

Efeito modulador do Firocoxib (Previcox[®]) sobre a ação carcinogênica da doxorubicina por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*

Modulatory effect of Firocoxib (Previcox[®]) on the carcinogenic action of doxorubicin through the epithelial tumor teste (TTE) in Drosophila melanogaster

Nayara Júnia de Souza Bontempo^{1*}, Priscila Capelari Orsolini²

¹Médica Veterinária pelo Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Docente do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM; ²Doutora em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Docente do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM

Resumo

Introdução: a superexpressão da COX-2 relaciona-se com o aumento da produção de fatores de crescimento vascular e como consequência, com o desenvolvimento tumoral. O Firocoxib é um anti-inflamatório não esteroide utilizado para inflamação associada à osteoartrite em cães. É o inibidor mais seletivo da COX-2, reduzindo eficientemente a ação desta enzima. Estudos indicam os benefícios do Firocoxib na terapia antineoplásica. **Objetivo:** este trabalho objetivou avaliar o efeito modulador do Firocoxib sobre a ação da doxorubicina (DXR) por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster*. **Metodologia:** foram preparadas três concentrações de Firocoxib: 2,5; 5 e 10 mg/mL, utilizadas isoladamente e em associação à doxorubicina. O tratamento ocorreu com larvas de *D. melanogaster* descendentes do cruzamento de fêmeas wts/TM3 com machos mwh/mwh. **Resultados:** os resultados sugerem que o Firocoxib possui atividade moduladora sobre a ação carcinogênica da DXR, pois houve redução significativa nas frequências tumorais dos indivíduos tratados com diferentes concentrações de Firocoxib em cotratamento com a doxorubicina quando comparadas à frequência tumoral do controle positivo. **Conclusão:** conclui-se que, nas presentes condições experimentais, o Firocoxib reduziu a frequência de tumores induzidos pela doxorubicina em *D. melanogaster*.

Palavras-chave: *Drosophila melanogaster*. Efeito Modulador. ETT. Firocoxib.

Abstract

Introduction: COX-2 overexpression is related to increased production of vascular growth factors and, as a consequence, to tumor development. Firocoxib is a non-steroidal anti-inflammatory drug used for inflammation associated with osteoarthritis in dogs. It is the most selective inhibitor of COX-2, efficiently reducing the action of this enzyme. Studies indicate the benefits of Firocoxib in anticancer therapy. **Objective:** this study aimed to evaluate the modulatory effect of Firocoxib on the action of doxorubicin (DXR) by means of the epithelial tumor test (ETT) in *Drosophila melanogaster*. **Methodology:** three concentrations of Firocoxib were prepared: 2.5; 5 and 10 mg/mL, used alone and in association with doxorubicin. The treatment occurred with *D. melanogaster* larvae descended from the crossing of wts/TM3 females with mwh/mwh males. **Results:** the results suggest that Firocoxib has modulating activity on the carcinogenic action of DXR, as there was a significant reduction in tumor frequencies in individuals treated with different concentrations of Firocoxib in co-treatment with doxorubicin when compared to the tumor frequency of the positive control. **Conclusion:** it is concluded that, under the present experimental conditions, Firocoxib reduced the frequency of tumors induced by doxorubicin in *D. melanogaster*.

Keywords: *Drosophila melanogaster*. Shaping Effect. ETT. Firocoxib.

INTRODUÇÃO

Ao longo de sua existência as células podem sofrer mutações, ou seja, alterações no material genético, que podem estar associadas a erros de duplicação ou a exposição dessas células a diversos agentes mutagênicos (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, 2020). As mudanças decorrentes dessas mutações podem ocasionar um descontrole na proliferação celular, originando uma troca na informação

do gene, ausência de síntese ou surgimento de proteínas diferentes, com o consequente aparecimento de quadros cancerígenos (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

O câncer é uma doença multifatorial crônica, caracterizada pelo crescimento celular descontrolado, que resulta na formação de uma massa celular denominada neoplasia ou tumor maligno (BIRKENKAMP-DEMTRÖDER *et al.*, 2018). Os principais grupos de genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (KANG *et al.*, 2017). A normalidade e funcionalidade desses genes são constantemente alteradas por fatores ambientais (INCA, 2013).

Correspondente/Corresponding: *Nayara Júnia Bontempo – End.: Rua Maria Ferreira Braga, número 147, CEP: 38720-000, Lagoa Formosa – Minas Gerais – Tel: (034) 99802-3526 – E-mail: nayarajunia@hotmail.com

Em virtude do avanço da terapêutica no tratamento do câncer, observa-se, nos últimos anos, um aumento da expectativa de vida dos pacientes oncológicos. No entanto, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 (OPAS, 2018; OMS, 2019). No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a manifestação da doença progredirá, pois são estimados 625 mil novos casos de câncer para o triênio 2020-2022 (INCA, 2020). Tal pressuposto ressalta a necessidade de uma constante busca por novos princípios e substâncias que auxiliem na prevenção e tratamento desta enfermidade (TWOMEY *et al.*, 2017).

