sachcha Prem Baba

À minha mãe que esteve ao meu lado desde sempre e me ensinou o significado do feminino que é a aceitação. Ao meu Pai que me ensinou o verdadeiro significado do masculino que é a realização. À minha irmã que me ensinou a ser irmão. À Patrícia que me ensina o valor da união. E ao meu Mestre que me ensinou tudo isso.

Sem o apoio dessas pessoas meu trabalho não teria sido concluído e meu sonho não seria realizado!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente a minha orientadora, Profa Dra. Alison Colquhoun pela oportunidade, apoio e confiança durante esses anos e principalmente pela humildade de compartilhar o seu conhecimento.

Ao meu amigo Marcel Benadiba por me trazer ao laboratório, por todas as conversas agradáveis e por me mostrar que devemos sempre buscar a concretização dos nossos sonhos.

À minha amiga Renata Gomes, por compartilhar o seu tempo, conhecimento e paciência, assim como por toda a ajuda prática nesses anos.

AGRADECIMENTOS

À Fernanda pelos momentos divertidos, ao Fábio (Forasteiro) pelas conversas, ao Felipe por toda ajuda durante o período final da composição deste trabalho, ao Matthew também pela ajuda, à Tati, minha amiga de outras épocas, pelos momentos divertidos e massagens durante essa fase de stress, ao Adriano por dividir os “plantões noturnos”, à Polly por me transmitir tranquilidade.

À todos vocês que fazem parte do laboratório obrigado pela força e amizade.

Ao Alfonso, obrigado pela ótima companhia, conversas agradáveis no lanche da tarde.

À equipe do laboratório do professor José Roberto, pelos diversos momentos agradáveis.

Ao Dr Rui Curi (departamento de fisiologia e biofísica ICB USP), e aos membros de seu laboratório pela disponibilidade do citometro de fluxo e de qualquer outro equipamento.

À todos os professores do departamento, em especial aqueles com quem pude ficar mais próximo.

À professora Dânia, pela oportunidade de aprendizado e estágio no PAE.

Ao professor Emer, pelas conversas sempre agradáveis.

À professora Marinilce, pelos diversos conselhos.

À professora Marília, pelo espaço de seu laboratório e por conversas agradáveis.

Ao Tio Bauer, por compartilhar seu conhecimento, que não é pouco, com tanta humildade e paciência.

As secretarias, por toda atenção e paciência.

À todos da biblioteca, por toda atenção e paciência.

À equipe da Xerox, pela eficiência.

À todos, que não estão citados, mas que tem minha gratidão pela ajuda direta e indireta.

Finalmente, a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Cunha AS. Análise do papel da prostaglandina E2 e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e da expressão das enzimas Cox-1, Cox-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Os gliomas são tumores do sistema nervoso central (SNC) que evoluem a partir das células da glia. O tipo mais frequente e mais agressivo destes tumores é conhecido como glioblastoma multiforme (GBM) e entre as características biológicas de agressividade associadas a esse tumor estão o seu rápido crescimento e ausência de apoptose. O seu prognóstico desfavorável está associado à dificuldade de tratamento dessas células, pois possuem resistência à quimioterapia e a radioterapia. A expressão gênica das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), prostaglandina E sintase-1 microssomal (mPGES-1), prostaglandina E sintase-2 microssomal (mPGES-2), prostaglandina E sintase citosólica (cPGES) e os produtos da síntese destas enzimas, incluindo a prostaglandina E₁ (PGE₁) e a prostaglandina E₂ (PGE₂) estão diretamente relacionados com a malignidade dos gliomas. A PGE₁ e a PGE₂ podem atuar de modo autócrino e parácrino, interagindo com suas células alvos através de ligação aos receptores da superfície celular que estão ligados a proteína G. Estes receptores são conhecidos como receptores EPs e dividem-se em quatro subtipos: EP-1, EP-2, EP-3 e EP-4 sendo que cada um deles ativa vias distintas de sinalização intracelular. Desta forma, este estudo teve por objetivo analisar *in vitro* o papel da PGE₁, PGE₂ e seus receptores na proliferação e apoptose em glioma humano, e a expressão das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES.

Palavras-chave: T98G. Glioma. Ciclooxigenase. Prostaglandina E2. Proliferação. Apoptose.

ABSTRACT

Cunha AS. Analysis of the role of prostaglandin E2 receptors in the proliferation and apoptosis of human glioma, and expression of the enzymes COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 and cPGES. [Master thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Gliomas are tumors of the central nervous system (CNS) that evolve from glial cells. The most common and most aggressive form of these tumors is known as glioblastoma multiforme (GBM). The biological aggressiveness of GBM is associated with its rapid growth and lack of apoptosis. Its poor prognosis is strongly associated with the difficulty of treating these cells as they are resistant to chemotherapy and radiotherapy. The gene expression of the enzymes cyclooxygenase-1 (COX-1), cyclooxygenase-2 (COX-2), microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1), microsomal prostaglandin synthase-2 (mPGES-2), cytosolic prostaglandin synthase (cPGES) and the products of the activity of these enzymes, including prostaglandin E1 (PGE1) and prostaglandin E2 (PGE2), are directly related to the malignancy of gliomas. PGE1 and PGE2 can act in an autocrine and paracrine manner, by interacting with their target cells via binding to cell surface receptors that are linked to G-proteins. These receptors are known as EP receptors and are divided into four subtypes: EP1, EP2, EP3 and EP4; each of which activates distinct intracellular signaling pathways. Therefore, this study aimed to analyze, *in vitro*, the role of PGE1, PGE2 and their receptors in the proliferation and apoptosis of human glioma and the expression of COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 and cPGES.

Keywords: T98G. Cyclooxygenase. Prostaglandin E2. Proliferation. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biosíntese de eicosanoides.....	27
Figura 2 – Expressão de mRNA para COX-1 e COX-2 nas células T98G e HT-29.....	40
Figura 3 – Expressão de mRNA para EP-2 e EP-4 nas células T98G e HT-29.....	40
Figura 4 – Expressão de mRNA para mPGES-1, mPGES-2 e cPGES nas células T98G e HT-29.....	41
Figura 5 – Expressão de proteínas para COX-1, COX-2 e GAPDH nas células T98G.....	42
Figura 6 – Expressão de proteínas para mPGES-1, mPGES-2 e GAPDH nas células T98G.....	42
Figura 7 – Curva dose-resposta de Prostaglandina E ₁ sobre a proliferação de células T98G.....	43
Figura 8 – Efeito de Prostaglandina E ₁ na proliferação celular da linhagem T98G.....	43
Figura 9 – Curva dose-resposta de Prostaglandina E ₂ sobre a proliferação de células T98G.....	44
Figura 10 – Efeito de Prostaglandina E ₂ na proliferação celular da linhagem T98G.....	44
Figura 11 – Curva dose-resposta do inibidor de Cox-1 (SC-560) sobre a proliferação de células T98G.....	45
Figura 12 – Curva dose-resposta do inibidor de COX-2 (NS-398) sobre a proliferação de células T98G.....	45
Figura 13 – Curva dose-resposta do Agonista EP2(Butaprost) sobre a proliferação de células T98G.....	46
Figura 14 – Curva dose-resposta do antagonista EP2 (AH-6809) sobre a proliferação de células T98G.....	46
Figura 15 – Curva dose-resposta do agonista EP4 (CAY 10580) sobre a proliferação de células T98G.....	47
Figura 16 – Curva dose-resposta do antagonista EP4 (L-161.982) sobre a proliferação de células T98G.....	47

Figura 17 – Ciclo celular da linhagem T98G após 48 horas de tratamento com PGE ₁ , PGE ₂ e inibidores para COX-1 e COX-2.....	48
Figura 18 – Ciclo celular da linhagem T98G após 48 horas de tratamento com agonistas e antagonistas para os receptores EP2 e EP4.....	49
Figura 19 – Comparação entre controle e tratado para PGE ₁	52
Figura 20 – Comparação entre controle e tratado para PGE ₂	52
Figura 21 – Comparação entre controle e tratado para SC-560.....	53
Figura 22 – Comparação entre controle e tratado para NS-398.....	53
Figura 23 – Comparação entre controle e tratado para Butaprost.....	54
Figura 24 – Comparação entre controle e tratado para AH-6809.....	54
Figura 25 – Comparação entre controle e tratado para Cay 10580.....	55
Figura 26 – Comparação entre controle e tratado para L-161.982.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos Oligonucleotídeos utilizados.....	34
Tabela 2 – Resultados da análise de ciclo celular.....	50
Tabela 3 – Resultados da análise de ciclo celular.....	50
Tabela 4 – Resultados da análise de ciclo celular.....	51
Tabela 5 – Resultados da análise de ciclo celular.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido Araquidônico

ABCG2 – Proteína de resistência ao câncer de Mama

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

AKT – Proteínaquinase B

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

BAX – Antagonista do BCL-2 (indutora de apoptose ou pró-apoptóticas)

°C – Graus Célsius

cDNA – DNA Complementar

CO₂ – Gás Carbonico

COX-1 – Ciclooxigenase1

COX-2 – Ciclooxigenase2

cPGES – Prostaglandina E sintasecitossólica

CTT – Carcinoma de células Transicionais

DEPC – Dimetilpirocarbonato

DMEM – Dubelcco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Di-metil Sulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleicos

dNTPmix – Mistura de desoxinucleotideos trifosfato

DTT – Dithiotreitol

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

EGF – Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)

EGFR – Receptor de EGF

EP1 – Receptor de PGE2 – 1

EP2 – Receptor de PGE2 – 2

EP3 – Receptor de PGE2 – 3

EP4 – Receptor de PGE2 – 4

EtRb – Brometo de Etidio

GAPDH – Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase

GBM – Glioblastoma Multiforme

kDA – kilodalton (unidade de medida do peso molecular de proteínas)

LPS – Lipopolissacarídeos

LT – Leucotrienos

MEC – Matriz extracelular

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus

mPGES-1 – Prostaglandina E Sintase 1 microssomal

mPGES-2 – Prostaglandina E Sintase 2 microssomal

mRNA – RNA mensageiro

MRP – Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas

MVP – Proteína Major-Vault

N₂ – Nitrogênio

Pb – Pares de Bases

PGE1 – Prostaglandina E1

PGE2 – Prostaglandina E2

PGI – Prostaciclina

PLA2 – Fosfolipase A2

PTEN – Homólogo da fosfatase e Tensinadeletado do Cromossoma 10

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reação em cadeia pela transcriptase reversa

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

TBS – Tampão Tris Salina

TGI – Trato Gastro Intestinal

TX – Tromboxano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Gliomas	19
1.2 Ciclooxygenases	22
1.3 Prostaglandina E2	25
1.4 Prostaglandina E Sintases terminais	29
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Cultura de células	32
3.2 Curvas Dose-Resposta	32
3.3 Análises de expressão gênica através de PCR Semiquantitativa	33
3.3.1 Extração de RNA total	35
3.3.2 Quantificação da concentração e determinação da razão A260/280	35
3.3.3 Preparo do DNA Complementar (cDNA)	36
3.3.4 RT - PCR (Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase)	36
3.4 Western Blot	37
3.5 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo, FACS-PI	38
3.6 Análise dos Dados	39
4 RESULTADOS	40
4.1 PCR	40
4.2 Western Blot	42
4.3 Curva de concentração e análise da proliferação	43
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

O sistema nervoso central (SNC) torna possível o contato, entre si, de todos os tecidos que constituem o organismo e o contato destes tecidos com o meio ambiente. Desta forma o equilíbrio do meio interno, isto é, a homeostase de cada célula depende dos estímulos vindos do meio externo, ou seja, o meio ambiente. Sendo assim, podemos dizer que a transformação de células normais em células neoplásicas resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas na célula de origem.

Nos estágios iniciais da doença, esses desequilíbrios são causados principalmente por agentes tóxicos ambientais e após sucessivas mutações essa célula é capaz de proliferar e migrar de forma autônoma formando o tecido tumoral (Miyake, 2009). Certas características são fundamentais para a determinação do fenótipo tumoral e incluem proliferação celular na ausência de estímulos fisiológicos, desenvolvimento de um estado refratário para sinais inibitórios de crescimento e para resposta imune, resistência a apoptose e capacidade infinita de replicação, formação de novos vasos sanguíneos e capacidade para invadir tecidos normais (Hanahan e Weinberg, 2000).

A exposição ocupacional e ambiental a carcinógenos, o status socioeconômico e nível de escolaridade, os tipos de alimentos consumidos são apontados como riscos para tumores de cérebro em estudos epidemiológicos (Ohgaki e Kleihues, 2005).

Os gliomas são os tumores intracranianos primários mais comuns em pacientes com diagnóstico para neoplasias no sistema nervoso central. Sua incidência vem aumentando com o passar do tempo e varia de acordo com gênero, idade, raça, etnicidade e geografia (Fisher et al., 2007).

Estes tumores desenvolvem-se nas células da glia e são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas por critérios histopatológicos. Eles são ordenados gradativamente de acordo com sua agressividade em uma escala que varia de I a IV sendo que o astrocitoma de grau IV é denominado glioblastoma multiforme (GBM) pelas suas

características de aumento de mitose, necrose, angiogênese e pleomorfismo celular (Louis et al., 2007).

Os principais sintomas nos pacientes com GBM são cefaleia e papiledema, causados muitas vezes pelo aumento da pressão intracraniana, mas outros sintomas também podem ocorrer, tais como crises epiléticas, náuseas e distúrbios de personalidade (Kettenmann e Ranson, 2005). O diagnóstico para GBM é, psicologicamente, devastador para os pacientes e seus familiares devido aos estigmas de mortalidade e dor enraizados na sociedade. Dessa forma, muitos dos pacientes tornam-se gradativamente mais dependentes da família e de seus cuidadores (Daves e Stoiber, 2011).

Há dois subtipos de GBM, classificados clinicamente como primário e secundário. O GBM primário surge, normalmente, em pacientes mais velhos e desenvolve-se com apresentando características de maior agressividade e invasividade. Já o GBM secundário, geralmente é observado em pacientes mais jovens e apresenta-se inicialmente como Astrocitoma de baixo grau, isto é, Astrocitoma (OMS grau II) ou astrocitoma anaplásico (OMS grau III) que se transforma em GBM de 5 a 10 anos após o diagnóstico inicial (Maher et al., 2001). O diagnóstico de glioblastoma secundário requer provas clínicas (neuroimagem) ou histológicas (Bióticos) de evolução de um Astrocitoma menos maligno.

A catalogação de lesões genéticas nestes subtipos GBM identificou diferenças em seus perfis genéticos, predominantemente na penetrância de mutações genéticas específicas e como resultado, tem sido proposto que o GBM primário e secundário representam duas entidades clínicas distintas, desenvolvendo-se por caminhos genéticos diferentes (Kleihues e Cavenee, 2000).

O GBM primário, muitas vezes, apresenta amplificação/mutação no gene EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal) e deleção dos exons 7-10 (Ohgaki e Kleihues 2007) assim como alterações em genes envolvidos na regulação do ciclo celular incluindo p53 e Rb (Watanabe et al., 1996).

O GBM primário é caracterizado pela amplificação/mutação no gene EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), juntamente com deleção ou mutação do supressor de tumor PTEN (Homólogo da Fosfatase e Tensina Deletado do

Cromossomo 10), um regulador negativo da via de sinalização da fosfatidil inositol 3 quinase / proteína quinase B (PI3K/AKT) que regula várias funções celulares normais, que também são críticas para a tumorigênese incluindo proliferação celular, sobrevivência, crescimento e mobilidade (Morgensztern e McLeod, 2005). Em contraste, GBM secundário, que evoluem a partir de lesões de baixo grau e ocorrem em indivíduos mais jovens, muitas vezes têm mutações do gene supressor de tumor TP53, mas só raramente têm amplificação do EGFR ou alterações do PTEN.

Os pacientes com diagnóstico para glioblastoma normalmente apresentam quadros de recorrência ou progressão da doença e, apesar de alguns progressos no tratamento possuem uma sobrevida média de 5-10 meses, sendo que 10-15% destes pacientes sobrevivem até 1 ano (Kostron e Bauer, 2011). A recorrência do glioblastoma multiforme nos pacientes pode ser explicada, em parte, pelo desafio que este tipo de câncer representa para o neurocirurgião, em relação à excisão do tecido tumoral suficientes para preservar as funções neurológicas e, assim, a qualidade de vida (Kostron e Bauer, 2011) e em parte pelas suas características invasivas cujo mecanismo é caracterizado pela perda da adesão célula-célula, formação de contatos celulares com a MEC (Matriz Extra Celular) e células vizinhas, degradação e remodelação da MEC e invasão da célula tumoral no tecido nervoso normal. (Stylli et al., 2008).

As células tumorais remanescentes no tecido nervoso normal podem continuar seus processos de proliferação, uma vez que radiação e/ou quimioterapia associados ao primeiro método cirúrgico podem não ter o efeito desejado (Mandl et al., 2008). Desta forma, uma única célula remanescente seria suficiente para o tumor ressurgir causando mais danos ao tecido normal.

