

Willy Antoni Abreu de Oliveira

Oxisteróis e cancro: o papel do *Liver X Receptor*

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Willy Antoni Abreu de Oliveira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010262, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão de outrem, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2014.

(Willy Antoni Abreu de Oliveira)

Aqui deixo os meus mais sinceros agradecimentos à Professora Dr.ª Maria Manuel Cruz Silva pelo auxílio e pela disponibilidade durante este semestre,

ao meu pai por ser um exemplo de que o esforço e o sacrifício são sempre recompensados,

aos Boinas resistentes com quem partilhei os melhores momentos da minha passagem pela FFUC,

à Magui que foi o porto de abrigo e a voz que sempre exigiu que acreditasse neste trabalho,

e às avós que, onde quer que estejam, tenho a certeza que, se pudessem, não faltariam à apresentação desta monografia.

Abreviaturas

- ABC** *ATP-binding Cassette transporter*, transportador ABC
- ACS** *American Cancer Society*, Sociedade Americana do Cancro
- ASC-2** *Activating signal co-integrator 2*, co integrador 2 do sinal de ativação
- AKT** proteína cinase B
- CDK** Cinase dependete de ciclinas
- COX2** Ciclo-oxigenase 2
- DBD** *DNA Binding Domain*, região de ligação ao DNA
- FBP** Frutose-1,6-difosfatase
- FXR** *Farnesoid X Receptor*, recetor X dos farnesóides
- G6Pase** Glicose-6-fosfatase
- IL-6** Interleucina-6
- iNOS** Sintetase induzível do óxido nítrico
- LBD** *Ligand Binding Domain*, região de ligação ao ligando
- LDL** Lipoproteínas de baixa densidade
- LDLR** *Recetor das LDL*
- LXR** *Liver X Receptor*, recetor X do fígado
- LXRE** *Liver X Receptor response element*, elemento de resposta ao LXR
- OE** Oxisteróis
- PEPK** Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
- PXR** *Pregnane X Receptor*, recetor X dos pregnanos
- RN** Recetor nuclear
- RNApol I** RNA Polimerase I
- Rb** Proteína do retinoblastoma
- ROS** Espécies reativas de oxigénio
- RXR** *Retinoid X Receptor*
- PI3K** Fosfatidilinositol 3-cinase
- Sirt I** Sirtuina I
- Skp2** *S-phase kinase-associated protein 2*, proteína cinase 2 associada à fase S
- SREBP1c** *Sterol Receptor element-binding protein 1c*
- N-CoR** *Nuclear Receptor co-repressor*, co-repressor de recetores nucleares

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura base da molécula de colesterol. ⁵ | 3 |
| Figura 2. Oxidação do colesterol. Via enzimática, não enzimática, produtos e enzimas envolvidas. ⁵ | 4 |
| Figura 3. Estrutura dos Liver X Receptors. | 7 |
| Figura 4. Ciclo de ativação/inibição do heterodímero LXR/RXR. | 8 |
| Figura 5. Agonistas sintéticos do LXR. ¹³ | 11 |
| Figura 6. Esquema simplificado dos checkpoints do ciclo celular. ³³ | 13 |
| Figura 7. Efeito da ativação do LXR no ciclo celular. A: Proporção de células em fase S B: comparação da proliferação em células I04-R1 e I04-R1 p27 knockout. ³⁶ | 14 |
| Figura 8 Efeitos dos oxisteróis tumorais sobre as células do sistema imune [48]. | 22 |

Sumário

O cancro é hoje um dos maiores desafios da medicina e a busca de novas abordagens terapêuticas para o seu tratamento é uma importante área do esforço científico mundial.

O *Liver X Receptor* tem-se assumido nos últimos anos como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de importantes cancros como o da próstata e o da mama que figuram entre os mais frequentes e letais. A ativação destes recetores em modelos celulares e animais de diversas neoplasias quer pelos oxisteróis, seus agonistas naturais, quer por agonistas sintéticos é capaz de interferir na proliferação e sobrevivência de tumores.