Existem certas substâncias que interferem no aumento das frequências mutagênicas e carcinogênicas (DUTRA *et al.*, 2016). Diversos estudos têm correlacionado o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias com a presença da ciclooxigenase-2 (COX-2) em tumores animais (ARAÚJO *et al.*, 2021; BAIONI *et al.*, 2017; NARDI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018). A partir destas observações foram sugeridos os benefícios do uso de inibidores de COX-2 na terapia antineoplásica (KNAPP *et al.*, 2016; MILLANTA *et al.*, 2012). A COX-2 é uma enzima presente na biossíntese de prostaglandinas, induzida e sintetizada em processos inflamatórios e neoplásicos, relacionando-se aos mecanismos de inibição da apoptose, indução de angiogênese, estímulo à proliferação celular, invasão tumoral e supressão do sistema imune (CASSALI *et al.*, 2018).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são medicamentos frequentemente prescritos na rotina clínica. São inibidores das ciclooxigenases, seletivos ou não. Os inibidores não seletivos são os AINEs denominados de tradicionais ou convencionais, que apresentam mais efeitos adversos (pois inibem tanto COX-1, quanto COX-2), principalmente gástricos. Por isso, foram desenvolvidos AINEs seletivos para inibição da COX-2, os chamados COXIBs, e surgiram com o intuito de reduzir os efeitos gastrointestinais dos inibidores tradicionais. Destes, o Firocoxib (Previcox®) encontra-se como um dos mais utilizados na medicina veterinária (BURKETT *et al.*, 2016; HOLLAND *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais envolve a inibição da oxidação do ácido araquidônico por meio das enzimas ciclooxigenases (COXs) de ácidos graxos, envolvidas na síntese de prostanoídes e tromboxanos (KENNEDY; HARRIS, 2018). Os inibidores seletivos atuam especificamente sobre a COX-2. Todavia, essa seletividade pode levar a um desequilíbrio entre os fatores anti- e pró-trombóticos, com predomínio de tromboxano (TXA2) em detrimento de prostacilinas (PGI2), o que desencadeia uma série de complicações cardiovasculares, distúrbios da coagulação e possibilidade de formação de trombos. A inibição específica de COX-2 bloqueia a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI2, diminuindo a excreção de sódio, provocando edema e elevação da pressão sanguínea. Isso mostra a impor-

tância de se fazer uma avaliação criteriosa na escolha da terapia entre os AINEs e os COXIBs (JOEL *et al.*, 2020; LUCAS *et al.*, 2019).

O Firocoxib é um anti-inflamatório não esteroide, indicado para o tratamento da dor e inflamação associada à osteoartrite canina (ALCALÁ *et al.*, 2019; MACPHERSON *et al.*, 2021). É o fármaco inibidor mais seletivo da COX-2, reduzindo em até 80% a ação desta enzima, o que o torna um dos medicamentos veterinários mais potentes na clínica de pequenos animais (VIJARNSORN *et al.*, 2019).

Apesar do aumento da expectativa média de vida dos animais domésticos, o número de casos referentes a neoplasias caninas é um problema cada vez mais comum na prática veterinária (CASSALI *et al.*, 2018). Diante desse contexto, vários pesquisadores têm evidenciado a importância de buscar substâncias químicas com efeito contra essa doença (ARENAS *et al.*, 2016; NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2017).

Estudos sugerem que o uso desse fármaco pode ser uma boa estratégia para prevenção e tratamento de neoplasias em cães (FINOTELLO *et al.*, 2017). Entretanto, ainda não foi realizado nenhum experimento para avaliar o possível efeito anticarcinogênico ou modulador do mesmo em *Drosophila melanogaster*.

Diante disso, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar o efeito modulador do Firocoxib sobre a ação carcinogênica da doxorrubicina, por meio do teste de tumores epiteliais (ETT) em *D. melanogaster*.

METODOLOGIA

AGENTES QUÍMICOS

Os agentes químicos utilizados para realização dessa pesquisa foram: Firocoxib e Cloridrato de Doxorrubicina – DXR. O Firocoxib (lote 002/15, CAS EU/2/04/045/001-006) é um anti-inflamatório não esteroide produzido pela Boehringer Ingelheim, com sede em Ingelheim, na Alemanha. Cada comprimido de 57 mg possui: 24 mg de Firocoxib e 76 mg de excipientes q.s.p. (óxido de ferro E172 e Caramelo E150d) (PREVICOX®, 2016).

O cloridrato de Doxorrubicina foi o composto utilizado como controle positivo na presente pesquisa, pois possui efeito carcinogênico reconhecido (LIMA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2013; ORSOLIN; SILVA-OLIVEIRA; NEPOMUCENO, 2015; SILVA-OLIVEIRA; ORSOLIN; NEPOMUCENO, 2016). A quimioterapia antineoplásica altera o DNA da célula tumoral com o intuito de conter seu crescimento. Entretanto, como a substância age sistemicamente, as células saudáveis também podem sofrer tais alterações, ocorrendo efeito pró-tumoral (ALVES; NEPOMUCENO, 2012). O mesmo foi utilizado na concentração de 0,4 mM, preparado a partir da adição de 0,03538g de Adriblastina® (lote 6PL5112, CAS 25316-40-9), em 25 mL de água osmose reversa autoclavada. Esse medicamento é produzido pelo laboratório Pfizer e é vendido na forma de ampola, contendo 50mg. O medicamento é armazenado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de

Patos de Minas em temperatura ambiente, protegido da luz, respeitando as orientações do fabricante.