A resistência celular ao tratamento oncológico é um importante determinante de resposta à radioterapia e à quimioterapia (Kaspers e Veerman, 2003). Muitos são os fatores envolvidos nos mecanismos de resistência celular a radioterapia nos GBM e entre eles estão as fases do ciclo celular, pois as células tumorais apresentam maior sensibilidade a essas terapias na fase G2-M (Pawlik e Keyomarsi, 2004) e os gliomas apresentam-se em várias fases do ciclo celular, a hipóxia (Liang, 1996), que pode induzir alterações no metabolismo celular e nas regulações gênicas (Bussink et al.,

2008), os Mecanismos eficientes de reparação do DNA (Bussink et al., 2008; Reichert et al., 2011) e o possível envolvimento da enzima Ciclooxygenase 2 (COX-2), que alguns estudos sugerem, pela radiosensibilização das células tumorais após a inibição da atividade dessa enzima (Choy e Milas, 2003; Nakata et al., 2003). Um estudo realizado na última década, sugere que a expressão de COX-2 está correlacionada com a reduzida sobrevivência dos pacientes após a radioterapia (Gaffney et al., 2001). Estas observações sugerem a possibilidade de que a COX-2 pode proteger as células tumorais de danos através da geração de prostaglandinas como fatores de sobrevivência ao tumor.

Nos gliomas, os mecanismos de resistência celular a quimioterapia incluem a expressão de diversas proteínas com função de transportadoras na membrana plasmática como as p-glicoproteínas, as proteínas de resistência múltipla a drogas (MRP), proteína major-vault (MVP) e a proteína ABCG2 também conhecida como proteína de resistência ao câncer de mama, proteínas anti-apoptóticas no citoplasma, como a Bcl-2 (Lu e Chervington, 2008) e o aumento da expressão da enzima COX-2, que também pode estar ligada a estes mecanismos de resistência à quimioterapia como é sugerido em alguns estudos envolvendo câncer de próstata (Dandekar et al., 2004), colon (Saikawa et al., 2004) e células de carcinoma laringeal (Huang et al., 2008).

1.2 Ciclooxygenases

Embora reconhecida por seus clássicos sinais clínicos de dor aguda sensação de calor, vermelhidão, inchaço, e cura eventual do tecido com a formação de cicatrizes, a inflamação pode ser mais bem compreendida como uma cascata inflamatória. É constituída por uma longa cadeia de reações e atividades celulares que servem para reparar um tecido, em muitas circunstâncias de vida, desde um corte pequeno na pele à reparação do tecido após lesões mais graves como queimaduras. A cascata inflamatória ao nível do tecido celular envolve uma sequência de eventos como a dilatação das arteríolas e vénulas, bem como aumento da permeabilidade vascular arterial e do fluxo sanguíneo, em muitos casos, seguido por estas etapas podemos verificar também trombose, infiltração de leucócitos dos tecidos para o plasma e do

plasma para o tecido, degradação do tecido pela atividade proteolítica e formação de espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, presença de células fagocíticas, geração de novos fatores de crescimento celulares e de regeneração originando um novo tecido funcional.

A inflamação é fundamentalmente um mecanismo de defesa cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular e das consequências de tal lesão (p. ex., células e tecidos necróticos) sem a inflamação, as infecções se desenvolveriam descontroladamente, as feridas nunca cicatrizariam e o processo destrutivo nos órgãos seria permanente. Entretanto, a inflamação e o reparo podem ser extremantes prejudiciais, pois estão envolvidos no desenvolvimento de doenças crônicas incluindo a artrite reumatoide (Scott, 2011), diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer, entre eles os gliomas (Coussens e Werb, 2002).

A infiltração de células do sistema imune liberam citocinas no ambiente tumoral e como estas células fazem parte do mecanismo de defesa do organismo, seria esperado que ao serem recrutadas, elas erradicassem o tumor. Desta forma, a infiltração de leucócitos no tecido neoplásico poderia ser vista como uma resposta antitumoral, mas ao contrário disso, o infiltrado de macrófagos ativados e linfócitos provenientes da microcirculação são a maior fonte de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e fatores angiogênicos contribuindo com o desenvolvimento das células tumorais (Schottenfeld e Dimmer, 2006).

Embora as características clínicas da inflamação tenham sido descritas em papiros egípcios (datados aproximadamente 3.000 anos a.C.), apenas no séc. I d.C. é que os sinais cardinais da infamação (rubor, tumor, calor e dor) foram documentados e em 1863 foi correlacionada ao câncer. Apesar destas descobertas, apenas o avanço da biologia molecular nos permite compreender melhor os mecanismos de início e desenvolvimento dos processos inflamatórios, mas ainda assim a sua correlação com as neoplasias não é totalmente clara.

Estudos indicam que estes mecanismos podem incluir a ação da enzima Ciclooxigenase (COX), responsável pelos passos determinantes do metabolismo de ácido aradônico na produção dos prostanóides envolvidos nos processos inflamatórios (Ellis et al., 1989).

A ciclooxigenase possui duas isoformas semelhantes em estrutura e peso molecular denominadas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2). A primeira é considerada constitutiva, pois é expressa na maioria dos tecidos constantemente e é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal deles, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas. A segunda é considerada induzida, uma vez que o aumento da sua expressão está relacionado geralmente a estímulos por endotoxinas como LPS (produzidos por bactérias), citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos e linfócitos, lesões celulares sejam elas químicas ou físicas (Batlouni, 2010). Interessantemente, o aumento da expressão de COX-2 também pode ser estimulado estresse psicológico (Garcia-Bueno e Leza, 2008).

Antes acreditava-se que a COX-2 estava presente apenas nos processos inflamatórios, mas hoje outras funções também lhe são atribuídas, por exemplo, sua participação na homeostase do epitélio vascular através da síntese de prostaglandinas envolvidas na proteção deste epitélio contra danos causados pela tensão de cisalhamento (Batlouni, 2010).

Sua inibição por Anti-inflamatórios não esteroidais tem recebido mais atenção na prática clínica, principalmente devido aos seus efeitos colaterais já que a inibição seletiva desta enzima em pacientes com histórico para doenças cardiovasculares pode aumentar o risco de trombose e de eventos vasculares. Estes efeitos parecem estar relacionados à inibição da prostaciclina (PGI), que é o principal prostanóide secretado pelas células endoteliais. A PGI é sintetizada pela enzima COX-2 e promove relaxamento nas células musculares lisas, atua como potente vasodilatador e também exerce atividade antiplaquetária ligando-se nos receptores IP das plaquetas (Antman et al., 2007).

Nas células tumorais essa enzima demonstra efeitos “benéficos” ao desenvolvimento destas células, alguns estudos demonstram a sua influencia nos processos de tumorigênese das células da mama, por exemplo, que depois de transformadas tem a expressão de COX-2 mais elevada que o controle (células não transformadas) (Subbaramaiah et al., 1996). Nos gliomas sua influencia não é diferente,

e estudos sugerem que essa enzima pode estar relacionada ao grau de agressividade do tumor, isto é, quanto mais elevado o seu grau, maior a expressão de ciclooxigenase 2 (Myung et al., 2010).

A expressão de Cox-2 é associada a muitos aspectos da tumorigenese tais como transformação, crescimento celular e apoptose, angiogênese, invasão e metástase, modulação da resposta imune, e resistência a quimio e radioterapias.

1.3 Prostaglandina E₂

Os eicosanóides são mediadores lipídicos biologicamente ativos gerados, em resposta a diferentes estímulos como trauma mecânico, citocinas e fatores de crescimento. São formados a partir da remodelação do ácido araquidônico, que é normalmente encontrado na forma esterificada em fosfolípidos de membrana celular, seguindo uma sequência de eventos que tem início com a ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2).

A regulação da ativação da PLA2 envolve processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas quinase, como proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), que facilitam a translocação desta enzima do citosol para a região perinuclear do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e do envelope nuclear (Chakraborti, 2003; Glover et al., 1995; Hirabayashi et al., 1999; Schievella et al., 1995; Simmons et al., 2004). As enzimas ciclooxigenases estão localizadas constitutivamente ou são expressas sob estimulação celular na região perinuclear. A compartimentalização celular destas enzimas facilita a eficiência da metabolização do ácido araquidônico (Hirabayashi e Shimizu, 2000).

A ciclooxigenase, também denominada como sintetase da prostaglandina H₂ (PGHS), é uma enzima bifuncional que catalisa tanto a dupla-oxigenação do ácido araquidônico para formar prostaglandina G₂ (PGG₂), quanto a subsequente redução peroxidativa da PGG₂ para formar PGH₂, ambos compostos altamente instáveis (Smith e DeWitt, 1996; Smith e Marnett, 1991).

A PGH₂ formada é o substrato para outras enzimas prostaglandina sintases ou isomerases, que são as responsáveis pela produção de cinco principais prostanóides

bioativos gerados: PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ e TXA₂. Essas etapas de síntese podem ser visualizadas na figura (1).

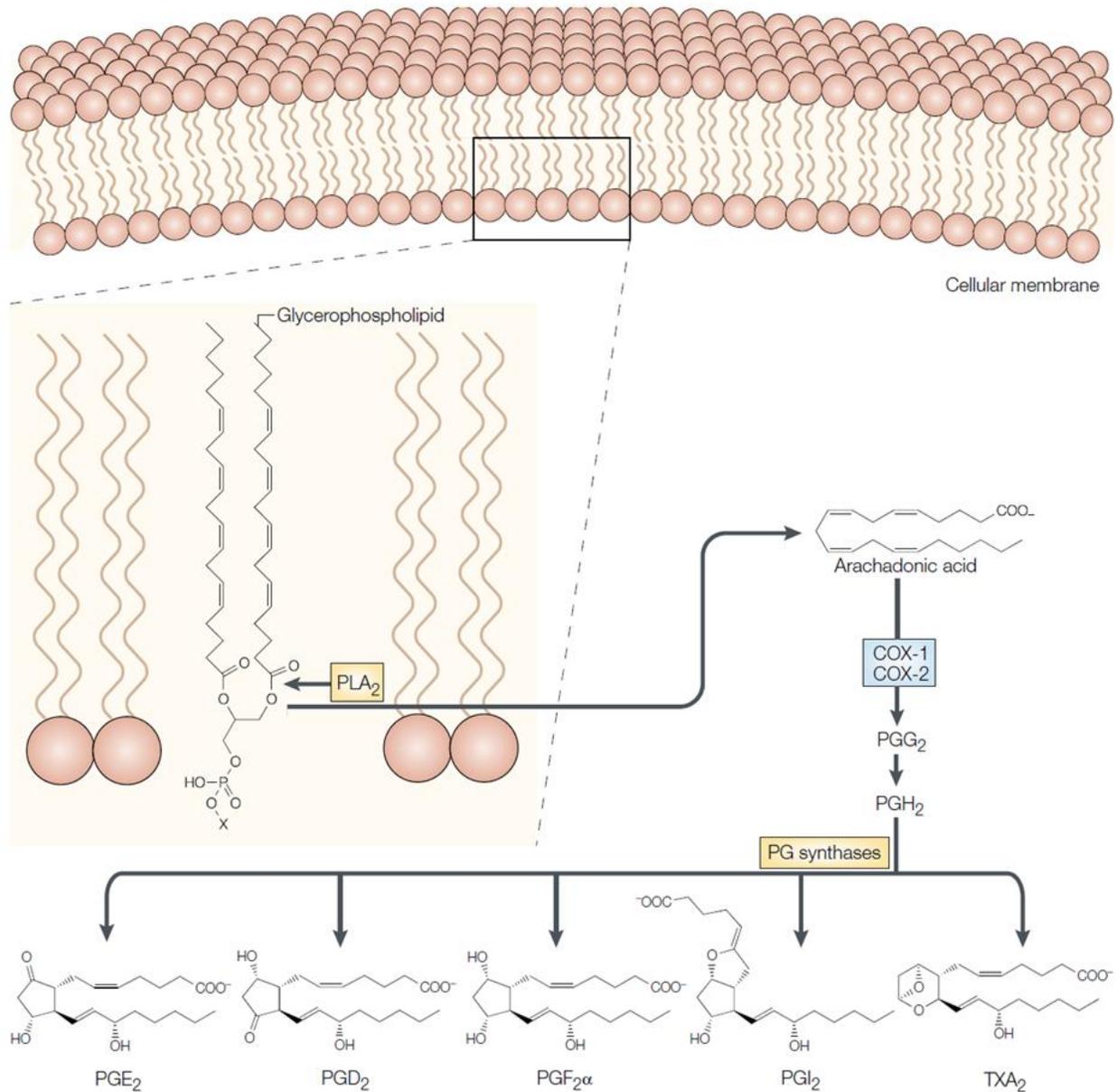
As enzimas sintases são expressas com alguma seletividade tecidual e geram diferentes prostaglandinas dependendo do tipo de célula (FitzGerald, 2003; Hata e Breyer, 2004). Por exemplo, na presença de PGE sintetase é gerada a PGE₂, enquanto outras sintases específicas dão origem aos diferentes grupos de prostanóides.

Os eicosanóides são sintetizados localmente, tem meia vida curta e exercem seus efeitos também localmente (Campbell e Halushka, 1996). Ao contrário de hormônios glicocorticóides, que apresentam efeitos sistêmicos mesmo sendo liberados em apenas um local do corpo, os prostanóides são sintetizados em uma série de tecidos e atuam como mediadores autócrinos ligando-se nos receptores da própria célula ou parácrinos ligando-se nos receptores das células vizinhas para sinalizar mudanças imediatas de função celular (Dubois et al., 1998; Hata e Breyer, 2004).

Possuem papel fisiológico relevante em vários sistemas como o nervoso, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinário, endócrino, respiratório e imune.

Os receptores EPs estão localizados na superfície celular, pertencem à família dos receptores acoplados à família da proteína G e são divididos em quatro subtipos (EP-1 a EP-4). Cada subtipo possui características fisiológicas distintas e importantes, assim como efeitos igualmente importantes para o desenvolvimento das células tumorais.

Os mecanismos pelos quais esses receptores atuam são diferentes. O receptor EP1, quando estimulado, ativa a proteína G_q, mediando os níveis intracelulares de Ca²⁺. Os receptores EP2 e EP4 ativam a subunidade alfa da proteína G do tipo estimulatória (G_s), com conseqüente estimulação da produção de AMPc pela adenil ciclase. Já o receptor EP3 atua inibindo a enzima adenil ciclase via estimulação da proteína G do tipo inibitória (G_i) (Chell et al., 2006).

Figura 1 - Biosíntese de eicosanoides

Fonte: Gupta e Dubois, 2011

O mRNA do receptor EP1 é fisiologicamente expresso em níveis elevados nos rins, mucosa gástrica e adrenal em camundongos (Guan et al., 1998; Watabe et al., 1993) e está envolvido na motilidade do TGI em ratos. Nas células tumorais do câncer de cólon, o receptor EP1 aumenta o estímulo ao crescimento e invasão dessas células (Kamei et al., 2009).

O receptor EP2 é expresso em altos níveis no útero, pulmões e baço e em baixos níveis nos rins. Dentre as suas funções fisiológicas, estudos sugerem que o receptor EP2 está importantemente envolvido na implantação uterina dos ovócitos fecundados em ratos, já nos tumores parece estar ligado a processos de proliferação e diminuição de apoptose quando ativado por PGE₂ em câncer de pele (Sung et al., 2005), essa interação PGE₂-EP2 pode estar envolvido também nos mecanismos de angiogênese e carcinogênese em câncer de mama (Fujino et al., 2002).

Os receptores EP3 estão localizados em diversos tecidos incluindo epitélio e músculo longitudinal (intestino) e a interação PGE₂-EP3 possui envolvimento nas funções de secreção de bicarbonato duodenal e manutenção da integridade da mucosa gástrica demonstrado em um estudo realizado com camundongos “Konockout” para esse receptor (Takeuchi et al., 1999).

Em células tumorais de sarcoma, o envolvimento de PGE₂-EP3 parece influenciar positivamente os mecanismos de proliferação e angiogênese (Amano et al., 2003).

Fisiologicamente o receptor EP4 é expresso no rim, mais especificamente no glomérulo e ligado a PGE₂, demonstra envolvimento no mecanismo de filtração glomerular (Narumya et al., 2007), na pele facilita a mobilização, migração e maturação das células de langerhans (Kenji et al., 2003) e nos ossos induz a formação óssea (Yoshida et al., 2001).

Em câncer de mama, a via PGE₂-EP4 sugere ter efeito metastático e com a adição de antagonistas para este receptor, o efeito sugerido é inibido (Kundo et al., 2008).