Os mecanismos implicados envolvem a homeostase do colesterol, a sinalização hormonal, a interferência no ciclo celular e na angiogénese.

Apesar dos resultados promissores, os efeitos adversos resultantes da ativação do LXR sugerem que ainda há muito trabalho a desenvolver para que possam ser encarados como alvos terapêuticos válidos e seguros em humanos.

Palavras-chave: cancro, oxisteróis, *liver X receptor*, ciclo celular, colesterol, homeostase, hormonas, angiogénese.

Abstract

Cancer is one of the main challenges of today's medical sciences and the research of novel therapeutic approaches for its treatment is one of the most important areas of the world scientific effort.

The liver X receptor rose in the last few years as a potential therapeutic target for the treatment of diverse cancers including prostate and breast cancers which are among the most frequent and most lethal. The activation of these receptors by either their natural ligands, oxysterols, or by synthetic ones has proved to be capable of arresting cancer cell proliferation and survival.

The LXR exerts its effect on cancer cells through diverse mechanisms, which include regulation of cholesterol metabolism, hormone signaling, cell cycle interference and disruption of angiogenesis.

Despite the promising results observed in recent years, the adverse effects of LXR activation suggest that there still is a long path to trail in order for LXR to become a valid target for the treatment of cancer in humans.

Keywords: cancer, oxysterols, liver x receptors, cell cycle, cholesterol, homeostasis, hormones, angiogenesis

Índice

| | |
|--|----|
| 1. O cancro e o recetor X do fígado | 2 |
| 2. Formação e distribuição dos oxisteróis | 3 |
| 3. Estrutura e mecanismo de ativação do recetor X do fígado..... | 6 |
| 4. Fisiologia do LXR..... | 8 |
| 5. Ligandos do LXR | 11 |
| 6. O papel do LXR no cancro..... | 12 |
| 6.1 LXR e o ciclo celular | 12 |
| 6.2 LXR e homeostase do colesterol..... | 16 |
| 6.3 O LXR e a proliferação dependente de hormonas..... | 18 |
| 6.4 LXR e a resposta imunitária | 21 |
| Conclusão..... | 23 |
| Bibliografia..... | 24 |

I. O cancro e o recetor X do fígado

O cancro é hoje um dos maiores desafios da medicina sendo que, nos Estados Unidos da América, 25% dos óbitos anuais estão ligados a algum tipo de neoplasia.¹ Dados da *American Cancer Society* (ACS) indicam que, em 2014, serão expectáveis nos E.U.A. cerca de 95000 novos casos de cancro do cólon e 50000 óbitos, 46000 novos casos de cancro do pâncreas dos quais 39000 serão fatais, 235000 neoplasias da mama com cerca de 40000 mortes e 230000 casos de cancro da próstata conduzindo a 29500 mortes.¹ No total são projetados pela ACS 1665540 novos casos de cancro e 585720 óbitos para este ano nos E.U.A..¹

O cancro tem também um impacto considerável na economia global devido à sua elevada morbidade e consequente perda de produtividade conduzindo, não só à perda de milhões de vidas, mas também ao gasto, em 2008, de cerca de 1.5% do produto interno bruto mundial, correspondendo a 895 biliões de dólares.² É importante referir que nestes valores não estão incluídos os custos médicos, hospitalares e terapêuticos associados à doença.

Por estes motivos, são investidos anualmente milhões de euros em investigação científica relacionada com o cancro. Em 2004/2005 foram investidos a nível mundial cerca de 14000 milhões de euros na busca de novos conhecimentos sobre o cancro e de novas moléculas com propriedades terapêuticas ou profiláticas.³

A carcinogénese é, ao mesmo tempo que um problema assustadoramente nefasto para a vida, um admirável e complexo processo fisiopatológico que, apesar dos esforços da comunidade científica, continua ainda envolto em muitos mistérios.