TESTE DE TUMORES EPITELIAIS (ETT) EM *Drosophila melanogaster*

Quando se pensa em estratégias e metodologias de ensino, o uso de modelos experimentais alternativos em pesquisas científicas vem crescendo de maneira significativa (VIÇOSA *et al.*, 2017). Nesse sentido, a *D. melanogaster*, popularmente conhecida como mosca das frutas, é um organismo eucarionte, da ordem Díptera, muito utilizado pelos pesquisadores, uma vez que possui fácil manutenção em laboratório, tem um ciclo reprodutivo curto e fornece um grande número de indivíduos por progênie, apresentando reações metabólicas semelhantes às dos mamíferos, o que permite seu uso recorrente em estudos genéticos (GRAF, 2006).

A *Drosophila* possui cerca 80% de homologia genética com os mamíferos e adicionalmente um número significativo de genes estudados na mesma confirmou ser homólogo de genes supressores de tumores em humanos e animais. A importância dessa mosca como organismo modelo para a genética é demonstrada pela descoberta de que 60% dos genes causadores de doenças em mamíferos, bem como 70% dos genes de câncer, têm contrapartes nessa mosca (GRIFFITHS *et al.*, 2016).

A conservação evolutiva de genes supressores de tumor entre *Drosophila* e mamíferos, tais como o gene *wts* em *Drosophila*, homólogo ao *LATS1* (*Large tumor suppressor kinase 1*) presente nos humanos, tem estimulado estudos e testes na indução de tumores em *Drosophila*, os quais podem contribuir diretamente para o entendimento da carcinogenicidade de agentes físicos e químicos (EKEN *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2016; NEPOMUCENO, 2015).

A deleção desse gene, envolvido no controle do ciclo celular, leva a formação de clones de células circulares e consideravelmente invasivas, chamadas literalmente de verrugas, que se desenvolvem por todo o corpo da mosca (NISHIYAMA *et al.*, 1999). Eeken *et al.* (2002) enfatizam que marcador *wts* é uma mutação recessiva e letal em homozigose nos zigotos. Em virtude dessa letalidade, o alelo *warts* é preservado na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico (*TM3*). Por meio do cruzamento entre as linhagens *wts/TM3* e *mwh/mhw*, são adquiridas larvas heterozigotas (*wts/+*). Caso ocorra a perda da heterozigose nas células do disco imaginal, serão originados clones homozigotos. Os clones são viáveis em conjuntos de células isoladas da larva, porém se manifestam como tumores nas moscas adultas.

A rapidez para obtenção de resultados por meio do teste para a detecção de clones de tumores epiteliais, bem como a sensibilidade do organismo modelo à diferentes categorias de substâncias e a economia para avaliar a atividade carcinogênica ou anticarcinogênica de compostos simples e complexos tornam esse teste bastante útil (NEPOMUCENO, 2015).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Armazenamento, coleta, cruzamento das moscas e postura dos ovos

Para realização do teste para detecção de clones de tumores epiteliais foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*: *wts* e *mwh*. Os estoques destas linhagens são mantidos no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas, acondicionados em frascos contendo meio de cultura próprio para *D. melanogaster*, conservados dentro de uma incubadora, a temperatura de 25° C e 60% de umidade (aproximadamente).

A coleta de fêmeas virgens *wts/TM3*, *Sb¹* e machos *mwh/mwh* sucedeu-se durante três dias consecutivos, com intervalos de duas horas entre uma coleta e outra. No último dia deste processo, as duas linhagens foram colocadas para cruzamento em meio de cultura contendo banana. Após 48h do acasalamento, machos e fêmeas foram colocados em frascos contendo meio de cultura próprio para postura (fermento e açúcar), onde as fêmeas depositaram seus ovos.

Tratamento e Análise das moscas

Aproximadamente 400 larvas descendentes do cruzamento anteriormente mencionado foram tratadas em quatro séries independentes, contendo cerca de 100 larvas cada, com Firocoxib (2,5; 5 e 10 mg/mL) e os respectivos controles (positivo e negativo). O experimento foi realizado em quadruplicata e posteriormente os dados foram agrupados para análise. As concentrações de Firocoxib empregadas foram estabelecidas de acordo com o estudo de Schroder *et al.* (2016).

Larvas de 3º estágio foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de purê e 5mL de Firocoxib nas três diferentes concentrações (2,5; 5 ou 10 mg/mL). Para o controle positivo foi utilizada a Doxorubicina (0,4 mM) e, para o controle negativo, água de osmose reversa (ultrapura). As larvas foram tratadas mediante a associação entre Firocoxib e DXR em sistema de cotratamento (envolvendo exposição simultânea aos dois agentes) para análise da possível atividade moduladora do composto testado sobre a ação da carcinogênica da Doxorubicina.