1.4 Prostaglandina E Sintases Terminais

A enzima Prostaglandina E sintase é uma enzima envolvida na síntese de PGE₂ e está presente nas células em duas formas de proteínas: PGES ligada a membrana (mPGES) e PGES citosólica (cPGES). As duas enzimas apresentam rotas diferentes para a produção de PGE₂, relacionadas a atividade das duas isoformas da COX, isto é,

uma rota constitutiva, relacionada a COX-1 (COX-1/cPGES) (Murakami et al., 2002) e uma rota induzível principalmente por estímulos inflamatórios, relacionada a atividade da COX-2 (COX-2/mPGES-1) (Mattila et al., 2009).

Embora essa enzima seja expressa fisiologicamente no cérebro e pulmão de ratos, mas não no coração, fígado ou cólon, mas após a exposição a lipopolissacarídeos (LPS), os tecidos que não expressavam mPGES-1 começaram a expressar, já em órgãos humanos normais, como coração ou fígado, a expressão proteica desta enzima não foi detectada, porém esse dado muda após infarto ou hepatite dos órgãos (Murakami et al., 2003).

Células transfetadas com as enzimas COX-2/mPGES-1 apresentam mudanças na expressão gênica para diversas funções que podem contribuir para a tumorigênese (Kamei et al., 2003).

A enzima mPGES-1 liga se preferencialmente a COX-2 para promover a biossíntese de PGE₂ que induz o crescimento celular aberrante. (Murakami, 2000).

Células tumorais da linhagem A549 e HeLa apresentam maior expressão da enzima mPGES-1 quando comparadas a tecidos que expressam essa enzima, mas que estão em homeostase como placenta, próstata, testículos, glândula mamária e bexiga (Murakami et al., 2003).

Esses dados sugerem que mPGES-1 é constitutivamente expressa em vários tecidos, assim como indutível e que sua elevada expressão pode estar relacionada a mecanismos utilizados pelas células tumorais, que de acordo com a sua função estaria aumentando a síntese de PGE₂, portanto os processos inflamatórios podem favorecer o surgimento de novas células tumorais ou contribuir com o desenvolvimento daquelas já instaladas no tecido normal.

Experimentos com camundongos Knockout para mPGES-1 indicam que o organismo pode desenvolver e manter a saúde apesar da falta dessa enzima, fato que talvez possa ser explicado por haver rotas constitutivas que continuam a biossíntese de PGE₂, na qual fazem parte outras PGESs (Murakami et al., 2003). Por exemplo, mPGES-2 cuja via de síntese para PGE₂ consiste no seu acoplamento tanto com COX-1 quanto com COX-2 (Mattila et al., 2009).

A enzima mPGES-2 parece estar envolvida na produção de quantidades de PGE2 cruciais para manter a homeostase do tecido e sua expressão não é sensivelmente alterada comparada a mPGES-1 durante episódios de inflamação ou danos teciduais, no entanto há aumento considerável na expressão de mPGES-2 em células de câncer colo retal humano, no qual mPGES-1 também encontra-se elevada (Murakami, 2003).

Em carcinoma de células transicionais (CTT), a expressão de mPGES-2 permanece inalterada em relação ao controle (Shi et al., 2006).

A cPGES, localizada no citoplasma célula e é expressa constitutivamente nos tecidos de diversos órgãos como coração, timo, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino e testículos de rato mesmo após tratamento com LPS. Curiosamente, análises em tecidos extraídos do cérebro de rato, apresentam aumento de cPGEs quando tratados com LPS (Tanioka et al., 2000). Porém outro estudo demonstra que a expressão de cPGES não se altera em quadros de hemorragia cerebral, assim como COX-1 e mPGES-2 e diferentemente de mPGES-1 e COX-2 (Wu et al., 2011). Em algumas linhagens tumorais, como HeLa (Câncer de Colo Humano), GOTO (Neuroblastoma Humano), MKN45 (Câncer Gástrico Humano) e U251 (Glioblastoma Humano), a expressão de cPGES não tem alterações significativas após o tratamento com citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Tanioka et al., 2000).

Isso sugere a possibilidade de haver indução de cPGES em condições específicas, porém suas funções nestes processos ainda permanecem misteriosas.

2 OBJETIVOS GERAIS

Esse projeto teve como objetivo analisar o efeito da Prostaglandina E2 na proliferação e apoptose na linhagem de glioma humano T98G:

1. determinar a expressão dos receptores de PGE2 (EP1, EP2, EP3 e EP4) e das enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES;
2. determinar os efeitos da adição de PGE1 e PGE2 sobre a proliferação e apoptose nas células T98G;
3. determinar os efeitos da adição de agonistas e antagonistas dos receptores EPs sobre a proliferação e apoptose das células T98G;
4. determinar os efeitos da adição de inibidores específicos para COX-1 e COX-2 sobre a proliferação e apoptose das células.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Células

As células da linhagem celular T98G de glioma humano foram obtidas a partir do ATCC, mantidas congeladas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) em Nitrogênio Líquido (N₂). Depois de descongeladas, foram cultivadas em frascos plásticos descartáveis contendo DMEM com 10% de SFB, antibióticos (penicilina - 50 U/ml / estreptomicina -50 mg/ml) e deixadas em estufa à 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular e ao atingir 80-90% da sua densidade de saturação, as células foram sub-cultivadas.

3.2 Curvas Dose-Resposta

Para determinar os efeitos da adição dos prostanóides PGE₁ e PGE₂, dos inibidores específicos para COX-1 (SC-560) e para COX-2 (NS-398), dos agonistas para EP2 (Butaprost) e EP4 (CAY 10580) e dos antagonistas EP2 (AH6809) e EP4 (L-161.982) as células foram cultivadas em placas de com 24 poços. Cada um contendo 5 x 10⁴ cél. e 1 ml de DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 horas para que elas pudessem se adaptar ao novo ambiente e o estresse não influenciasse o resultado do experimento. Após esse período, as células foram tratadas com PGE₁ (0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM), PGE₂ (0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM e 10 µM) por 24, 48 e 72 horas, SC-560 (50 µM, 100 µM e 150 µM), NS-398 (50 µM, 100 µM e 150 µM), Butaprost (0,1 µM, 1 µM e 10 µM), AH 6809 (0,1 µM, 1 µM e 10 µM), CAY 10580 (0,1 µM, 1 µM e 10 µM) ou L-161.982 (0,1 µM, 1 µM e 10 µM) por 24 e 48 horas. Depois de cada período de tratamento essas células foram tripsinizadas (tripsina 0.025% / EDTA 0.025%) coletadas e, por fim, contadas com o auxílio de uma câmara Neubauer.

3.3 Análises de expressão gênica através de PCR Semiquantitativa

Todos os primers utilizados foram desenhados com base em sequencias disponíveis no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxílio do programa Primer 3 (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primr/primer3_www.cgi). A especificidade de cada primer foi verificada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen. Abaixo estão as sequências dos primers utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência dos Oligonucleotídeos utilizados.

Gene	Sequencia (5'-3')	T°C	Ciclo	Tamanho
COX-1	R: GAGTTTGTCAATGCCACCT F: GCAACTGCTTCTTCCCTTTG	63	38	215 bp
COX-2	R: TGAAACCCACTCCAAACACA F: GAGAAGGCTTCCCAGCTTTT	60	38	187 bp
mPGES-1	R: AAGTGAGGCTGCGGAAGAAG F: TTAGGACCCAGAAAGGAGTAGAC	60,8	38	178 bp
mPGES-2	R: GCAAGGAGGTGACCGAGTTC F: CACTGCCGCCACTTCATCTC	60,8	40	115 bp
cPGES	R: AATAATTGGAAAGACTGGGAAG F: CTTGTGAATCATCATCTGCTC	50	38	139 bp
EP-1	R: GATGTACACCCAAGGGTCCAG F: TTGTCGGTATCATGGTGGTG	--	--	121 bp
EP2	R: GCAGTCTCCCTGCTCTTCTGC F: GCACCGAGACAATGAGAAGCA	59	40	110 bp
EP-3	R: CACACACGGAGAAGCAGAAA F: AAGCTGGGACTCGTCTTTGA	--	--	332 bp
EP-4	R: AAGCTGGGACTCGTCTTTGA F: GCTTTCACCTTGTCCCTGCTC	59	40	171 bp
GAPDH	R: GAGTCAACGGATTTGGTCGT F: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	52	38	306 bp

Fonte: Cunha (2012)

3.3.1 Extração de RNA total

Essa metodologia consiste em lisar a membrana das células com a solução tiocianato-fenól-clorofórmio guanidina (Trizol) e clorofórmio. Após a exposição do conteúdo celular, o RNA total torna-se visível na presença de isopropanol.

Para a extração do RNA, as células foram cultivadas em frascos de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de SFB.

Passado o tempo de cultivo, as células foram tripsinizadas (tripsina 0.025% / EDTA 0.025%) coletadas e a metodologia foi realizada de acordo com o protocolo a seguir:

As células foram homogeneizadas em 1 ml de trizol, com o auxílio do aparelho Politron; mantidas em temperatura ambiente por 5min, em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 10600 rpm por 15 min a 4 °C, em seguida o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 500 µL de isopropanol gelado em seguida, foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por 10 minutos e as amostras centrifugadas a 10600 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi desprezado adicionou-se 1 ml de etanol 75%, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7500 rpm por 5 min a 4 °C; o sobrenadante foi desprezado e o procedimento anterior foi repetido com o tempo de centrifugação alterado para 10 min; para o pellet secar, o microtubo foi deixado invertido; por fim o pellet formado foi ressuspenso em 50 µL de água DEPC (Dimetilpirocarbonato) inativa.

3.3.2 Quantificação da concentração e determinação da razão A260/280

A concentração, após a quantificação no espectrofotômetro, foi determinada pela razão $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. O resultado dessa divisão serviu como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do ácido nucléico com proteínas e os resultados considerados satisfatórios foram aqueles entre 1,8 e 2,0. A integridade das amostras foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O RNA purificado foi armazenado a -80 °C.

3.3.3 Preparo do DNA Complementar (cDNA)

A primeira vertente de DNA complementar (cDNA) foi gerada a partir de 1 µg do RNA extraído após a quantificação, adicionando-se a ele 1 µL de inibidor de RNase, 2 µL de Random Primer, 2 µL da mistura desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP mix), 2 µL de Dithiothreitol (DTT), 4 µL de RTbuffer e 2 µL moloney murine leukemia virus (M-MLV), em um volume total de 20 µL. A reação foi incubada a 21 °C por 10 minutos, a 42 °C por 50 minutos e de 99 °C por 10 minutos, resfriando a 4 °C em termociclador Mastercycler® gradient 5333 (Eppendorf, Germany). O produto foi conservado a -20 °C até o uso.

A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel 1% de agarose contendo brometo de etídio sendo o produto visualizado com um sistema de captura UV.

3.3.4 RT - PCR (Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região do ácido nucléico com a utilização de “primers” ou iniciadores.

A amplificação de uma amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), íons de magnésio (MgCl₂) e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA.

A PCR foi realizada de forma semiquantitativa no estudo da amplificação dos genes referentes às enzimas COX-1, COX-2, mPGES-1, mPGES-2 e cPGES, e aos receptores EP-1, EP2, EP-3 e EP-4. Foi utilizado também um gene de controle, conhecido por não modifica sua expressão nas condições do experimento, a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), que produz um fragmento de 306 pares de bases (pb).

O volume total da reação foi de 50 µL e compreendeu os seguintes reagentes:

1 µL de dNTP, 1,5 µL de MgCl₂, 5 µL de PCR buffer, 34,5 µL de água milli-Q autoclavada, 0,5 µL da enzima Platinum Taq DNA polimerase, 6 µL dos oligonucleotídeos (sense e anti-sense) e 1,5 µL do cDNA sintetizado.

Para assegurar a fase exponencial de amplificação, o número de ciclos de PCR e temperaturas de anelamento foram determinados e otimizado para cada primer de acordo com suas características específicas. O método de PCR foi padronizado em três eventos distintos: Primeiro ocorre a desnaturação, quando a amostra é exposta à temperatura de 94 °C por 1 minuto. Em seguida o anelamento quando a amostra é exposta à temperatura específica do oligonucleotídeo por 1 minuto e por fim a extensão quando a amostra é exposta à temperatura de 72 °C por 1 minuto.

Alíquotas dos produtos da PCR amplificados foram fracionadas em um gel de agarose 1% contendo EtBr (brometo de etídio) 0,05%. As amplificações foram visualizadas em um sistema de captura UV. A análise semiquantitativa do produto foi feita usando o sistema de imagem Sigma Scan Pro.

3.4 Western Blot

O ensaio de Western blot envolve a transferência das proteínas separadas por eletroforese para um suporte sólido (membranas de nitrocelulose), possibilitando a identificação de uma proteína de interesse através de reconhecimento por um anticorpo, correlacionando a proteína identificada com sua massa molecular.

Para a extração de proteínas, as células foram lisadas com tampão lise (0,21g/ 100 mL de Tris base, 0,584g/ 100 mL de EDTA e 1% de triton 1 mL/ 100 mL com pH = 7,6), inibidor de protease e inibidor de fosfatase por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante, transferido para um novo tubo que, posteriormente, foi armazenado em freezer a -80 °C. A concentração proteica foi determinada através do método de Lowry. Após a quantificação, os extratos proteicos foram diluídos em tampão de amostra (1,51g de Tris-HCl pH = 6,8, 40mL de SDS 10%, 10mL de mercaptoetanol, 20 mL de glicerol e 0,004 g de azul de bromofenol) incubados a 100 °C por 3 minutos.

Para o processo de separação, foi feito um gel de SDS-PAGE com 7,5% de acrilamida, acompanhado de um segundo gel com 4% de acrilamida. Em cada poço foram colocados 40 µg de extrato proteico total (diluído em tampão de amostra) e 3 µL de marcador de peso nuclear em cada gel. A corrida foi feita a 70 V/ 30 minutos durante o primeiro gel 4% e a 100 V/ 1 hora durante o segundo gel 7,5% (gel de separação).

Em seguida foram realizadas as transfêrencias das proteínas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o tampão de transferência (57,6 g de glicina, 12 g de Tris-base e 4 g de SDS pH = 8,3) à +/- 4 °C/ 200 mA/ 2:00 horas. Terminada a transferência das proteínas, as membranas foram lavadas 1x com TBS 1x (5 minutos) e 3x com TBS tween 0,1% (5 minutos) para retirada do metanol. A fim de bloquear as possíveis ligações não específicas, as membranas foram incubadas em solução de PBS 1x + Albumina 1% por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Passado esse tempo, a membrana foi incubada com anticorpo primário na diluição 1:200 *overnight* em agitação.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS (1x) por 10 minutos e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 minutos. Após as 3 lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente na diluição 1:1000 por 2 horas. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com TBS (1x) por 10 minutos e com TBS Tween 0,1% (3x) por 10 minutos.

As revelações foram feitas através da detecção fluorescente no aparelho Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imagem.

3.5 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo, FACS-PI

As células foram coletadas através de tripsinização após o tratamento com PGE₁ (10 µM), PGE₂ (10 µM), SC-560 (50 µM), NS-398 (50 µM), Butaprost (10 µM), AH 6809 (10 µM), CAY 10580 (10 µM) ou L-161.982 (10 µM) por 48 horas, lavadas em PBS e fixadas em Álcool Etílico 70% *overnight*. Após a fixação, as preparações foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS e incubadas em solução preparada com 20 µg/mL de Iodeto de Propídeo (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), 20 µg/mL de Rnase (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) e 0,1% de Triton-X

(Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram novamente centrifugadas, lavadas e mantidas em PBS a 4 °C até a análise por citometria de fluxo. Foram adquiridos 10000 eventos em filtro FL2 com (585/642 nm) e analisados através do software Cell Quest - FACScalibur (Becton Dickison) – Depto. de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP. Em todas as análises foram descontados debris celulares.