De uma forma geral, a carcinogénese é um processo por etapas induzido por fatores ambientais, genéticos e metabólicos, entre outros, cujo desenvolvimento implica a aquisição, por parte das células neoplásicas, de uma série de características fundamentais. Hanahan et al. descreve estas características como oito capacidades biológicas das células tumorais que permitem o processo multi-etapa do desenvolvimento tumoral. Estas incluem a manutenção da sinalização da proliferação celular, a evasão dos supressores da proliferação, a resistência aos mecanismos de morte celular, a aquisição de imortalidade replicativa, a indução da angiogénese e invasão de novos tecidos (metástase), a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imunitário.⁴

Subjacente a estas habilidades das células tumorais está a instabilidade genómica que permite a variabilidade génica por trás da aquisição destas.

Nos últimos anos, o aumento do conhecimento sobre a forma como o LXR controla vários processos fisiológicos, nomeadamente a proliferação celular e o metabolismo energético, tem feito com que se questione a sua viabilidade como potencial alvo terapêutico no combate a vários tipos de neoplasias, nomeadamente as da próstata, mama, ovário, cólon entre outras. Estudos realizados com linhas celulares de vários tipos de neoplasias têm sustentado a hipótese de que o LXR poderá ser um alvo válido e promissor no futuro.

Ao mesmo tempo, o estudo dos agonistas naturais destes recetores, os oxisteróis, vão permitindo elucidar o potencial do desenvolvimento de moduladores sintéticos seletivos do LXR, com especial atenção para interferência dos efeitos resultantes da ativação do recetor.

2. Formação e distribuição dos oxisteróis

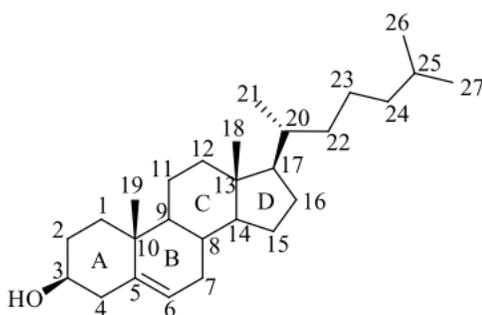


Figura 1. Estrutura base da molécula de colesterol.⁵

O colesterol e os fitosteróis são os principais esteroides dos animais e das plantas respetivamente. A partir destes, são obtidos nos organismos, por vias enzimáticas ou não enzimáticas, produtos resultantes da sua oxidação que são designados por oxisteróis e oxifitosteróis. Estes compostos mantêm a estrutura básica do colesterol, que é constituída por uma região policíclica com 4 anéis, uma função hidroxilo inserida no C-3 do anel A desta região e, por fim, uma cadeia lateral hidrocarbonada.⁵ De uma forma geral a oxidação da molécula de colesterol reduz drasticamente o seu tempo de meia vida e direciona estas novas moléculas, consideravelmente mais polares que a molécula original, para vias excretórias ou para posteriores oxidações conduzindo à formação de ácidos biliares hidrossolúveis.⁶ Este processo torna ainda as novas moléculas mais permeáveis através das membranas biológicas, revelando-se a sua produção como uma estratégia para a eliminação do colesterol. Além da via biossintética, os oxisteróis podem ter origem exógena, essencialmente em alimentos ricos em colesterol ou fitosteróis, em especial aqueles que

foram sujeitos a tratamentos térmicos na presença de oxigénio ou que tenham sido armazenados durante muito tempo sob exposição solar.⁷

Resumidamente os oxisteróis dividem-se em duas grandes categorias: aqueles que são oxigenados no núcleo esteroide e aqueles que são oxigenados na cadeia lateral sendo que geralmente, salvo algumas exceções, os primeiros têm origem não enzimática e os segundos têm origem enzimática.⁸

Os oxisteróis de origem não enzimática são resultado do ataque oxidativo de espécies reativas de oxigénio (ROS) ao hidrogénio alílico em C-7. Este hidrogénio é abstraído da molécula de colesterol originando um radical centrado no carbono que inicia uma reação em cadeia de autooxidação originando o 7 α ou 7 β -hidroperoxicolesterol:⁷

- I) $\text{Col-H} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{Col}\cdot + \text{RH}$
- II) $\text{Col}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{Col-OO}\cdot$
- III) $\text{Col-OO}\cdot + \text{Col-H} \rightarrow \text{Col-OOH} + \text{Col}\cdot$