Uma semana após o tratamento, as moscas foram coletadas e armazenadas em frascos contendo etanol a 70%. Feito isso, elas foram separadas com base no fenótipo (apenas moscas portadoras de pelos finos e longos apresentam o gene *wts*, por isso, moscas com fenótipo de pelos curtos e grossos são descartadas). Para a análise das moscas foram utilizadas lupas estereoscópicas, pinças entomológicas e planilhas padronizadas para registro do número de tumores observados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores observadas nas três concentrações testadas de

Firocoxib e os controles (DXR e água de osmose reversa) foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann Whitney, empregando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Na Tabela 1 é possível verificar a frequência de tumores nos diferentes segmentos do corpo das *D. melanogaster* tratadas com os controles (positivo e negativo) e as diferentes concentrações de Firocoxib. As larvas que

não foram submetidas ao cotratamento com Doxorubicina, mas somente expostas às soluções de Firocoxib, nas concentrações de 2,5; 5 ou 10 mg/mL apresentaram frequências de 0,30; 0,27 e 0,24 tumores por mosca, respectivamente. Este resultado evidencia que o Firocoxib, quando comparado ao controle negativo, não induziu aumento na frequência de tumores ($p > 0,05$), o que revela ausência de efeito carcinogênico do Firocoxib nas três concentrações testadas, em *D. melanogaster*.

Tabela 1 – Frequência de clones de tumores observados em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com Previcox® isolado ou em associação com doxorubicina.

Tratamentos			Número de tumores analisados							Frequência (N° de tumores/ mosca)
Firocoxib (mg/mL)	DXR (mM)	N. de moscas	Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	200	0	8	1	32	2	0	43	0,21
2,5	0	200	2	10	5	43	0	1	61	0,30
5	0	200	0	9	4	40	3	0	55	0,27
10	0	200	0	5	3	27	4	0	48	0,24
0	0,4	200	11	30	161	220	38	2	461	2,30*
2,5	0,4	200	1	27	54	209	12	2	301	1,50**
5	0,4	200	0	5	11	91	5	3	115	0,57**
10	0,4	200	0	13	18	76	1	2	110	0,55**

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p \leq 0,05$).

** Valor considerado diferente do controle positivo (DXR 0,4 mM) ($p \leq 0,05$).

DXR, doxorubicina.

Fonte: Dados da pesquisa

Além disso, pode-se observar, diante dos resultados encontrados, que, nas três concentrações testadas de Firocoxib, foi verificado efeito modulador, uma vez que, ao analisar as concentrações associadas (em sistema de cotratamento com a Doxorubicina), observa-se redução significativa de tumores ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle positivo isolado, cuja frequência tumoral foi de 2,30 por mosca. Nessas concentrações, as frequências totais de tumores foram, respectivamente, de 1,50; 0,57 e 0,55 tumores por mosca. A resposta de inibição foi dose dependente, pois a frequência de tumores diminuiu com o aumento da dose utilizada.

Para o controle negativo utilizou-se água de osmose reversa, verificando a frequência de 0,21 tumores por mosca. Esta discreta indução de tumores explica-se devido à ocorrência espontânea. Já o controle positivo, 0,4 mM de DXR, induziu uma frequência de 2,30 tumores por mosca (frequência significativamente superior à obtida no controle negativo). Tal fato demonstra que a linhagem responde à indução tumoral.

DISCUSSÃO

Vários mecanismos já foram propostos na tentativa de elucidar a relação entre a expressão de COX-2, a su-

perprodução de prostaglandinas nas células tumorais, o processo de carcinogênese e o uso de inibidores de COX-2. Dentre estes, podem ser citados a inibição da apoptose, a indução de angiogênese, o estímulo à proliferação celular, o aumento na capacidade de invasão tumoral (favorecendo os mecanismos de metástase) e a supressão do sistema imune (CARVALHO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Investigações *in vitro* demonstraram que células de tumores mamários caninos apresentam grande expressão de COX-2, acarretando elevada síntese de PGE2 e contribuindo, assim, para o processo de tumorigênese (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

Neste estudo foi utilizado um inibidor de COX-2 e, diante dos resultados obtidos, observou-se o efeito contrário ao desenvolvimento tumoral. Conforme apresentado, à medida em que houve aumento na concentração de Firocoxib, as frequências de tumores reduziram, o que permite sugerir que o mesmo tenha atuado na modulação dos efeitos carcinogênicos da doxorubicina, por meio de efeitos secundários à inibição da COX-2.

Os resultados encontrados nessa pesquisa condizem com estudos anteriores. Os fármacos inibidores de COX-2, tais como o Firocoxib mostraram ter potenciais efeitos na redução da incidência de câncer e na capacidade de

potencializar os efeitos da quimioterapia antineoplásica (FINOTELLO *et al.*, 2017). Esses medicamentos são indicados para o tratamento do câncer, pois exerceram efeitos preventivos e terapêuticos em modelos de neoplasia canina espontânea e experimental (CUNHA *et al.*, 2016; FRANZONI *et al.*, 2017).