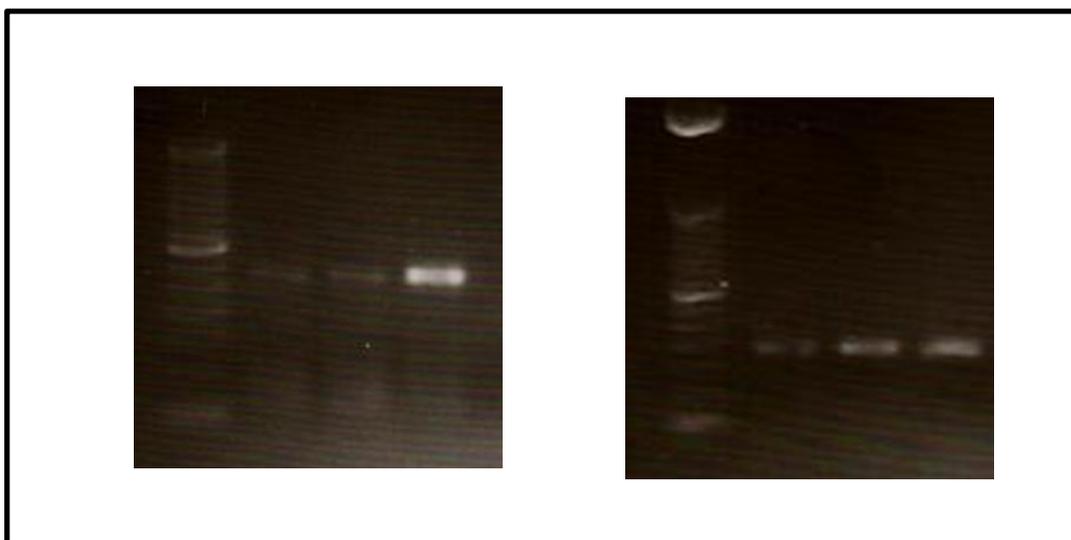
3.6 Análise dos dados

Todos os dados obtidos estão apresentados como média +/- erro padrão (SE). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa Graph Pad Instat, usando o teste-t para comparação das amostras. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PCR

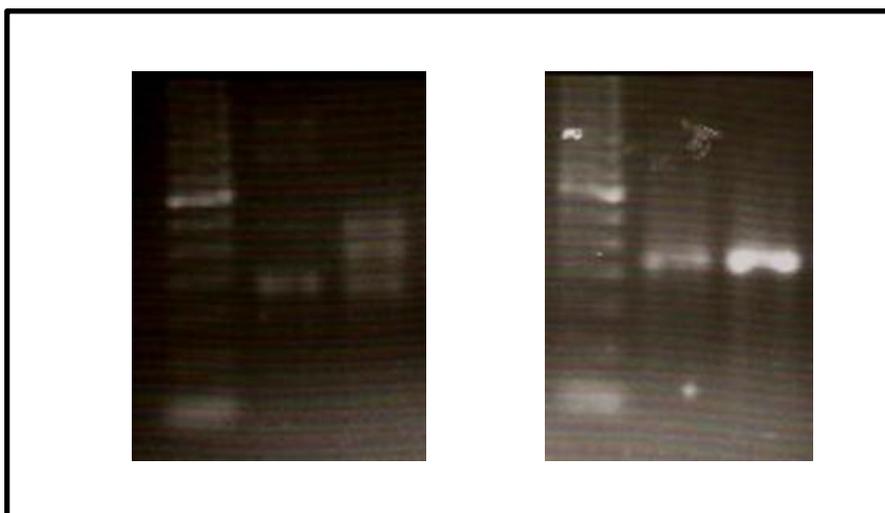
Figura 2 – Expressão de mRNA para COX-1 e COX-2 nas células T98G e HT-29.



A Figura A mostra a expressão de mRNA para COX-1, a Figura B para COX-2 em T98G e COX-1 (Figura A*) e COX-2 (Figura B*) em HT-29. Os tamanhos dos produtos de PCR foram 215 bp (COX-1) e 187 bp (COX-2).

Fonte: Cunha (2012)

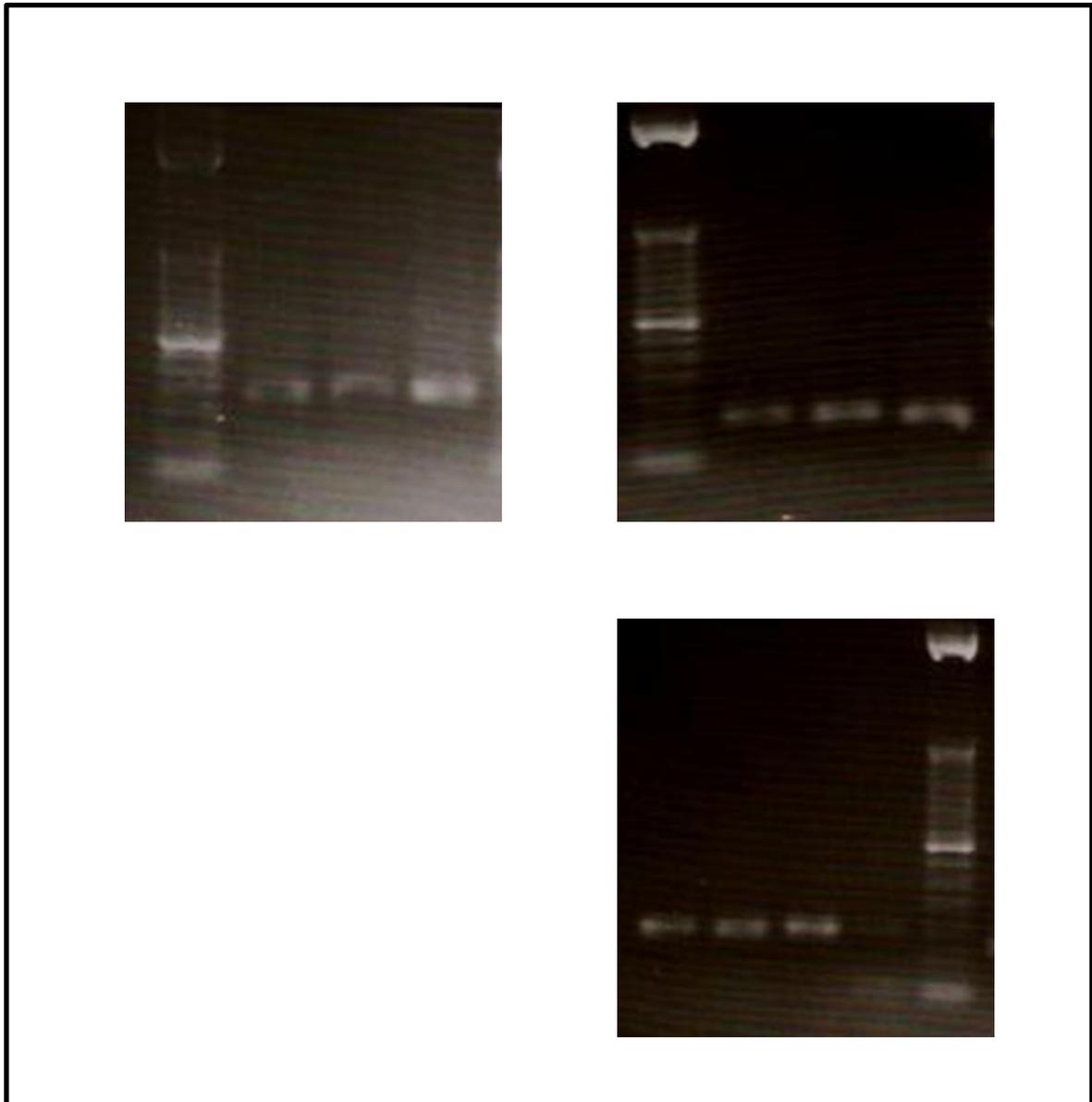
Figura 3 – Expressão de mRNA para EP-2 e EP-4 nas células T98G e HT-29.



A Figura A mostra a expressão de mRNA para EP-2, a figura B para EP-4 na linhagem T98G e EP-2 (Figura A*) e EP-4 (Figura B*) na linhagem HT-29. Os tamanhos dos produtos de PCR foram 110 bp (EP-2), 171 bp (EP-4).

Fonte: Cunha (2012)

Figura 4 – Expressão de mRNA para mPGES-1, mPGES-2 e cPGES nas células T98G e HT-29.

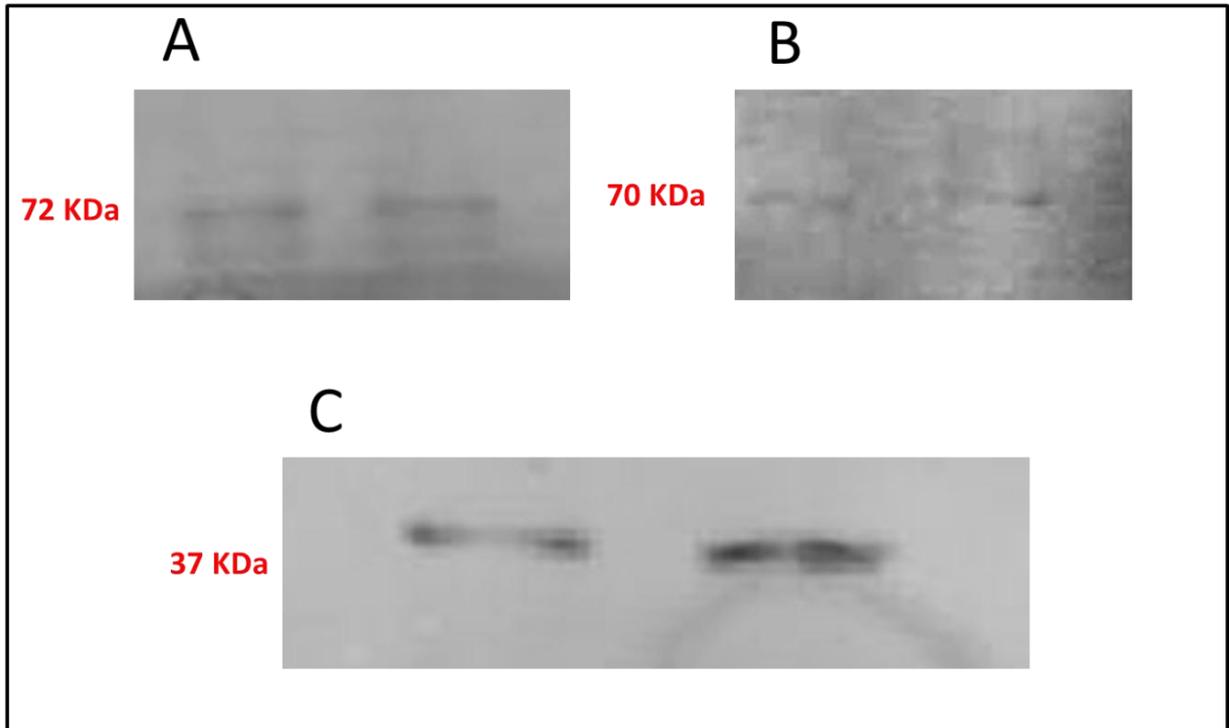


A Figura A mostra a expressão de mRNA para mPGES-1, a Figura B para mPGES-2 e a Figura C para cPGES em T98G e mPGES-1 (Figura A*), mPGES-2 (Figura B*) e cPGES (Figura C*) na linhagem HT-29.

Fonte: Cunha (2012)

4.2 Western Blot

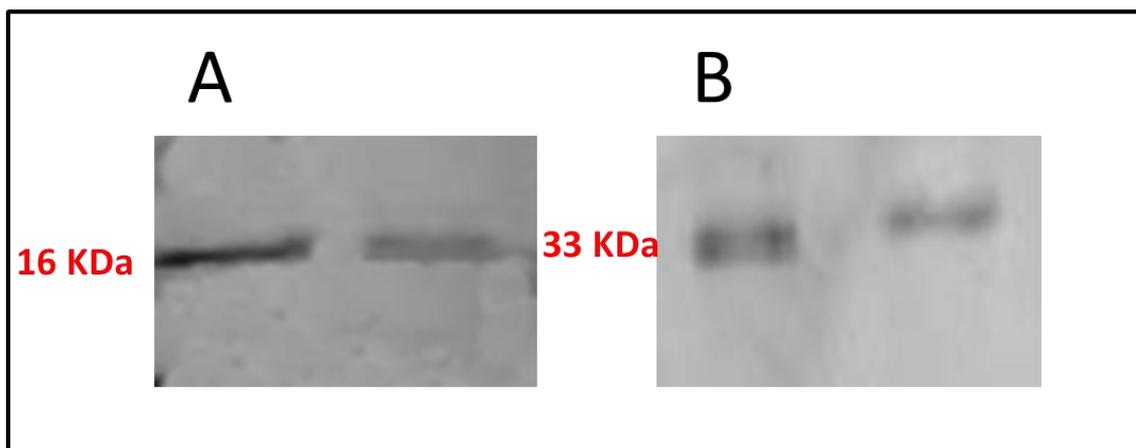
Figura 5 – Expressão de proteínas para COX-1, COX-2 e GAPDH nas células T98G.



A Figura A mostra a expressão de proteínas para COX-1, a Figura B para COX-2 e a Figura C para GAPDH nas células T98G. Os tamanhos dos produtos de Western foram 72 KDa (COX-1), 70KDa (COX-2) e 37 KDa (GAPDH).

Fonte: Cunha (2012)

Figura 6 – Expressão de proteínas para mPGES-1 e mPGES-2 nas células T98G.

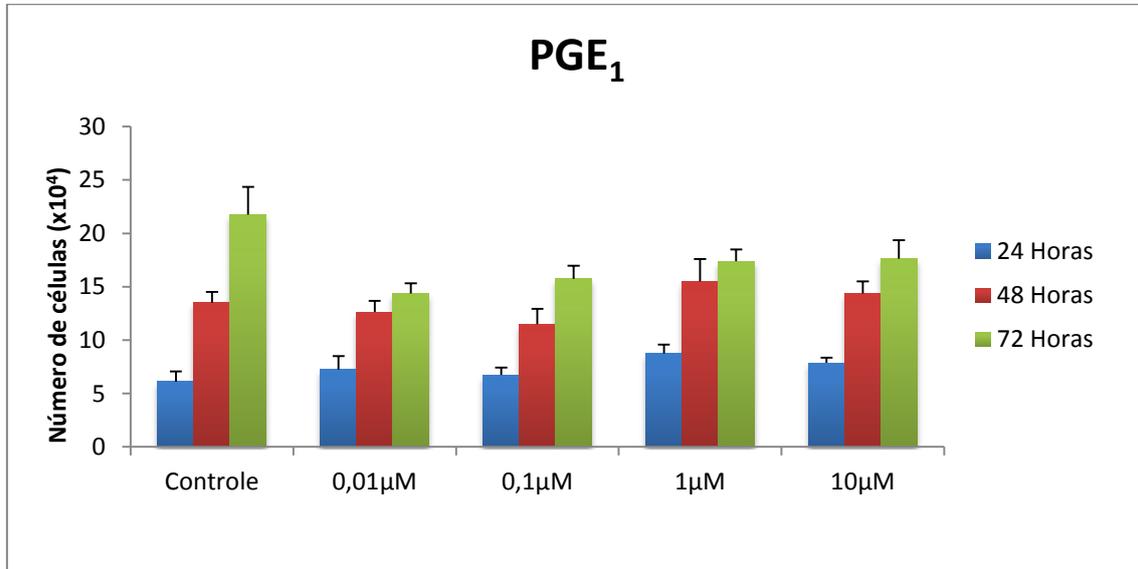


A Figura A mostra a expressão de proteínas para mPGES-1 e a Figura B de mPGES-2. Os tamanhos dos produtos de Western foram 16 KDa (mPGES-1), 33KDa (mPGES-2).

Fonte: Cunha (2012)

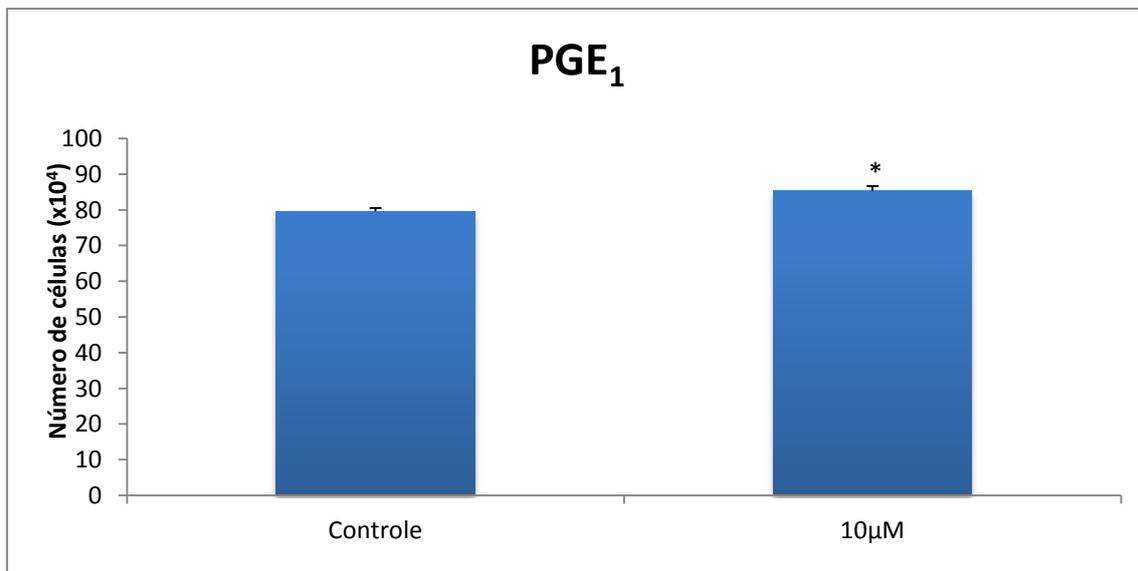
4.3 Curva de concentração e análise da proliferação

Figura 7 – Curva dose-resposta de Prostaglandina E₁ no ensaio de contagem do número total de células.