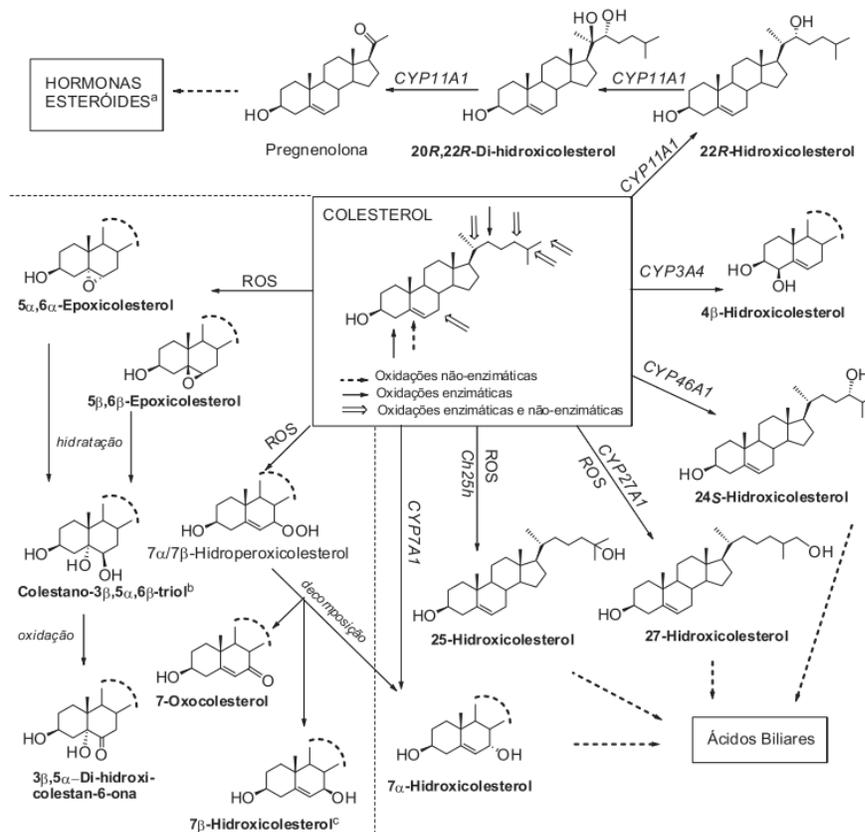


Figura 2. Oxidação do colesterol. Via enzimática, não enzimática, produtos e enzimas envolvidas.⁵

Estes podem posteriormente continuar o processo oxidativo não enzimático ou sofrer um processo de decomposição em derivados 7-oxocholesterol ou 7 α ou 7 β -hidroxicolesterol (vide figura 2.) que representam os oxisteróis de origem não enzimática mais abundantes nos tecidos.⁸

Os oxisteróis mais importantes do ponto de vista fisiológico são resultado da oxidação via hidroxilases mitocondriais e do retículo endoplasmático pertencentes à família do citocromo P450.⁹ Além do 7 α e 7 β -hidroxicolesterol, também produzidos pela via não enzimática, destacam-se os oxisteróis de cadeia lateral 27-, 24(S)- e 25-hidroxicolesterol. A figura 2. apresenta resumidamente as duas vias de oxidação de colesterol, os seus produtos e as enzimas envolvidas.

Certos oxisteróis são específicos de determinados tecidos uma vez que as enzimas responsáveis pela sua produção têm uma localização específica. O 24(S)-hidroxicolesterol, por exemplo, é produzido pelo CYP46A1 que se encontra no retículo endoplasmático dos neurónios.¹⁰