A evolução na genética molecular aliada a terapêutica tradicional, permitiu o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento para muitos tumores. Dentre estes, se destacam os inibidores de COX-2 e a utilização de fármacos alvo moleculares têm sido amplamente utilizados como marcadores, tanto como fator preditivo quanto prognóstico, na carcinogênese mamária (BIRKENKAMP-DEMTRÖDER *et al.*, 2018).

De acordo com León-Artozqui e Morcate (2008), o tratamento com Firocoxib melhora a qualidade de vida de pacientes com carcinoma de células de transição da bexiga após ser utilizado sozinho ou associado a outras drogas quimioterápicas antineoplásicas, como a cisplatina. Além disso, também foi encontrado um aumento significativo na sobrevivência dos pacientes.

Existem estudos indicando que a inibição farmacológica ou deleção genética de COX-2 reduz a formação tumoral em modelos experimentais animais de câncer de cólon, mama e pulmão (SMYTH *et al.*, 2009). Além disso, sugerem o potencial papel terapêutico de inibidores seletivos de COX-2 como antiangiogênicos e antimetastáticos (ZHANG *et al.*, 2018).

Visando entender o efeito da COX-2 na carcinogênese, de forma mais aprofundada, alguns pesquisadores utilizaram modelos experimentais (ratos) que apresentavam uma deleção do gene para expressão de COX-2. Nestes animais, houve uma redução de 86% no desenvolvimento de pólipos intestinais quando comparados com animais que expressaram normalmente a COX-2 (GROOT *et al.*, 2007).

Os inibidores seletivos de COX-2, também têm mostrado atrasar significativamente a incidência de tumores mamários em camundongos transgênicos (MILLANTA *et al.*, 2006), reduzindo o crescimento e o desenvolvimento de tumores. Dessa forma, melhoram o prognóstico e a sobrevivência (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2003).

A relação entre a expressão de COX-2 e a carcinogênese tem sido pesquisada em diversos tipos de tumores caninos, incluindo carcinoma de células de transição de bexiga, carcinoma prostático e de células escamosas, adenocarcinoma de cólon retal, osteossarcoma e melanoma oral. Consequentemente, o uso de inibidores de COX-2, como o Firocoxib, tem sido amplamente empregado em vários destes tumores, de forma a minimizar a evolução dos mesmos (ALCALÁ *et al.*, 2019).

Assim, embora o presente estudo não nos permita concluir, com exatidão, quais mecanismos estão diretamente envolvidos com a modulação do efeito carcinogênico da DXR e, com a consequente redução de tumores observados, supõe-se que estejam associados à indução da apoptose, redução da angiogênese e redução na capacidade de metástases.

Sobre o efeito apoptótico, um estudo em carcinomas de células de transição de bexiga, em humanos, demonstrou correlação positiva entre a expressão de COX-2 e a expressão de survivina, uma proteína membro da família das proteínas inibidoras de apoptose (JANG; LEE, 2009). Evidências sugerem que o uso de um inibidor de COX-2, pode levar a diminuição da expressão de proteínas inibidoras de apoptose, como o Bcl-2, Bcl-xL e survivina, e aumento de proteínas pró apoptóticas, como a Bad (GROSCH *et al.*, 2006; MILLANTA *et al.*, 2006).

A diminuição da apoptose em decorrência da superexpressão da COX-2 nas células neoplásicas faz com que aumente o tempo de sobrevivência das células e consequentemente favoreça o acúmulo de mutações genéticas sucessivas, contribuindo para a progressão do tumor (BARDAGÍ; FONDEVILA; FERRER, 2012; KANAOKA; TAKAI; YOSHIDA, 2007). Ao contrário, ao inibir a COX-2, o que ocorre com o uso de Firocoxib, tais mecanismos ficam suprimidos e, portanto, há menor probabilidade de geração e progressão de tumores.

Estudos evidenciaram o envolvimento da COX-2 no mecanismo de inibição do apoptose, decorrente da inibição da proteína pró-apoptótica Bax e superexpressão do marcador de proteína anti-apoptótica bcl-2. Há também a ativação da via da proteína serina-treonina quinase (Akt). A Akt raramente inicia a oncogênese, mas contribui para a progressão do tumor ao inibir a apoptose, promovendo mudanças no metabolismo, proliferação celular e migração e invasão das células cancerosas (KRZEŚLAK, 2010).

No que se refere à angiogênese, a expressão da COX-2, que catalisa a produção de prostaglandinas, está altamente correlacionada com a intensidade da angiogênese e o desenvolvimento do tumor (JAIN *et al.*, 2008). Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que um aumento na expressão de COX-2 em tumores contribui para a neovascularização por estimular a síntese e atividade de fatores pró-angiogênicos e exerce uma influência direta nas células endoteliais pelos produtos das reações com COX-2: PGE2, PGI2 e TXA2 (SZWEDA *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2005). Foi descoberto que os inibidores da COX-2 suprimem a neovascularização na progressão do câncer e proporcionam efeitos terapêuticos positivos (SALVADO *et al.*, 2012).