Fonte: Cunha 2012

Figura 8 – Efeito de Prostaglandina E₁ no ensaio de contagem do número total de células.

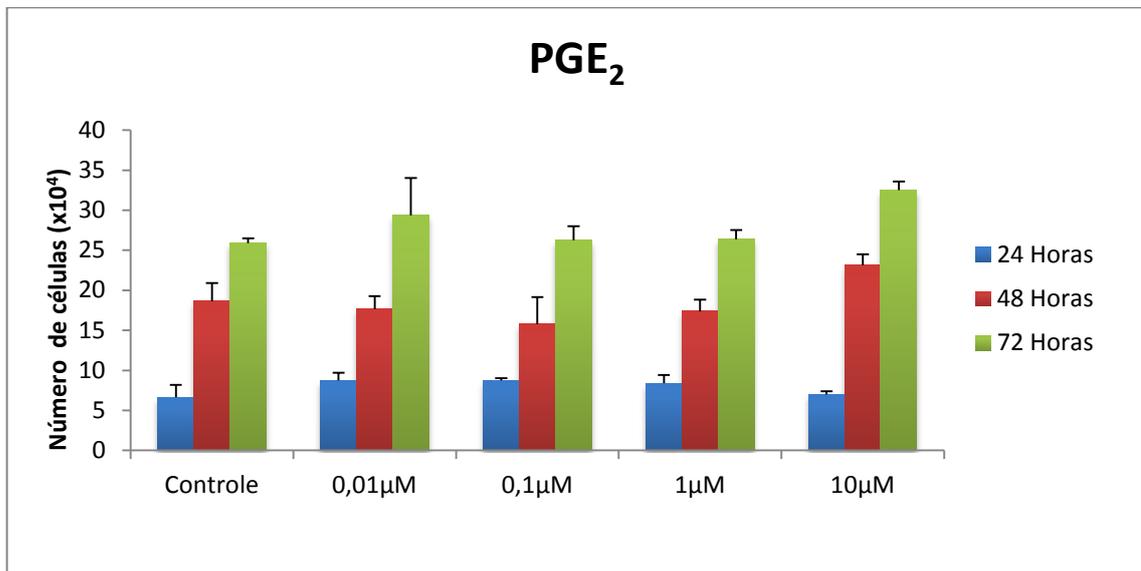


A figura mostra o número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle após 72 horas na concentração de 10 µM. n=4 * p=0.0111.

Fonte: Cunha 2012

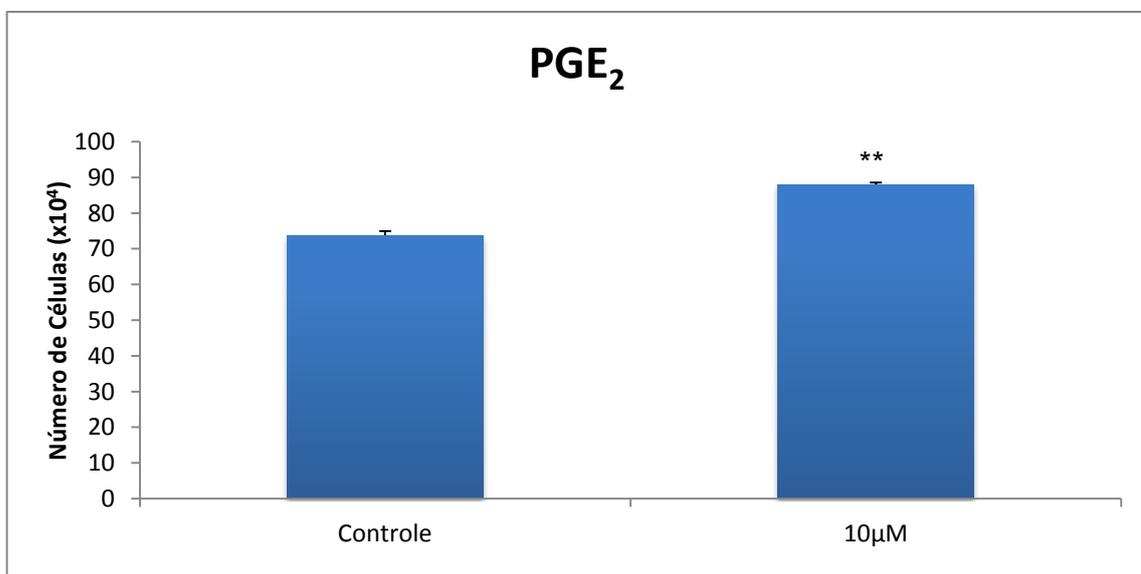
Resultados

Figura 9 – Curva dose-resposta de Prostaglandina E₂ no ensaio de contagem do número total de células.



Fonte: Fonte: Cunha (2012)

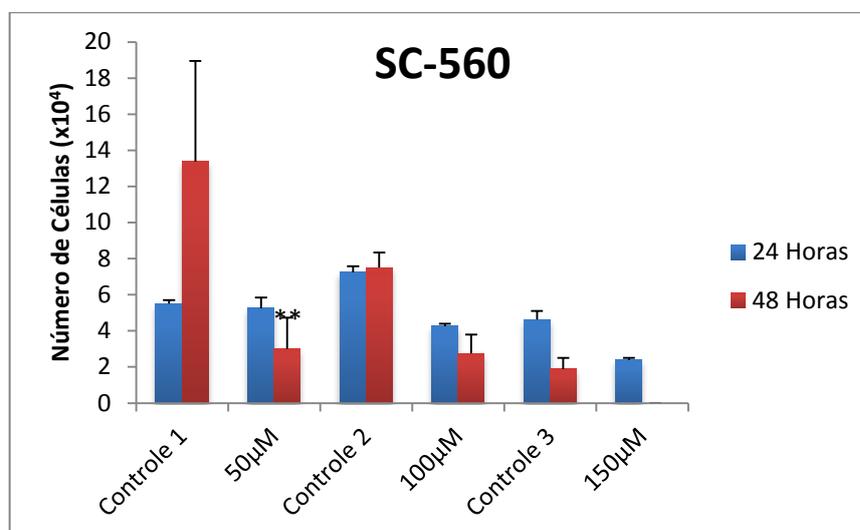
Figura 10 – Efeito de Prostaglandina E₂ no ensaio de contagem do número total de células.



A figura mostra no ensaio de contagem do número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle após 72 horas na concentração de 10 µM. n=4 **p>0.0001
Fonte: Cunha (2012)

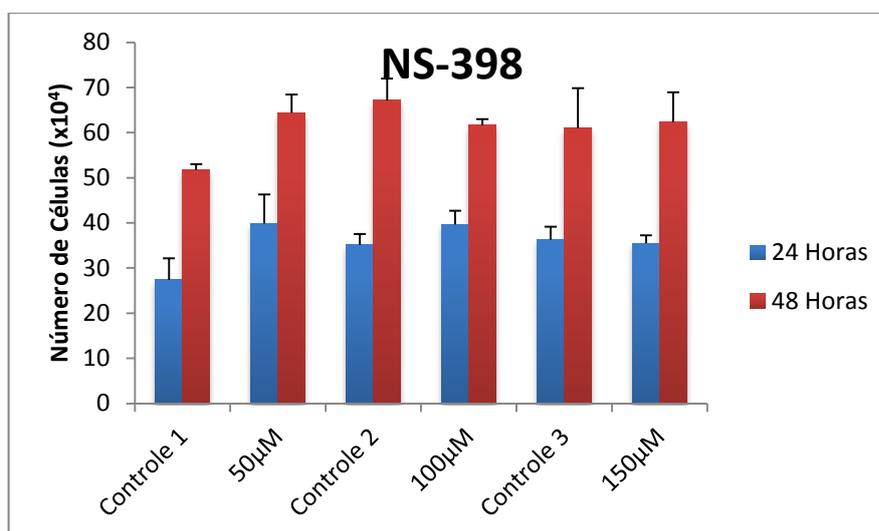
Resultados

Figura 11 – Curva dose-resposta do inibidor de Cox-1 (SC-560) no ensaio de contagem do número total de células.



O inibidor SC-560 diminuiu no ensaio de contagem do número total de células de células T98G. O gráfico mostra o ensaio de contagem do número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de SC-560 nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 1 µM e 150 µM. n=4 **p<0,01.
Fonte: Cunha (2012)

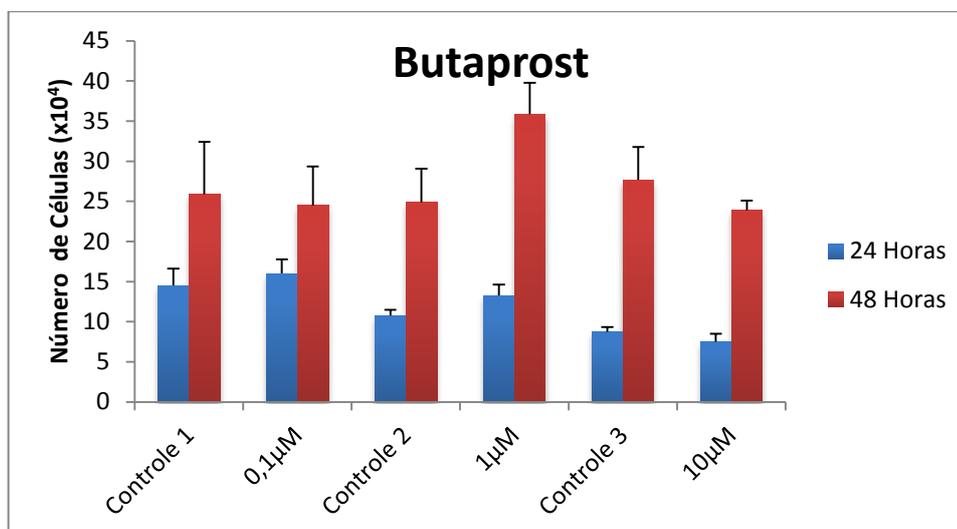
Figura 12 – Curva dose-resposta do inibidor de COX-2 (NS-398) no ensaio de contagem do número total de células.



O inibidor NS-398 não teve efeitos significativos sobre no ensaio de contagem do número total de células de células T98G. O gráfico mostra o ensaio de contagem do número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de NS-398 nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 1 µM e 150 µM. n=4
Fonte: Cunha (2012)

Resultados

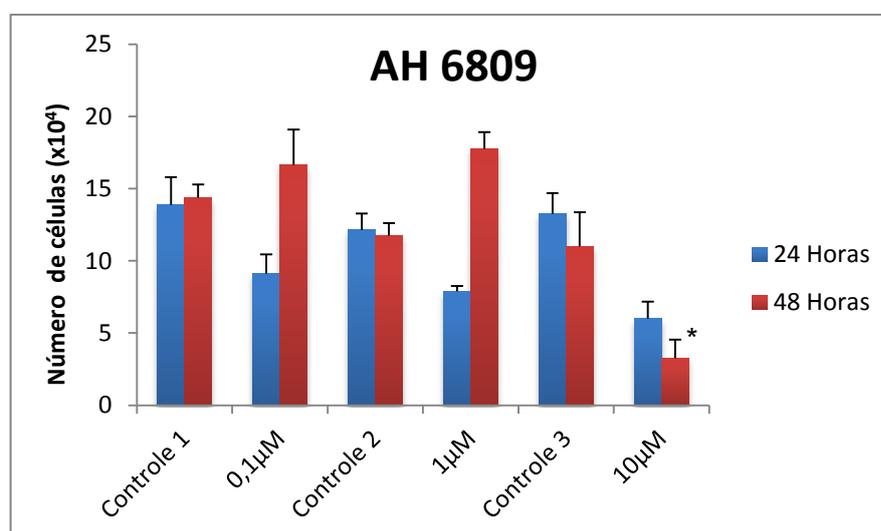
Figura 13 – Curva dose-resposta do Agonista EP2 (Butaprost) no ensaio de contagem do número total de células.



O agonista Butaprost demonstrou não influenciar o número total de células T98G. O gráfico mostra o ensaio de contagem do número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de Butaprost nas concentrações de 0,1 μM, 1 μM e 10 μM. n=4.

Fonte: Cunha (2012)

Figura 14 – Curva dose-resposta do antagonista EP2 (AH-6809) no ensaio de contagem do número total de células.

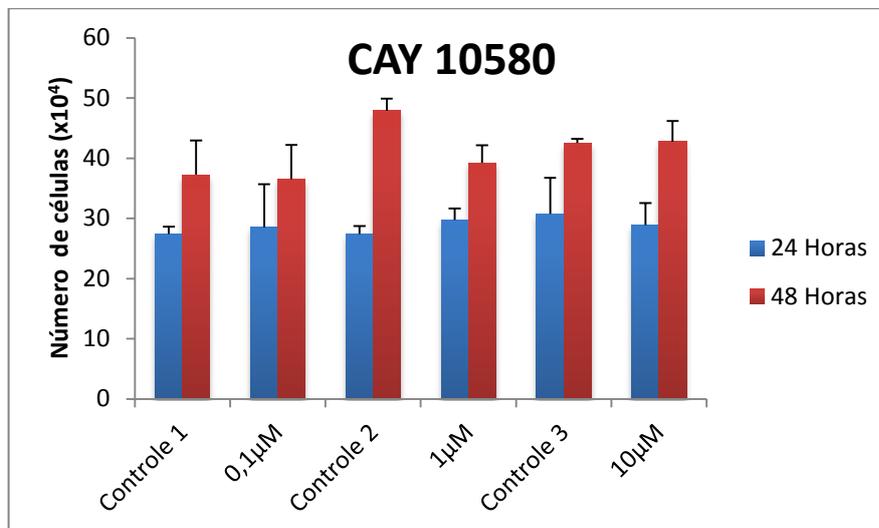


O antagonista AH-6809 diminui a proliferação de células T98G. O gráfico mostra o ensaio de contagem do número total de células do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de AH-6809 nas concentrações de 0,1 μM, 1 μM e 10 μM. n=4
*p<0,05.

Fonte: Cunha (2012)

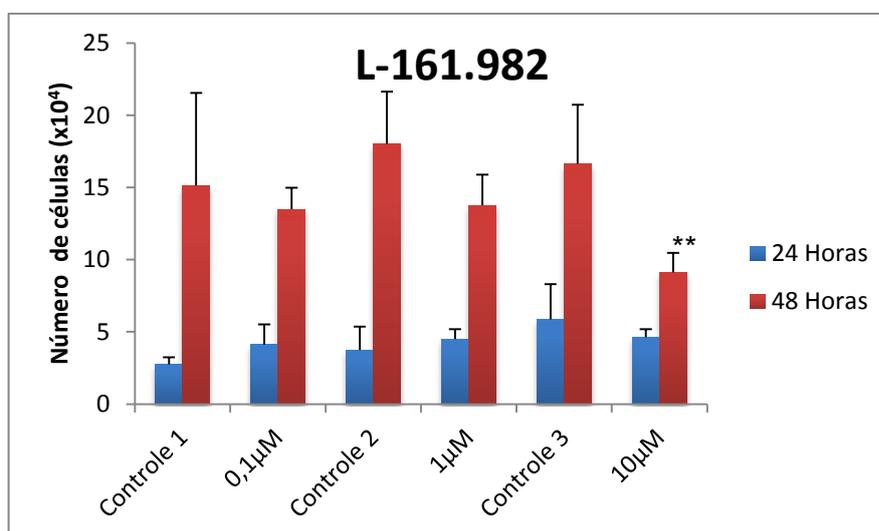
Resultados

Figura 15 – Curva dose-resposta do agonista EP4 (CAY 10580) no ensaio de contagem do número total de células.