Desde que foram descobertos pela primeira vez, em 1966, em placas ateroscleróticas, têm sido atribuídas aos oxisteróis um número crescente de funções fisiológicas, nomeadamente na regulação do metabolismo do colesterol. O colesterol é um componente crucial das membranas celulares dos eucariotas contribuindo para a manutenção das suas características funcionais como sejam a fluidez e permeabilidade. A acumulação de colesterol livre nas células é prejudicial para estas acabando ele próprio por autorregular a sua síntese *in vivo*. Como referido anteriormente, os oxisteróis constituem uma via de eliminação do colesterol excessivo sendo moléculas intermediárias da sua conversão a ácidos biliares e posterior eliminação. Além desta via de regulação da homeostase deste lípido, os oxisteróis inibem a enzima fulcral da síntese *in vivo* do colesterol, a hidroximetilglutaril coenzima A-redutase (HMG-CoA) sendo que alguns oxisteróis são mesmo capazes de promover a sua degradação.^{5,11} Entre outros mecanismos de regulação da homeostase do colesterol, um dos mais estudados e compreendidos é o transcricional que exerce através da sua ligação a recetores específicos que estimulam a transcrição de importantes genes para a manutenção de níveis de colesterol favoráveis à saúde celular. Um desses recetores é o LXR e a sua importância na homeostase do colesterol será abordada nesta monografia.

Aos oxisteróis são também atribuídas implicações nos mecanismos de diversas patologias sendo relacionado com o *onset* e progressão da aterosclerose, doenças neurodegenerativas e diabetes bem como propriedades citotóxicas, oxidativas e pró-inflamatórias.

3. Estrutura e mecanismo de ativação do recetor X do fígado

O LXR é uma proteína descoberta na década de 90, pertencente à família dos recetores nucleares (RN) que consiste de um grupo de quarenta e oito proteínas intracelulares responsáveis pela regulação dos mais variados processos biológicos mediante a indução ou repressão da transcrição génica.

Existem duas isoformas do LXR codificadas por genes diferentes que se encontram em cromossomas distintos¹². São elas o LXR α e o LXR β e diferem entre si em cerca de vinte por cento dos seus aminoácidos¹³ sendo que apresentam a mesma estrutura modular que, na verdade, é característica da maioria dos RN. Apresentam contudo uma diferença considerável ao nível da sua expressão celular. O LXR α é bastante expresso em tecidos importantes para a regulação do metabolismo dos lípidos como sejam o fígado, o intestino delgado, os rins, o baço, o tecido adiposo e ainda nos macrófagos, enquanto que o LXR β é expresso, de um modo geral, em todo o organismo.¹³

A maioria dos RN exerce o seu efeito sobre a transcrição dos genes em resposta a pequenas moléculas lipofílicas como os esteroides, ácidos biliares, hormonas tiroideias e metabolitos do colesterol.¹⁴ Aquando da sua descoberta o LXR fora classificado como recetor órfão, contudo hoje sabe-se que os seus agonistas endógenos são os oxisteróis, formas oxidadas do colesterol e subprodutos do metabolismo deste lípido.

A molécula do LXR é constituída fundamentalmente por 4 regiões.^{12,13,15}

- i) Um terminal amina onde se encontra uma função de ativação AFI independente de ligandos que permite o recrutamento de co-activadores;
- ii) Uma região que liga ao DNA (*DNA binding domain*) com dois “dedos” de zinco.

- Esta região reconhece e liga ao *Liver X Receptor Response Element* (LXRE; elemento de resposta ao LXR). Além disso, parte desta região assume também importância na dimerização com o *Retinoid X Receptor*;
- iii) Uma região hidrofóbica de articulação que permite o recrutamento de co-repressores na ausência de ligando;
 - iv) Uma região com terminal carboxilo que contém o *Ligand-Binding Domain* necessário para a dimerização com o RXR e uma função de transativação AF2 responsável pela estimulação da transcrição em resposta à ligação do agonista do recetor.

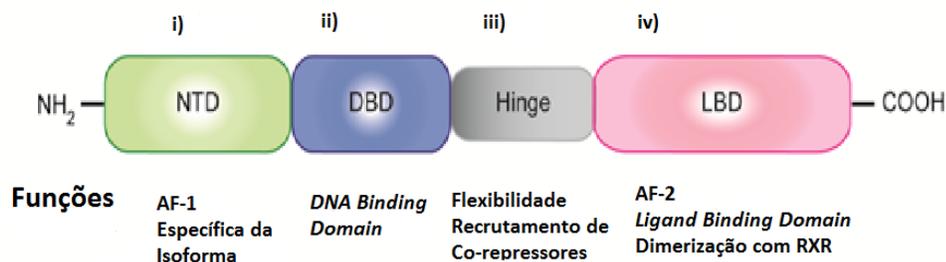


Figura 3. Estrutura dos Liver X Receptors.