Estudos feitos com cadelas mostraram que a expressão de COX-2 foi associada a alterações nucleares importantes, a um alto índice mitótico, maior infiltração tumoral e expressão de fatores de crescimento do endotélio vascular. Em gatas, a expressão aumentada de COX-2 correlacionou-se ao aumento de VEGF e da angiogênese tumoral, o que trouxe uma menor sobrevivência (ARENAS *et al.*, 2016).

Sobre a capacidade metastática, evidências existem sobre a associação entre COX-2 e a progressão tumoral. Pesquisas demonstraram que o aumento da COX-2 se relaciona também ao aumento da atividade de determinadas proteínas, como as metaloproteinases, enzimas responsáveis pela digestão do colágeno na matriz inter-

celular, permitindo o rompimento das barreiras e invasão tecidual. A expressão de COX-2, e a consequente produção de prostaglandinas, levam a supressão na produção de linfócitos B e T, diminuição na produção de linfocinas, diminuição na formação de células Natural Killers, inibição da liberação de interleucinas, resultando na síntese de células T não responsivas. Toda essa falha no sistema imunológico também favorece o desenvolvimento tumoral (KANAOKA; TAKAI; YOSHIDA, 2007; SOBOLEWSKI *et al.*, 2010). Em contrapartida, mais uma vez, o Firocoxib, ao inibir a COX-2, tende a promover efeitos opostos, o que pode também estar associado aos resultados obtidos no presente estudo.

A superexpressão de COX-2 estimula a atividade de metaloproteínas de matriz, sobretudo MMP-2 e MMP-9, e contribui para a infiltração e metástase. No câncer de mama invasivo, níveis mais elevados de expressão de COX-2 e MMP-2 foram associados à redução da sobrevivência, o que indica que ambos os parâmetros são marcadores de mau prognóstico no câncer de mama (KRZEŚLAK, 2010).

Em um estudo de câncer de cólon foi observado que células que expressavam maior quantidade de COX-2 apresentavam maior potencial de invasão celular e metástase quando comparadas com células que expressavam uma menor quantidade desta enzima (GROOT *et al.*, 2007).

No entanto, apesar de as evidências disponíveis indicarem que várias neoplasias exibem maior expressão de COX-2, o efeito do tratamento com inibidores desta enzima em neoplasias requerem avaliação adicional, pois apesar das investigações já realizadas, ainda não existe um consenso quanto ao uso estabelecido desta classe farmacológica como agentes anticancerígenos (LAVALLE *et al.*, 2009).

Diante do exposto, pode-se sugerir que o Firocoxib, por ser um AINEs, impede a formação de prostaglandinas por inibição da COX-2, que acontece por alteração enzimática ou por competição pelo sítio COX do ácido araquidônico, o que diminui a angiogênese e a progressão tumoral, uma vez que estas podem mediar vários mecanismos, como a proliferação celular, apoptose, modulação do sistema imune e angiogênese. Carcinomas com maior expressão de COX-2 têm sido relacionados com um prognóstico desfavorável (FRANZONI *et al.*, 2017).

Sendo assim, o potencial modulador verificado no Firocoxib sobre a ação carcinogênica da Doxorubicina, devido a redução de tumores induzidos pela mesma, justifica-se, possivelmente, em decorrência de vários mecanismos secundários ao seu efeito inibitório na Cicloxigenase 2 (COX-2), pois sua superexpressão apresenta relação direta com o crescimento tumoral e angiogênese.

CONCLUSÃO

As análises das concentrações associadas de Firocoxib com a Doxorubicina revelaram redução nas frequências de tumores nos indivíduos cotratados com Firocoxib e DRX,

em relação ao tratamento isolado com DXR em células de *D. melanogaster*. Pode-se supor que o efeito modulador desse medicamento sobre a ação da Doxorubicina esteja relacionado à mecanismos secundários à inibição da Cicloxigenase 2, como indução de apoptose, redução da angiogênese e da progressão tumoral (metástases), processos esses favorecidos/estimulados pela COX-2.

Esta pesquisa traz indícios de que o uso de inibidores de COX-2 no tratamento ou controle tumoral pode trazer resultados promissores para o surgimento de uma nova modalidade terapêutica adjuvante. Entretanto, embora as pesquisas realizadas demonstrem boas perspectivas em relação ao Firocoxib, é necessário o aprofundamento de suas propriedades e efeitos biológicos para que se alcancem avanços mais satisfatórios; portanto, há um amplo campo de pesquisa envolvendo outras metodologias e organismos testes.