O agonista CAY 10580 não influencia a proliferação de células T98G. O gráfico mostra a proliferação celular do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de CAY 10580 nas concentrações de 0,1 μM, 1 μM e 10 μM. n=4
Fonte: Cunha (2012)

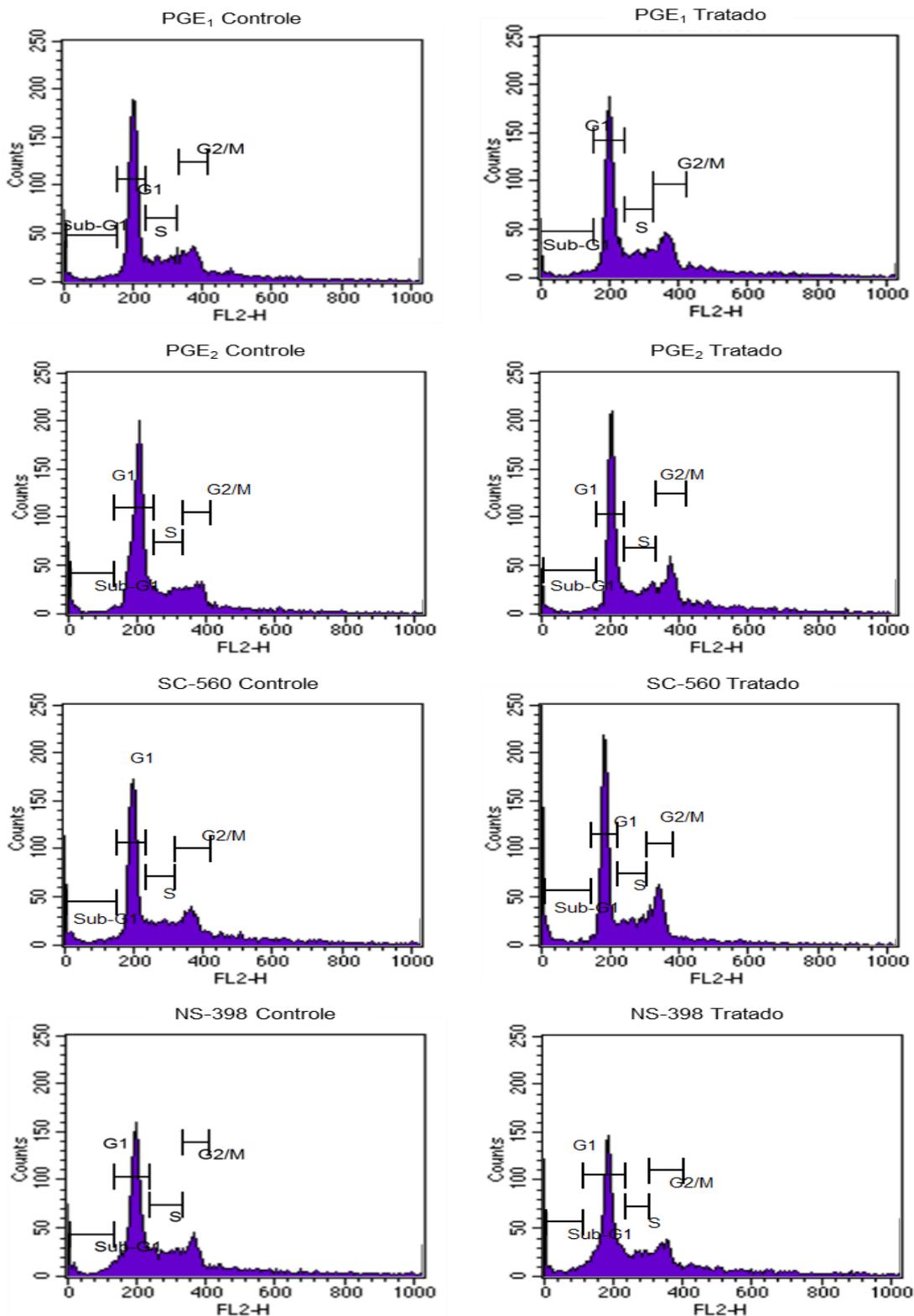
Figura 16 – Curva dose-resposta do antagonista EP4 (L-161.982) no ensaio de contagem do número total de células.



O antagonista L-161.982 diminui o número total de células T98G. O gráfico mostra a proliferação celular do grupo tratado em relação ao grupo controle, isto é, com ou sem adição exógena de L-161.982 nas concentrações de 0,1 μM, 1 μM e 10 μM. n=4 **p<0,01
Fonte: Cunha (2012)

Resultados

Figura 17 – Ciclo celular da linhagem T98G após 48 horas de tratamento com PGE₁, PGE₂ e inibidores para COX-1 e COX-2.

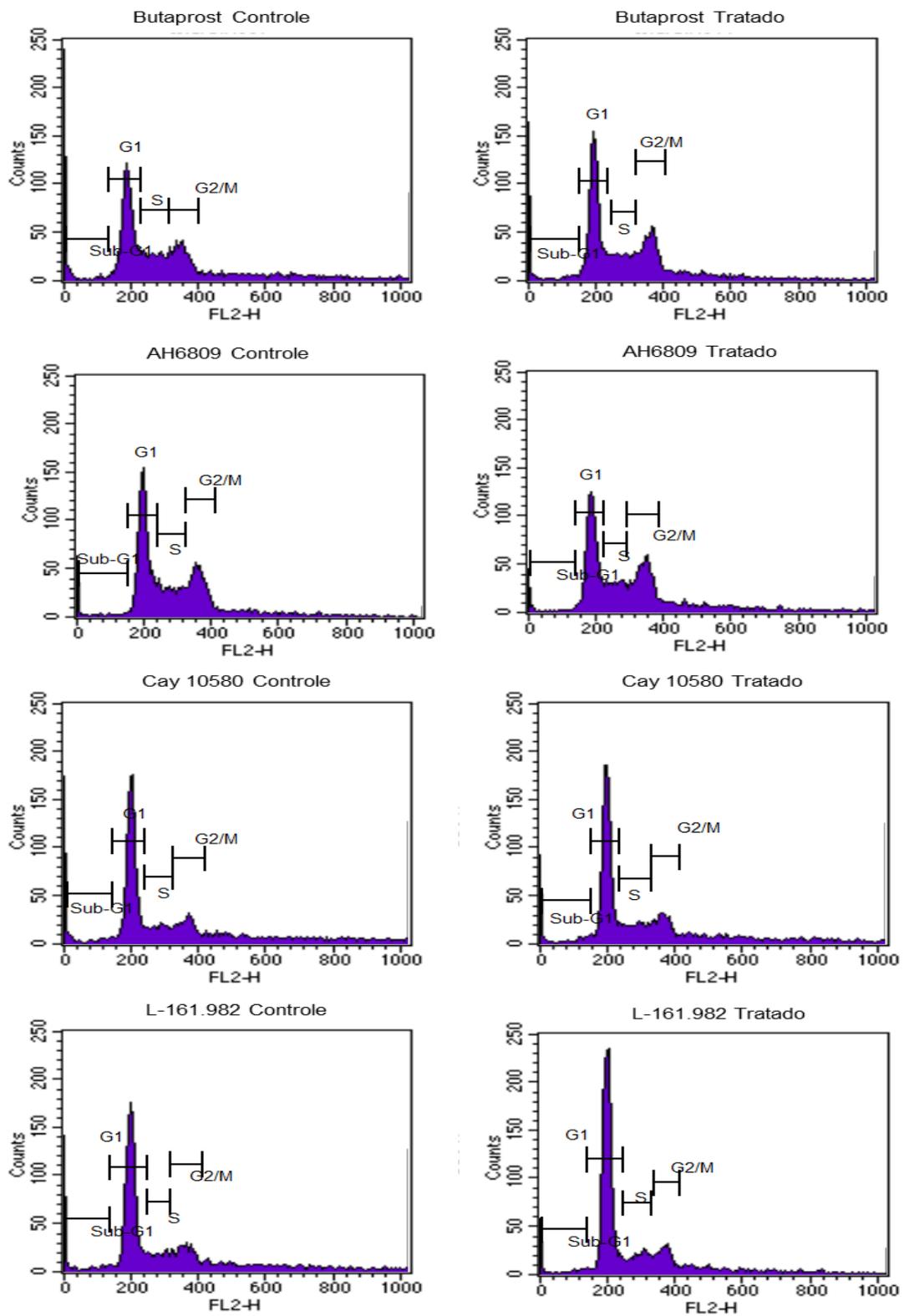


Histogramas analisados no *software Cell Quest*, com número de eventos por intensidade e fluorescência.

Fonte: Cunha (2012)

Resultados

Figura 18 – Ciclo celular da linhagem T98G após 48 horas de tratamento com agonistas e antagonistas para os receptores EP2 e EP4.



Histogramas analisados no *software Cell Quest*, com número de eventos por intensidade e fluorescência.

Fonte: Cunha (2012)

Resultados

Tabela 2 - Resultados da análise de PGE₁ e PGE₂ no ciclo celular

	PGE ₁		PGE ₂	
	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)
Sub-G1	2,7 ± 0,76	3,0 ± 0,40	2,5 ± 0,28	4,33 ± 0,59
G1	50,51 ± 0,89	47,85 ± 0,85*	56,4 ± 0,95	44,0 ± 0,69***
S	15,5 ± 0,68	15,93 ± 0,63	15,5 ± 0,7863	16,3 ± 0,78
G2/M	16,86 ± 1,06	20,7 ± 0,64***	18,3 ± 0,85	18,97 ± 0,63

Resultados da análise de ciclo celular (FACS-PI) de células mantidas durante 48 horas sob tratamento com PGE₁ (10 µM) e PGE₂ (10 µM). Os valores representam as médias e desvios padrões calculados em triplicatas. n=3 *p<0,05 e ***p<0,001

Fonte: Cunha (2012)

Tabela 3 - Resultados da análise de SC-560 e NS-398 no ciclo celular

	SC-560		NS-398	
	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)
Sub-G1	5,82 ± 0,68	6,41 ± 0,87*	4,22 ± 0,84	9,6 ± 0,40***
G1	44,6 ± 0,86	39,36 ± 0,94	48,7 ± 0,59	37,1 ± 0,88***
S	15,4 ± 0,29	15,6 ± 0,53	18,8 ± 0,44	17,3 ± 1,14
G2/M	20,1 ± 1,26	20,4 ± 1,48	13,4 ± 0,72	17,7 ± 0,66***

Resultados da análise de ciclo celular (FACS-PI) de células mantidas durante 48 horas sob tratamento com SC-560 (50 µM) e NS-398 (50 µM). Os valores representam as médias e desvios padrões calculados em triplicatas. n=3 *p<0,05 e ***p<0,001

Fonte: Cunha (2012)

Resultados

Tabela 4 - Resultados da análise de Butaprost e AH 6809 no ciclo celular

	Butaprost		AH-6809	
	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)
Sub-G1	3,6 ± 0,39	3,2 ± 1,3	1,64 ± 0,13	1,4 ± 0,43
G1	59,2 ± 0,51	47,3 ± 6,9**	48,8 ± 0,79	38,5 ± 0,48***
S	17,8 ± 0,35	14,5 ± 1,6	18,6 ± 0,61	18,5 ± 0,5
G2/M	18,3 ± 0,92	17,9 ± 6,0	28,9 ± 0,69	25,6 ± 0,79***

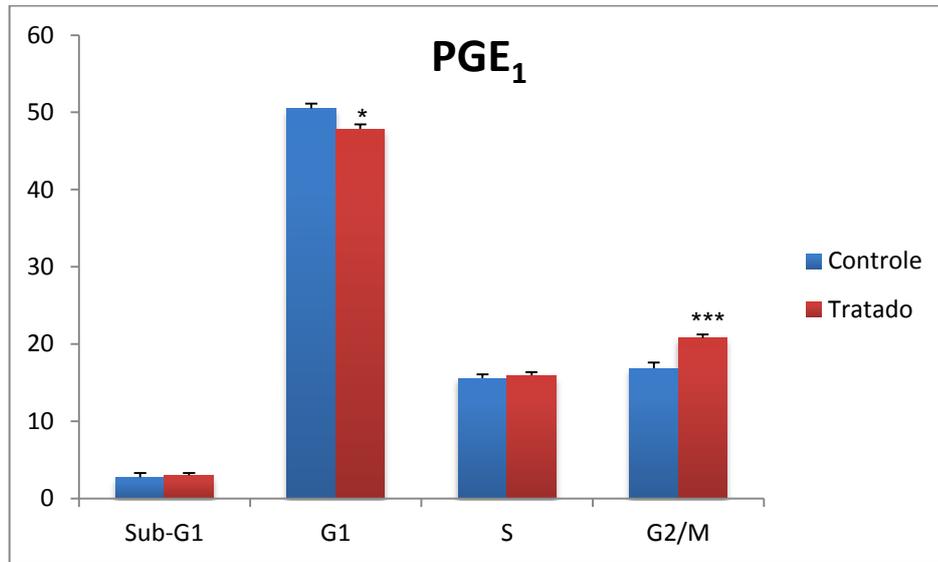
Resultados da análise de ciclo celular (FACS-PI) de células mantidas durante 48 horas sob tratamento com Butaprost (10 µM) e AH-6809 (10 µM). Os valores representam médias e desvios padrões calculados em triplicatas. n=3 **p<0,01 e ***p<0,001
Fonte: Cunha (2012)

Tabela 5 - Resultados da análise de CAY 10560 e L-161.982 no ciclo celular

	CAY 10560		L-161.982	
	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)	Controle (% de células, n=3)	Tratado (% de células, n=3)
Sub-G1	3,5 ± 0,74	3,31 ± 0,44	3,4 ± 0,76	3,06 ± 0,67
G1	46,3 ± 0,98	49,2 ± 0,68*	41,2 ± 0,60	60,6 ± 0,87***
S	11,3 ± 0,86	14,0 ± 1,16*	12,5 ± 0,55	12,19 ± 0,14
G2/M	14,01 ± 0,92	14,96 ± 1,06	12,2 ± 1,02	12,4 ± 0,98

Resultados da análise de ciclo celular (FACS-PI) de células mantidas durante 48 horas sob tratamento com CAY 10560 (10 µM) e L-161.982 (10 µM). Os valores representam médias e desvios padrões calculados em triplicatas. n=3 **p<0,01 e ***p<0,001
Fonte: Cunha (2012)

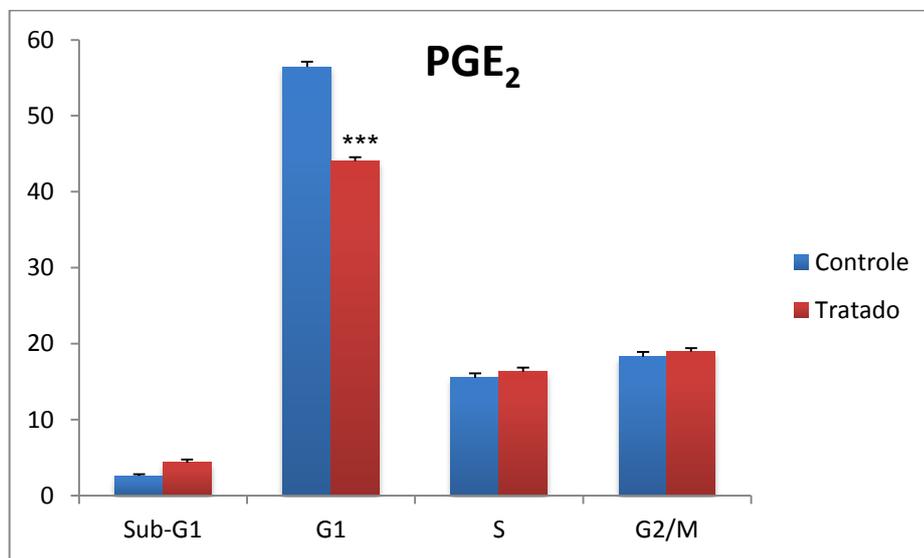
Figura 19 – Comparação entre controle e tratado para PGE₁



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com PGE₁ em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 µM em relação ao controle. n=3 * p<0.05 e ***p<0,001.

Fonte: Cunha (2012)

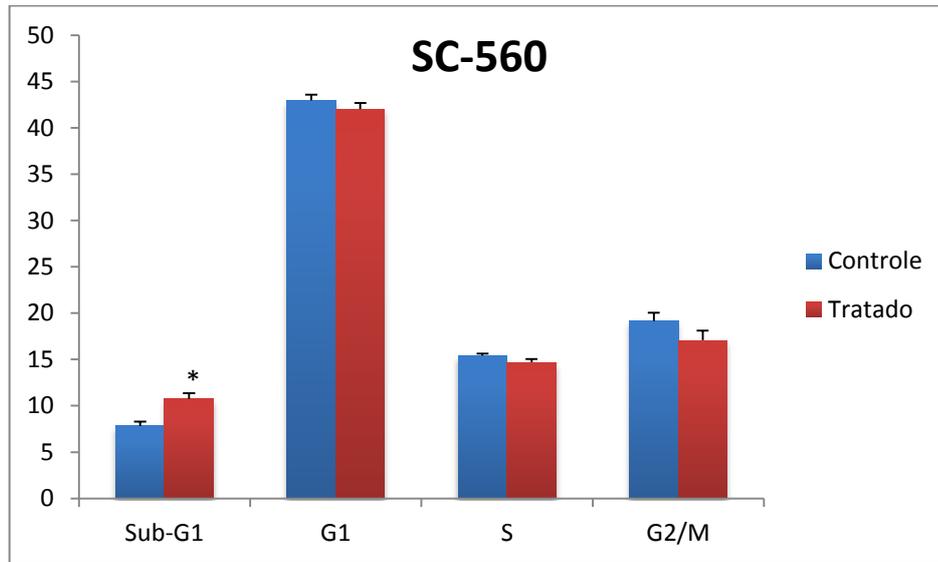
Figura 20 – Comparação entre controle e tratado para PGE₂



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com PGE₂ em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 µM em relação ao controle. n=3 ***p<0,001.