O LXR forma um heterodímero com o RXR, o recetor do ácido 9-cis retinóico, sendo este processo fundamental para a regulação da expressão génica pelo LXR. Este heterodímero é considerado permissivo uma vez que pode ser ativado tanto pelo ligando do LXR como pelo ligando do RXR, sendo contudo a resposta mais intensa quando estão presentes os agonistas de ambos os recetores.¹³ O complexo LXR/RXR encontra-se ligado de forma independente de ligandos ao LXRE que se encontra na região promotora dos genes alvo e que consiste de duas sequências hexaméricas idênticas de nucleótidos separadas por um espaçador de outros quatro nucleótidos (AGGCTAnnnnAGGCTA).¹⁶

Na ausência dos seus ligandos o LXR/RXR recruta co-repressores como o *Nuclear Receptor co-repressor* (N-CoR; co-repressor de RN)¹⁷ inibindo ativamente a transcrição dos genes. Quando o agonista do LXR ou do RXR se torna disponível, a sua ligação ao heterodímero induz a dissociação dos co-repressores levando à estimulação da transcrição dos genes alvo. A ligação de oxisteróis ao LXR induz modificações estruturais do recetor, nomeadamente ao nível do terminal carboxilo forçando a libertação dos co-repressores. Outras

alterações conformacionais induzem o recrutamento de co-ativadores como o *activating signal co-integrator 2* (ASC-2; co integrador 2 do sinal de ativação) na função AF-2 do LBD capazes de potenciar a transativação génica pelo complexo LXR/RXR.

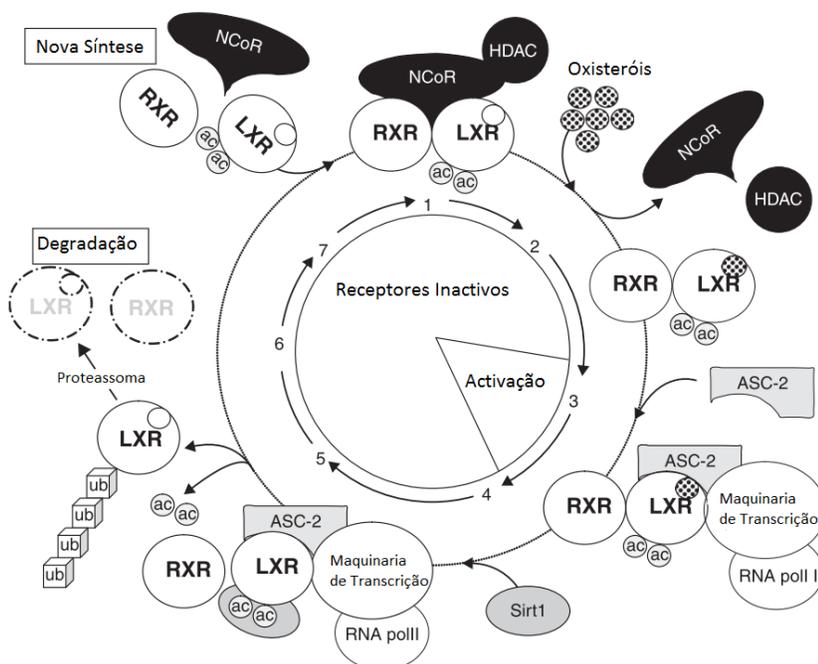


Figura 4. Ciclo de ativação/inibição do heterodímero LXR/RXR.

Posteriormente ao recrutamento do RNA polimerase I (RNAPol I) e demais maquinaria celular de transcrição, o LXR sofre uma desacetilação induzida pela sirtuina I (Sirt I) que é seguida pela degradação proteolítica pela via da ubiquitina-proteassoma.