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGHEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 8195-8205, 2018.
- ALCALÁ, A. G. de S. *et al.* Assessment of the efficacy of firocoxib (Previcox®) and grapiprant (Galliprant®) in an induced model of acute arthritis in dogs. **BMC Vet. Res.**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 309, 2019.
- ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 9, n. 2, p.125-140, dez., 2012.
- ARAÚJO, W. M. *et al.* TGF- β acts as a dual regulator of COX-2/PGE2 tumor promotion depending of its cross-interaction with H-Ras and Wnt/ β -catenin pathways in colorectal cancer cells. **Cell Biol. Int.**, London, v. 45, n. 3, p. 662-673, 2021.
- ARENAS, C. *et al.* Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. **Vet. Rec.**, London, v. 179, n. 5, p. 125-125, 2016.
- BAIONI, E. *et al.* Estimating canine cancer incidence: findings from a population-based tumour registry in northwestern Italy. **BMC Vet. Res.**, [s.l.], v.13, n. 1, p. 203, 2017.
- BARDAGÍ, M.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. Immunohistochemical detection of COX-2 in feline and canine actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. **J. Comp. Pathol.** Liperpool, v. 146, n. 1, p. 11-17, 2012.
- BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, K. *et al.* Monitoring treatment response and metastatic relapse in advanced bladder cancer by liquid biopsy analysis. **Eur. Urol.**, Basel, v. 73, n. 4, p. 535-540, 2018. ISSN: 0302-2838.
- BURKETT, B. N. *et al.* Effects of firocoxib, flunixin meglumine, and phenylbutazone on platelet function and thromboxane synthesis in healthy horses. **Vet. Surg.**, Philadelphia v. 45, n. 8, p. 1087-1094, 2016.
- CARVALHO, M. I. *et al.* High COX-2 expression is associated with increased angiogenesis, proliferation and tumoural inflammatory infiltrate in canine malignant mammary tumours: a multivariate survival study. **Vet. Comp. Oncol.**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 619-631, 2017.
- CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 55, n. 2, p.1-17, 2018.

- CUNHA, R. M.C. *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in epithelial neoplasms and its relevance as a targeted therapy in dogs. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 1050-1052, 2016.
- DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol. Res.**, London, v. 112, p. 4-29, 2016.
- EKEN, J. C. J. *et al.* W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v.40, p. 277-282, 2002.
- FRANZONI, M. S. *et al.* Carcinoma mamário micropapilar metastático em cadela associado com sobrevivência de 306 dias. **Investigação**, [s.l.], v. 16, n. 1, 2017.
- FINOTELLO, R. *et al.* A retrospective analysis of chemotherapy switch suggests improved outcome in surgically removed, biologically aggressive canine haemangiosarcoma. **Vet. Comp. Oncol.**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 493-503, 2017.
- GRAF, U. The Actual Situation of SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) in *D. melanogaster*. **Environ. Mutagen.**, New York, v. 6, n. 2, 2006.
- GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* INTRODUÇÃO à genética. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- GROOT, D. J. A. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Boca Raton, v. 61, p. 52-69, 2007.
- GROSCH, S. *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2) – Independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 Inhibitor. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 98, p. 47-736, 2006.
- HOLLAND, B. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of three formulations of firocoxib in healthy horses. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 249-256, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Ministério da Saúde. **O Câncer e seus fatores de risco: o que a educação pode evitar?** 2.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2013. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/pdf_final_Cancerfatoresrisco.pdf. Acesso em: 07 jan. 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022. Acesso em: 12 de outubro de 2020.
- JAIN, S. *et al.* Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 68, n. 19, p. 7750-7759, 2008.
- JANG, T. J.; LEE, K.S. The expression of cyclooxygenases-2 and surviving in urinary bladder transitional cell carcinoma. **Korean J. Pathol.**, Bimonthly, v. 43, p. 11-296, 2009.
- JOEL, R. C. *et al.* Prevención de la preeclampsia desde la atención primaria con el uso de aspirina. In: **Morfovirtual 2020**. [s.l.; s.n.], 2020.
- KANG, J. *et al.* TFAP2C promotes lung tumorigenesis and aggressiveness through miR-183-and miR-33a-mediated cell cycle regulation. **Oncogene**, Basingstoke, v. 36, n. 11, p. 1585-1596, 2017. ISSN: 1476-5594.
- KANAOKA, S.; TAKAI, T.; YOSHIDA, K. Cyclooxygenase-2 and tumor biology. **Adv. Clin. Chem.**, New York, v. 43, p. 59-78, 2007.
- KENNEDY, B. M.; HARRIS, R. E. Cyclooxygenase and lipoxygenase gene expression in the inflammation of breast cancer. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 909-923, 2018.
- KNAPP, D. W. *et al.* A nonselective cyclooxygenase inhibitor enhances the activity of vinblastine in a naturally-occurring canine model of invasive urothelial carcinoma. **Bladder Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 241-250, 2016.
- KRZEŚLAK, A. K. Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors. **Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)**, Warszawa, v. 64, p. 490-503, 2010.
- LAVALLE, G. E. *et al.* Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Vet. Pathol.**, Basel, v. 46, p. 1275-1280, 2009.
- LEE, J. Y. *et al.* Expression of cyclooxygenase -2, P-glycoprotein and multi-drug resistance associated protein in canine transitional cell carcinoma. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 83, p. 6-210, 2007.
- LEÓN-ARTOZQUI, M.; MORCATE, A. Progresos en el tratamiento del dolor con Previcox (firocoxibe): historia y datos clínicos. **Consultation**, [s. l.], v.16, p. 41-45, 2008.
- LIMA, P. *et al.* Effects of a Carbonated Soft Drink on Epithelial Tumor Incidence in *Drosophila melanogaster*. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 6, p. 240-247, 2018.
- LUCAS, G. N. C. *et al.* Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Braz. J. Nephrol.**, São Paulo, v. 41, n. 1, p.124-130, mar. 2019.
- MACHADO, N. M. *et al.* Lack of mutagenic effect by multi-walled functionalized carbon nanotubes in the somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem.Toxicol.**, Oxford, v. 62, p. 355-360, 2013.
- MACPHERSON, M. L. *et al.* Evidence for anti-inflammatory effects of firocoxib administered to mares with experimentally induced placentitis. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, p. e13396, 2021.
- MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, [s.l.], v. 349, n. 6255, p. 1483-1489, 2015.
- MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, F. *et al.* A compendium of mutational cancer driver genes. **Nat. rev., Cancer**, London, v. 20, n. 10, p. 555-572, 2020.
- MILLANTA, F. *et al.* COX-2 Expression in Canine and Feline Invasive Mammary Carcinomas: Correlation with Clinicopathological Features and Prognostic Molecular Markers. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v. 98, p.115-120, 2006.
- MILLANTA, F. *et al.* Immunohistochemical Expression of COX-2, mPGES and EP2 Receptor in Normal and Reactive Canine Bone and in Canine Osteosarcoma. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v. 147, n. 2-3, p. 153-160, 2012.
- MORAIS, C. R. *et al.* Assessment of carcinogenic potential of soft drinks of cola, diet cola, orange and lemon, produced in the city of Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil. **Bioscience J.**, Uberlândia, v. 32, n. 4, 2016.
- NARDI, A. B. *et al.* Expresión de La ciclooxigenasa-2 en los carcinomas mamarios caninos primarios metastásicos y no metastásicos. **Arch. Med. Vet.**, Valdivia, v.45, p. 311-316, 2013.
- NARDI, A. B.; FERREIRA, T. M. M. R.; ASSUNÇÃO, K. A. Neoplasias Mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. (Eds.). **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. p. 499-516.
- NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents through the test for detection of epithelial tumor clones (Warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 3, 2015.
- NISHIYAMA, Y. *et al.* A human homolog of *Drosophila* warts suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **Febs Lett.**, Amsterdam, v. 459, p. 159-165, 1999.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Diagnóstico precoce do câncer salva vidas e reduz custos de tratamento**. 2019. Disponível