Fonte: Cunha (2012)

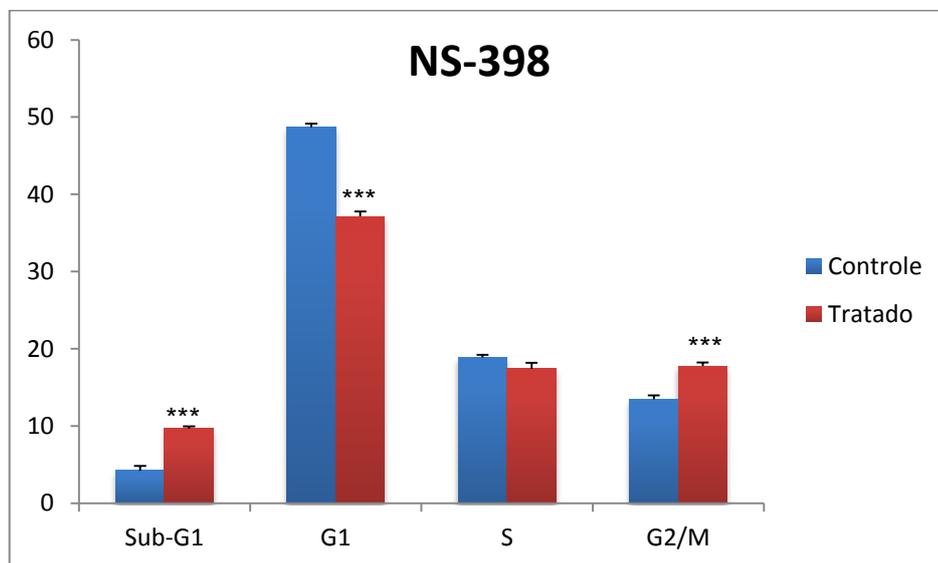
Figura 21 – Comparação entre controle e tratado para SC-560



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com SC-560 em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 µM em relação ao controle. n=3 *p<0,05.

Fonte: Cunha (2012)

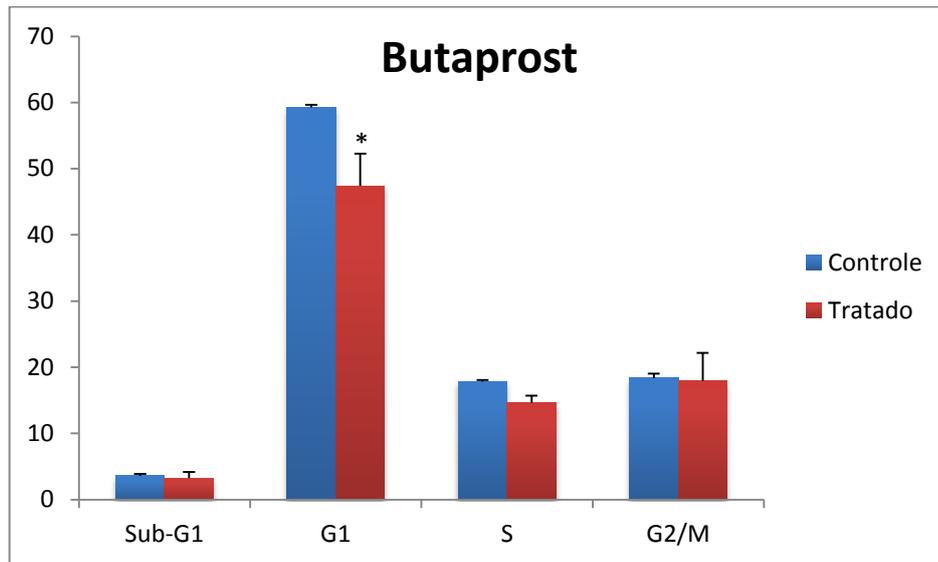
Figura 22 - Comparação entre controle e tratado para NS-398



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com NS-398 em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 µM em relação ao controle. n=3 ***p<0,001.

Fonte: Cunha (2012)

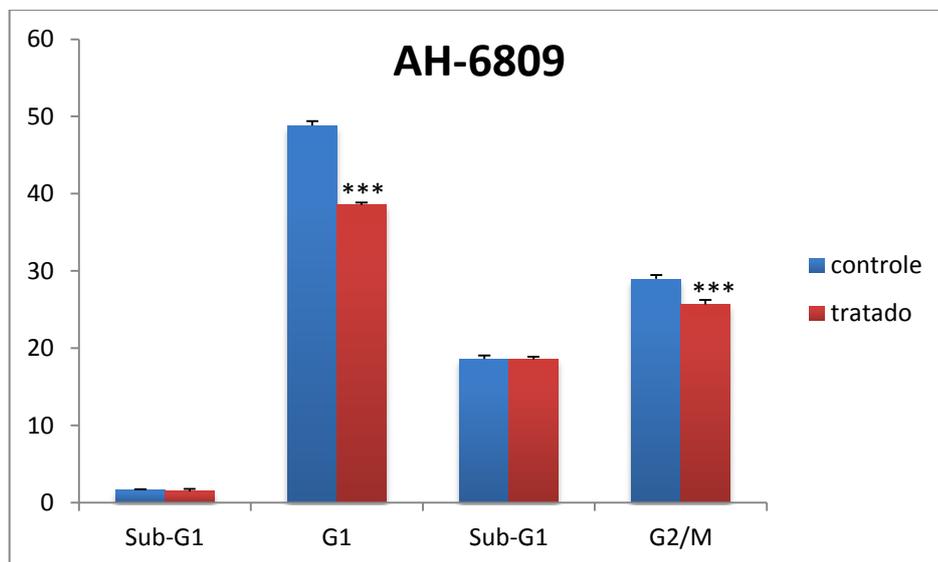
Figura 23 - Comparação entre controle e tratado para Butaprost



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com Butaprost em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 μ M em relação ao controle. n=3 *p<0,05.

Fonte: Cunha (2012)

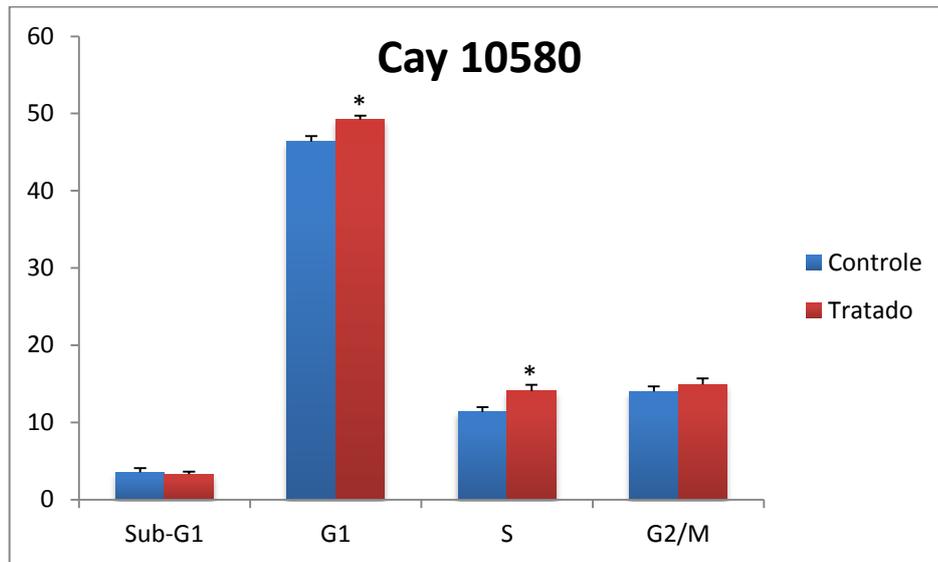
Figura 24 - Comparação entre controle e tratado para AH-6809



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com PGE₂ em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 μ M em relação ao controle. n=3 ***p<0,001.

Fonte: Cunha (2012)

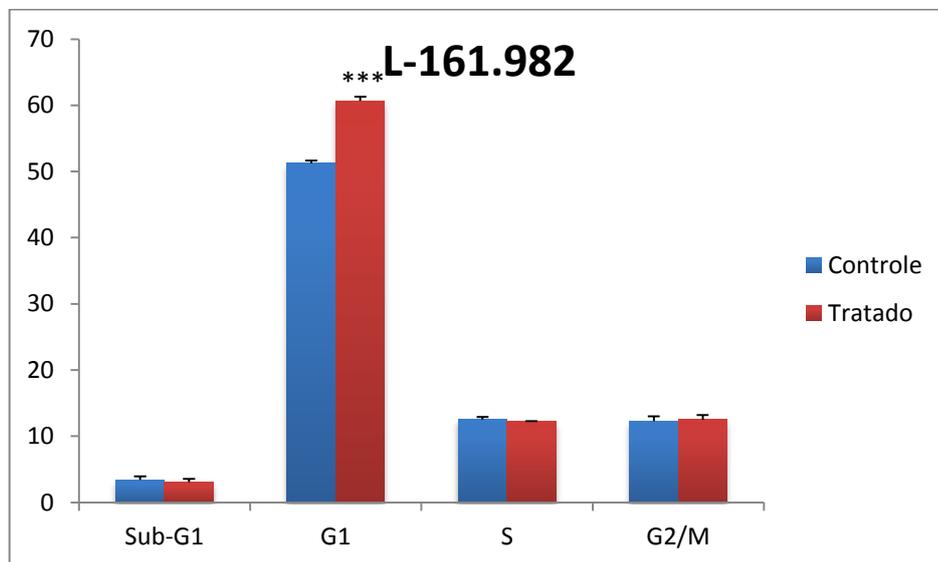
Figura 25 - Comparação entre controle e tratado para Cay 10580



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com Cay 10580 em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 μ M em relação ao controle. n=3 *p<0,05.

Fonte: Cunha (2012)

Figura 26 - Comparação entre controle e tratado para L-161.982



A figura mostra a % populacional, em cada fase do ciclo celular, comparando o grupo tratado com L-161.982 em relação ao controle após 48 horas de tratamento na concentração de 10 μ M em relação ao controle. n=3 ***p<0,001.

Fonte: Cunha (2012)

5 DISCUSSÃO

Embora a biologia da célula tumoral seja diferente para cada tipo de câncer, a sua capacidade de escapar dos mecanismos de checagem e apoptose que fazem essa célula continuar o ciclo e originar outras células com inúmeras mutações genéticas (Gomes, 2011), parece ser uma característica comum a todas elas, pode ser que nem todas utilizem o mesmo mecanismo, mas vários e em conjunto para atingir o objetivo em questão que é sobreviver. Nos gliomas, nossos resultados sugerem o envolvimento de um destes mecanismos atuando na regulação da proliferação e apoptose da linhagem celular T98G através do envolvimento da PGE₂.

A enzima COX-1 mostra ter papel importante sobre o aumento do número de células, na figura 11, podemos observar os efeitos do inibidor SC-560 (50 µM) sobre o número total de células, visto que reduziu 72,8% do número de células. A análise de FACS demonstra que estes efeitos estão ligados ao aumento de 10,13% da população celular na fase Sub-G1 que representa morte celular (Figura 21).

Esse resultado reflete a importância de COX-1 como citoprotetora, pois sua inibição parece induzir apoptose nas células analisadas.

A enzima COX-2 tem funções igualmente importantes para os mecanismos celulares, pois o tratamento com o inibidor NS-398 demonstra ter efeitos significativos em aumento de 127,48% da população celular na fase Sub-G1, 32,08% em G2/M e redução de 23,81% na fase G1 (Figura 22). Curiosamente, esse inibidor não demonstrou efeitos significativos no ensaio de contagem do número total de células (Figura 12).

Esses dados demonstram a importância de COX-2 nos mecanismos de sobrevivência celular, pois quando essas enzimas são inibidas, observa-se aumento populacional na fase Sub-G1, G1 e G2/M, sugerindo efeitos de apoptose e parada no checkpoint de G1, mas o aumento em G2/M pode estar relacionado à mitose, desta forma, pode estar havendo um equilíbrio entre a proliferação e apoptose.

A influência deste inibidor sobre as fases Sub-G1 e G2/M é um indicio da redução de proliferação celular, mas como a análise do número total de células não foi

significativa existe também a possibilidade de que o tempo de exposição a essa droga não tenha sido suficiente para influenciar a dinâmica de proliferação.

A síntese da prostaglandina nas células depende do tipo de ácido graxo que origina o AA incorporado na membrana celular e das enzimas COX, mas sozinhas, estas enzimas parecem ser incapazes de produzir PGE₂ em quantidades elevadas (Murakami et al., 2003), isso sugere o envolvimento de outras enzimas, pois COX-1 e COX-2 são essenciais neste processo de conversão do AA em PGEs, uma vez que são alvos antigos no tratamento da inflamação através de AINES, assim como a fosfolipase que é alvo de anti-inflamatórios hormonais (Carvalho, 1994). Desta forma, a síntese elevada de PGE₂ em células induzidas por estímulos inflamatórios pode ocorrer apenas quando há expressão de mPGES-1, mPGES-2 e cPGES junto com as ciclooxigenases (Murakami et al., 2003).

Tem sido proposto que o seu mecanismo consiste no acoplamento funcional e preferencial com as enzimas COX. Sendo assim mPGES-1 demonstra acoplar-se melhor a COX-2, mPGES-2 a COX-1 ou COX-2 e cPGES apenas a COX-1 (Vazques-Tello, 2004). Essa preferência pode ser explicada, talvez, pela co-localização dessas enzimas na célula, pois mPGES-1 está localizada no retículo endoplasmático e envelope perinuclear assim como COX-2 (Chandrasekharan et al., 2004; Murakami et al., 2003; Ueno et al., 2005).

Nossas análises demonstram a expressão genica de mPGES-1, mPGES-2 e cPGES por RT-PCR (Figura 3A, 3B e 3C) e confirmam a presença das enzimas mPGES-1 e mPGES-2 pela tradução em proteínas analisadas por western Blot (Figuras 5A, 5B). A síntese dessas enzimas na célula T98G sugere a produção de PGE₂ por essas células, pois elas são as responsáveis diretas pela síntese deste prostanóide.

A melhor afinidade entre as enzimas Prostaglandina E sintase terminais e as ciclooxigenases tem efeitos diferentes na síntese de PGE₂ de acordo com o tipo celular, nas quais são expressas. Em macrófagos mPGES-1 deficientes PGE₂ pode ser produzido apenas pela via COX-2/mPGES-1, pois PGH₂ é quantitativamente desviado para a produção de outros prostanóides nestas células (Trebino et al., 2003).

A enzima mPGES-2 parece estar envolvida na produção de níveis cruciais de PGE₂ para manter a homeostase do tecido (Murakami et al., 2003).

As células tratadas com PGE₁ demonstram influenciar de forma positiva o aumento do número de células em 7,22% o número total de células comparadas ao seu controle (Figura 6) e a análise de FACS para ciclo celular demonstra o efeito deste prostanóide na fase G2/M aumentando a população de células nesta fase em 22,78% e redução de 5,27% na fase G1 (Figura 19).

Como houve aumento do número de células no ensaio de contagem, o aumento da população celular na fase G2/M pode significar aumento de mitose nessas células.

A PGE₂ também demonstrou ter efeitos positivos no ensaio de contagem do número total de células, aumentando em 19,32%. Na análise de FACS, observou-se redução populacional de 21,98% na fase G1 do ciclo celular (Figura 20).

Essa redução na fase G1 pode caracterizar a influencia positiva de PGE₂ na progressão do ciclo celular com redução da população de células interrompidas no checkpoint desta fase do ciclo celular.

A PGE₁ e a PGE₂ possuem formas estruturais semelhantes entre si, mas não exatamente iguais, portanto é possível que PGE₁ tenha efeitos na fase G2/M e PGE₂, não os apresente.

Levin et al.,(2002) sugere que é altamente sugestivo que a prostaglandina E₁ poderia se ligar aos mesmos receptores da prostaglandina E₂ podendo haver também competição entre estes prostanóides pela ligação nos mesmos receptores. Mas existe também a possibilidade de existirem receptores separados para cada prostanóide.

A prostaglandina sintetizada pelas células pode ser exportada para o meio extracelular ligando-se a receptores específicos denominados receptores EPs de forma autócrina ou parácrina, isto é, na própria célula ou nas células vizinhas desencadeando estímulos celulares.

Suas ações são desencadeadas através de vias de sinalização, para a produção de mais PGE₂, desta forma teria efeito de feedback positivo sobre a síntese de PGE₂. Além desses efeitos, a PGE₂ também possui efeitos internos, pois existem transportadores de prostaglandina (prostaglandin transporters) responsáveis por internalizar a prostaglandina do meio externo, para que este prostanóide desenvolva funções intracelulares ligando-se a subtipos de receptores EPs localizados no interior da célula (Kanai et al., 1995).