A expressão do recetor LXR α nos tecidos é autorregulada¹⁸; isto porque o gene que o codifica contém um LXRE que é ativado por ambas as isoformas do LXR tendo sido demonstrado um aumento da expressão do recetor em resposta a agonistas tanto sintéticos como naturais.

4. Fisiologia do LXR

O desenvolvimento de murganhos deficientes em LXR e de agonistas sintéticos do recetor permitiu descobrir novas e inesperadas funções fisiológicas deste¹⁷, sendo conhecidos mais de 2000 genes diferentes regulados pelo LXR.¹⁹ Hoje atribui-se-lhe funções na homeostase do colesterol, excreção de ácidos biliares, homeostase da glicose, metabolismo dos lípidos,

imunidade e processo inflamatório, exercendo ainda um papel ao nível da função neurológica¹⁵. A atividade do LXR representa uma área de estudo de elevado interesse uma vez que tem influência sobre diversos e importantes mecanismos fisiopatológicos, assumindo assim um enorme potencial como novo alvo terapêutico para diversas patologias.¹⁴

Peet et al. foi responsável pela descoberta da importância do LXR na homeostase do colesterol no final da década de 90. Para tal, estudou o efeito de uma dieta rica em colesterol em murganhos com deficiente expressão do recetor LXR α . Os resultados evidenciaram que, ao contrário dos murganhos cuja dieta fora normal, ou com baixo teor de colesterol, aqueles cuja dieta continha grandes quantidades do lípido não o convertiam em ácidos biliares conduzindo à acumulação de grandes quantidades de colesterol no fígado, revelando assim o LXR α como o principal sensor do colesterol proveniente da dieta.²⁰

A ativação do LXR é, de facto, preponderante para a regulação do transporte reverso do colesterol, um processo fisiológico pelo qual o colesterol é transportado dos tecidos para o fígado onde é então processado para ser excretado²¹, conduzindo ainda à inibição da síntese endógena deste lípido,^{12,22} bem como à sua conversão em ácidos biliares. O LXR exerce estes efeitos mediante a transativação, entre outros, dos genes dos transportadores *ATP-binding cassette A1* (ABCA1) e *G1* (ABCG1), responsáveis pelo efluxo do colesterol intracelular, o primeiro passo do transporte reverso do colesterol, assim como dos transportadores ABCG5 e ABCG8 a nível intestinal e hepático²³ cuja função se prende com a promoção da excreção biliar e fecal do colesterol exógeno absorvido.²⁴ Naik et al. demonstrou esta propriedade do LXR injetando macrófagos carregados com colesterol marcado com trítio, em murganhos que foram posteriormente tratados durante dez dias com GW3965, um agonista sintético do LXR, verificando que, comparativamente com o grupo de controlo, estes animais excretaram uma quantidade consideravelmente superior de ácidos biliares.

Quanto ao metabolismo da glicose, a importância do LXR prende-se com a ativação da transcrição dos transportadores GLUT1 e GLUT4^{25,26} responsáveis pelo *uptake* desta a partir da corrente sanguínea para os tecidos onde posteriormente entra na via glicolítica para a produção de energia. A nível hepático, a ativação do LXR conduz à regulação negativa (*down-regulation*) de importantes enzimas da gliconeogénese como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPK), responsável pela conversão do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, frutose-1,6-difosfatase (FBP), que converte a frutose-1,6-difosfato em frutose-6-fosfato e a glicose-6-fosfatase (G6Pase)²⁷ que

é responsável pela remoção do fosfato da glicose-6-fosfato no último passo da via neoglicogénica.