- em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5344:diagnostico-precoce-do-cancer-salva-vidas-e-reduz-custos-de-tratamento&Itemid=839. Acesso em: 09 set. 2020.
- ORSOLIN, P.; SILVA-OLIVEIRA, R.; NEPOMUCENO, J. Modulating effect of synthetic statins against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem.Toxicol.**, Oxford, v. 81, p. 111-119, 2015.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Folha informativa. **Câncer**. 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094, 2018. Acesso em: 12 out. 2020.
- PREVICOX®. São Paulo: Boehringer Ingelheim, 2016. Bula de remédio. Registro: 00014733/2016.
- SALVADO, M. D. *et al.* Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. **Trends Mol. Med.**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 233-243, 2012.
- SCHRODER, D. C. *et al.* Firocoxib on aqueous humor prostaglandin E 2 levels for controlling experimentally-induced breakdown of blood-aqueous barrier in healthy and Toxoplasma gondii-seropositive cats. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 1053-1058, 2016.
- SILVA-OLIVEIRA, R.; ORSOLIN, P.; NEPOMUCENO, J. Modulating effect of losartan potassium on the mutagenicity and recombinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 95, p. 211-218, 2016.
- SMYTH, E. M. *et al.* Prostanoids in health and disease. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 50, p. S423-S428, 2009.
- SOBOLEWSKI, C. *et al.* The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. **Int. J. Cell Biol.**, Oxford, v. 2010, 2010.
- SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, J. A. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 24 n. 2, p.96-102, 2003.
- SZWEDA, M. *et al.* Significance of cyclooxygenase-2 in oncogenesis. **J. Vet. Res.**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 215-224, 2019.
- TWOMEY, J. D.; BRAHME, N. N.; ZHANG, B. Drug-biomarker co-development in oncology—20 years and counting. **Drug Resist. Updat.**, Edinburgh, v. 30, p. 48-62, 2017. ISSN: 1368-7646.
- VIÇOSA, D. *et al.* *Drosophila melanogaster* como modelo alternativo para cursos experimentais ofertados a estudantes de escolas públicas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, [s.l.], v. 9, n. 2, 2017.
- VIJARNSORN, M. *et al.* The effectiveness of marine based fatty acid compound (PCSO-524) and firocoxib in the treatment of canine osteoarthritis. **BMC Vet. Res.**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 1-8, 2019.
- YUAN, A. *et al.* Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. **Int. J. Cancer**, New York, v. 115, n. 4, p. 545-555, 2005.
- ZHANG, X. *et al.* Suspension state promotes metastasis of breast cancer cells by upregulating cyclooxygenase-2. **Theranostics**, [s.l.], v. 8, n. 14, p. 3722-3736, 2018.

Submetido em: 23/02/2021

Aceito em: 30/06/2021