O receptor EP1 é expresso tanto no núcleo quanto nas células de câncer de mama primário, porém com a evolução destes tumores, este receptor torna-se ausente no núcleo dessas células. Este receptor foi detectado também em câncer de pele não melanoma, o que indica que EP1 está associado a um melhor prognóstico de sobrevivência para os pacientes por ser expresso em tumores de baixo grau de malignidade (Ma et al., 2010).

Este receptor não foi encontrado na linhagem T98G, talvez por tratar-se de um glioma de grau elevado, uma vez que os trabalhos citados sugerem que este receptor estaria presente em tumores menos agressivos, porém há contradições quanto a isso, pois EP1 é expresso em outras linhagens de GBM (Matsuo, 2004).

Já o receptor EP2 demonstra ter papel importante nos mecanismos de proliferação e apoptose em tumores de pele, pois camundongos Knockout para esse receptor apresentam menor proliferação celular e maior número de células apoptóticas comparados ao tipo selvagem (Sung et al., 2003). Os efeitos de EP2 sobre a proliferação celular foi observado também nos tumores de mama, no qual a expressão de EP2 demonstra estar diretamente relacionada a expressão de COX-2 e os efeitos de aumento dessa expressão diretamente proporcionais a produção de PGE₂ pela célula (Chang et al., 2004). PGE₂ demonstra ter efeito citoprotetor ao reduzir a apoptose em linhagens de câncer colorretal (Loffer et al., 2008).

Nossas análises de contagem do número total de células para o receptor EP2 demonstram que o agonista Butaprost utilizado no ensaio não teve efeitos significativos sobre as células T98G (Figura 12), mas a análise de FACS revela redução de 20,10% na fase G1 do ciclo celular (Figura 23), o que pode significar a indução da progressão do ciclo celular para células que estavam paradas nesta fase, mas a ausência de efeitos nas fases S e G2/M poderiam explicar a ausência de efeitos para Butaprost.

Quando realizamos os mesmos ensaios utilizando o antagonista AH 6809, efeitos significativos na redução do número de células foram observados, reduzindo em 70,45% o número de células quando comparadas ao controle (Figura 13), a análise de FACS apresentou diminuição de 21,10% da população celular na fase G1 e 11,41% na fase G2/M (Figura 24), podendo significar a que a inibição de ligantes neste receptor por estimular a progressão do ciclo celular, mas pode também reduzir mitose.

O receptor EP3 aumenta a proliferação celular de câncer coloretal quando estimulado por PGE₂ exógena e desempenha também efeitos citoprotetores reduzindo apoptose nessas células por meio da redução de cAMP. (Loffer et al., 2008). Análises em neuroblastoma demonstram que os efeitos proliferativos não são mediados por um único receptor, mas EP3 está entre eles (Casmuson et al., 2012). O receptor EP3 não influencia o crescimento ou a regulação da expressão de COX-2 em polipos intestinais (Sonoshita et al., 2001). Nas células T98G, nós identificamos a ausência da expressão deste receptor.

O receptor EP4 está localizado na membrana celular, citoplasma e membrana nuclear e quando estimulado por PGE₂ promove o aumento nos níveis de cAMP por ativação de adenilato ciclase.

Este receptor é expresso nas glândulas mamárias durante a gravidez, assim como em tumores de mama, quando tratadas com NSAIDS, são observadas reduções não apenas na expressão de EP4, mas também no desenvolvimento do tumor, sugerindo o envolvimento deste receptor nos mecanismos de sobrevivência da célula tumoral (Chang et al., 2004). Este receptor tem a sua expressão aumentada nas células do endométrio durante a fase menstrual em mulheres não grávidas (Milne et al., 2001) e em câncer endometrial (Spinella et al., 2004). Esses dados sugerem a importância deste receptor para o desenvolvimento da célula tumoral nos seus mecanismos de proliferação.

Nossas análises com o agonista Cay 10580 não tiveram efeitos significativos sobre o número total de células (Figura 15). Diferente da análise de FACS que demonstra aumento de 6,26% na fase G1 e aumento de 23,89% na fase S do ciclo celular (Figura 25). O aumento na fase G1 sugere a progressão do ciclo celular e o aumento na fase S é um forte indicio de proliferação celular, pois é nesta fase que o DNA é duplicado e a célula está preparando-se para a divisão, mas a ausência de efeitos na fase G2/M pode significar que essas células pararam nesta fase do ciclo celular.

O antagonista L-161.982 para EP4 diminuiu o crescimento celular em 45,11%. Esse dado segue de encontro à análise de FACS, pois o tratamento dessas células

com L-161.982 induziu o aumento de 47,80% na população celular na fase G1 (Figura 26), sugerindo que essas células tenham estacionado nesta fase do ciclo celular.

Esses dados demonstram a importância do receptor EP2 e EP4, que apresentam efeitos importantes para a proliferação celular, mas não para apoptose e reflete também a importância de PGE₁ e PGE₂ que demonstrou aumentar o número de células pós o tratamento, mas também não tem influências sobre apoptose. Além da importância da expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE₁ e PGE₂, pois COX-1 e COX-2 demonstraram efeitos importantes no mecanismo de apoptose, sugerindo um efeito citoprotetor.

Experimentos com células de pólipos intestinais deficientes de receptores EP2, demonstram a redução da expressão de COX-2, sugerindo um mecanismo de feedback positivo no qual EP2 induz a expressão de COX-2 originando a síntese elevada de PGE₂ (Sonoshita et al., 2001).

Alguns estudos demonstram resultados paradoxais em relação aos efeitos da administração exógena de PGE₂ em concentrações elevadas, pois pode reduzir a proliferação celular (Matsuo et al., 2004; Lalier et al., 2007).

Outro resultado divergente é a elevada expressão de mPGES-1 em gliomas, que demonstra estar correlacionada ao maior tempo de vida dos pacientes, pois tem efeito positivo sobre apoptose, estimulando aumento de Bax pela produção de PGE₂ (Lalier et al., 2007).

Embora explicações mais detalhadas permaneçam obscuras, é possível que a ativação de subtipos diferentes de receptores EPs tenha efeitos em modular a tumorigenese. Por exemplo, o agonismo de receptores EP2/EP4 inibe o crescimento de tumores intestinais, enquanto camundongos deficientes para esses receptores têm redução de lesões pré-neoplásicas induzidas por carcinógeno.

Cada subtipo de receptor tem afinidade diferente para PGE₂ e é expresso de forma diferente em cada tipo de tumor, além disso, o efeito de PGE₂ pode diferir de acordo com a sua concentração e tipo celular (Matsuo et al., 2004).

6 CONCLUSÃO

A busca por drogas capazes de reduzir os efeitos devastadores do câncer é constante na nossa sociedade. Não apenas drogas eficazes no tratamento, mas também eficazes em não agredir o organismo e suas funções com os efeitos adversos característicos que os medicamentos geralmente apresentam.

Há muito tempo se utilizam anti-inflamatórios não esteroides, mas apenas há pouco tempo seu uso é empregado de forma terapêutica nos tratamentos contra o câncer. Muitos efeitos adversos estão vinculados a esses medicamentos, principalmente por ter como alvo enzimas tão importantes nos diversos mecanismos fisiológicos que constituem o nosso organismo.

Este trabalho demonstra os efeitos de resposta celular tumoral ao se utilizar inibidores específicos para as enzimas COX-1 e COX-2, e nos ajuda a compreender os efeitos individuais dessas enzimas na linhagem T98G de células tumorais de GBM, além de confirmar o envolvimento e a importância dos receptores EP2 e EP4 nos mecanismos de proliferação e ausência de apoptose nessas células.

Esses mecanismos demonstram ter relação direta com o produto de biossíntese das enzimas COX, principalmente a PGE₂ que provou ter maior influência na proliferação celular em relação a PGE₁.

REFÊRENCIAS*

Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M. Host prostaglandinE(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med.* 2003;197(2):221-32.

Antman EM, Bennett JS, Daugherty A, Furberg C, Roberts H, Taubert KA. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *American Heart Association Circulation.* 2007;115(12):1634-42.

Batlouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. *Arq.Bras.Cardiol.* 2010;94(4):556-63.

Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncol.* 2008; 9(3):288-96.

Carvalho JCA. Farmacologia dos Anestésicos Locais *Rev Bras Anestesiol,* 1994;44(1):75-82.

Chakraborti, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal.*,2003;15(7):637-665.

Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5(9):241.

Chang SH, Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, Lane TF, Hla T. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(2):591-6.

Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(19):1440-52.

Claudino RF. Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. Santa Catarina: Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Referências

Dandekar DS, Lokeshwar BL. Inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 expression by Tet-inducible COX-2 antisense cDNA in hormone-refractory prostate cancer significantly slows tumor growth and improves efficacy of chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res.* 2004;10(23):8037-47.

Davis ME, Stoiber AM. Glioblastomamultiforme: enhancing survival and quality of life. *Clin J OncolNurs.* 2011;15 (3):291-7.

Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, Rottier MM, Zwaan CM, Kaspers GJ, Janka-Schaub G, Henze G, Creutzig U, Scheper RJ, Veerman AJ. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. *Blood.* 1998;91(6):2092-8.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12(12):1063-73.

Ellis EF, Chao J, Heizer ML. Brain kininogen following experimental brain injury: evidence for a secondary event. *J Neurosurg.* 1989;71(3):437-42.

Ellis, EF, Wei, EP, Kontos HA. Vasolidation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D2, E2, G2, and I2. *Am J Physiol.* 1979;237:H381-85.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL, Epidemiology of Brain Tumors. *NeurolClin* 2007;25(4):867-90.

FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Ver. Drug. Discov.*, 2(11):879-890, 2003.

Fujino H, West KA, Regan JW. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2614-9.

Gaffney DK, Holden J, Davis M, Zempolich K, Murphy KJ, Dodson M. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J RadiatOncolBiol Phys.* 2001;49(5):1213-7.

García-Bueno B, Leza JC. Inflammatory/anti-inflammatory mechanisms in the brain following exposure to stress. *Rev Neurol.* 2008;46(11):675-83.

Glover, S., de Carvalho, M.S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C.C., Gelb, M.H. Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J. Biol. Chem.* 1995;270(25):15359-67.

Referências

Gomes RN. Análise do papel da prostaglandina E2 na proliferação, migração e apoptose na linhagem de glioma humano T98G e o efeito do ácido gama-linolênico e ibuprofeno sobre este prostanóide. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, Fowler B, Davis L, Hebert RL, Breyer MD. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest.* 1998;102(1):194-201.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):11-21.

Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2004;103(2):147-66.

Hirabayashi, T., Kume, K., Hirose, K., Yokomizo, T., Iino, M., Itoh, H., Shimizu, T. Critical duration of intracellular Ca²⁺ response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1999;274(8):5163-69.
Hirabayashi, T., Shimizu, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1488(1-2):124-38.

Huang WZ, Fu JH, Wang DK, Hu Y, Liu MZ, Yang H, Feng YF, Zheng B, Wang G, Luo KJ, Wen J, Rong TH. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with chemoradiotherapy resistance and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Dis Esophagus.* 2008;21(8):679-84.

Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2003;278(21):19396-405.

Kamei D, Murakami M, Sasaki Y, Nakatani Y, Majima M, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Hara S, Kudo I. Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis. *Biochem J.* 2009;425(2):361-71.

Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science.* 1995;268(5212):866-9.

Kettenmann H, Ranson BR. *Neuroglia*. Oxford: Oxford University Press; 2005. Cap 69, p. 1044-58.

Kleihues P, Cavenee WK: *Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. World Health Organization: classification of tumours. Lyon: IARC Press; 2000.

Kostron H, Bauer R. Management of recurrent malignant glioma--neurosurgical strategies. *Wien Med Wochenschr.* 2011;161(1-2): 20-1.

Referências

Kundu N, Ma X, Holt D, Goloubeva O, Ostrand-Rosenberg S, Fulton AM. Antagonism of the prostaglandin E receptor EP4 inhibits metastasis and enhances NK function. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117(2):235-42.

Lalier L, Cartron PF, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D, Martin SA, Mefflah K, Menanteau J, Vallette FM: Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastomamultiforme. *Oncogene.* 2007;26(34):4999-5009.

Levin G, Duffin KL, Obukowicz MG, Hummert SL, Fujiwara H, Needleman P, Raz A. Differential metabolism of dihomogamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochem J.* 2002;365(Pt 2):489-96.

Liang BC. Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines. *J Neurooncol.* 1996;29(2):149-55.

Löffler I, Grün M, Böhmer FD, Rubio I. Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. *BMC Cancer.* 2008;(8)380.

Löffler I, Grün M, Böhmer FD, Rubio I. Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. *BMC Cancer.* 2008;8:380.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. The 2007 WHO Classification of tumors of the central nervous system. *ActaNeuropathol*2007;(2):97-109.

Lu C, Shervington A. Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem.* 2008;312(1-2):71-80.

Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(6):2923-7.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001;15(11):1311-33.

Mandl ES, Dirven CM, Buis DR, Postma TJ, Vandertop WP. Repeated surgery for glioblastomamultiforme: only in combination with other salvage therapy. *Surg Neurol.* 2008;69(5):506-9.

Matsuo M, Yoshida N, Zaito M, Ishii K, Hamasaki Y. Inhibition of human glioma cell growth by a PHS-2 inhibitor, NS398, and a prostaglandin E receptor subtype EP1-selective antagonist, SC51089. *J Neurooncol.* 2004;66(3):285-92.

Mattila S, Tuominen H, Koivukangas J, Stenbäck F. The terminal prostaglandin synthases mPGES-1, mPGES-2, and cPGES are all overexpressed in human gliomas. *Neuropathology.* 2009;29(2):156-65.

Referências

Milne SA, Perchick GB, Boddy SC, Jabbour HN. Expression, localization, and signaling of PGE(2) and EP2/EP4 receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4453-9.

Miyake, JA. Estudo morfológico e molecular de proteínas envolvidas nos processos de invasão, migração e angiogênese em gliomas tratados com ácido gama-linolênico. [Doutorado em Biologia Celular e Tecidual]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-cancer Drugs.* 2005;16(8):797-803.

Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37937-47.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32783-92.

Nakata E, Mason KA, Hunter N, Husain A, Raju U, Liao Z, Ang KK, Milas L. Potentiation of tumor response to radiation or chemoradiation by selective cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors. *Int J RadiatOncolBiol Phys.* 2004;58(2):369-75.

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *ActaNeuropathol* 2005;109(1):93-108.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-53.

Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J RadiatOncolBiol Phys.* 2004;59(4):928-42.

Rasmuson A, Kock A, Fuskevåg OM, Kruspig B, Simón-Santamaría J, Gogvadze V, Johnsen JI, Kogner P, Sveinbjörnsson B. Autocrine prostaglandin E2 signaling promotes tumor cell survival and proliferation in childhood neuroblastoma. *PLoS One.* 2012;7(1):e29331.

Saikawa Y, Sugiura T, Toriumi F, Kubota T, Suganuma K, Isshiki S, Otani Y, Kumai K, Kitajima M. Cyclooxygenase-2 gene induction causes CDDP resistance in colon cancer cell line, HCT-15. *Anticancer Res.* 2004;24(5A):2723-8.

Schievella, A.R., Regier, M.K., Smith, W.L., Lin, L.L. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1995;270(51):30749-54.

Referências

Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(2):69-83.

Scott DL. Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis. *ClinPharmacolTher.* 2012;91(1):30-43.

Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 2004;56(3):387-437.

Smith, W.L., Dewitt, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.*, 62:167-215, 1996.

Smith, W.L., Marnett, L.J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim.Biophys.Acta.* 1991;1083(1):1-17.

Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med.* 2001;7(9):1048-51.

Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46700-5.

Stylli SS, Kaye AH, Lock P. Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J ClinNeurosci.* 2008;15(7):725-37.

Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1996;56(19):4424-9.

Sung YM, He G, Fischer SM. Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development. *Cancer Res.* 2005; 65(20):9304-11.

Takeuchi K, Ukawa H, Kato S, Furukawa O, Araki H, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Narumiya S. Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). *Gastroenterology.* 1999;117(5):1128-35.

Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase 1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32775-82.

Ueno N, Takegoshi Y, Kamei D, Kudo I, Murakami M. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *BiochemBiophys Res Commun.* 2005;338 (1):70-6.

Vazquez-Tello A, Fan L, Hou X, Joyal JS, Mancini JA, Quiniou C, Clyman RI, Gobeil F Jr, Varma DR, Chemtob S. Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E2

Referências

synthases and cyclooxygenases in the brain. *Am J PhysiolRegullIntegr Comp Physiol.* 2004;287 (5):R1155-63.

Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem.* 1993;268(27):20175-8.

Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem.* 1993;268(27):20175-8.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996;6(3):217-23.

Wu T, Wu H, Wang J, Wang J. Expression and cellular localization of cyclooxygenases and prostaglandin E synthases in the hemorrhagic brain. *J Neuroinflammation.* 2011;8:22.