Por outro lado, o LXR do tecido pancreático é responsável pela estimulação da secreção de insulina. Em células do ilhéu de Langerhans incubadas com o agonista sintético T0901317 do LXR é evidente o aumento da secreção de insulina induzida pela glicose.²⁸

Estas propriedades do LXR sugerem que este poderá ser um alvo para o tratamento da *Diabetes Mellitus* e de facto, a estimulação do LXR por agonistas sintéticos em modelos animais de diabetes do tipo 2 demonstrou uma melhoria da tolerância à glicose e da resistência à insulina²⁹ e um aumento da sensibilidade periférica à insulina, tendo contudo uma atividade adipogénica.³⁰

Ao nível do sistema imunitário e da resposta inflamatória, o LXR foi identificado como fator de transcrição de genes anti-inflamatórios e de reguladores da resposta imune inata e adaptativa.¹⁴ Joseph et al. demonstrou que os macrófagos de murganhos deficientes em LXR sofrem um processo acelerado de apoptose durante uma infeção com *Listeria monocytogenes* (LM) e *clearance* bacteriana anormal como resultado de uma perda do fator antiapoptótico SP α . O seu estudo ligou o LXR ao controlo de vias de sinalização relacionadas com a regulação de genes responsáveis pela *clearance* de elementos patogénicos e a manutenção da resposta imune, nomeadamente na sobrevivência dos macrófagos em infeções bacterianas com LM³¹. Noutro trabalho, Joseph et al. demonstra a capacidade inibitória *in vitro* do LXR sobre a expressão de mediadores da inflamação como a sintetase induzível do óxido nítrico (iNOS), a ciclo-oxigenase 2 (COX2) e a interleucina-6 (IL-6) em resposta a infeções bacterianas ou estimulação com lipopolissacáridos bacterianos. Ainda no mesmo trabalho, demonstra que agonistas sintéticos do LXR são capazes de reduzir, *in vivo*, a inflamação em modelos murinos de dermatite de contacto.³²

No fígado, a ativação do LXR α induz uma série de proteínas relacionadas com o metabolismo dos lípidos.³³ Entre elas estão o *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP1c), a acetil-CoA carboxilase e a ácido-gordo sintase. Estas são responsáveis por um aumento de triglicéridos no fígado.²² A ativação do LXR pelo T0901317 conduz a um estado de esteatose e hipertrigliceridémia devido à estimulação da síntese *de novo* de ácidos gordos.^{22,34} É importante referir que o efeito lipogénico produzido por estes agonistas de síntese é superior

ao provocado pelos oxisteróis resultantes do excesso de colesterol, uma vez que este próprio efeito inibe a ativação proteolítica do precursor da SREBP1c.¹³ Este efeito lipogénico aumentado, indesejado em muitas situações, é claramente uma prioridade a considerar no desenvolvimento de agonistas sintéticos do LXR.

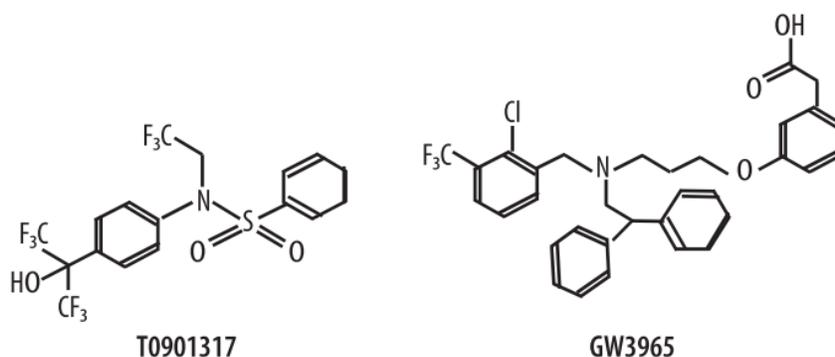


Figura 5. Agonistas sintéticos do LXR.¹³

5. Ligandos do LXR

Como mencionado anteriormente, os oxisteróis são os ligandos naturais por excelência do LXR. Contudo, a sua grande flexibilidade estrutural permite-lhe acomodar moléculas bastante distintas em tamanho e forma no seio do seu LBD. A interação ligando-recetor mais importante para a fixação do ligando no LBD é o estabelecimento de pontes de hidrogénio nos aminoácidos His421 no LXR α e His435 no LXR β localizados nas hélices 10 e 11, respetivamente, de cada isoforma, contudo outras interações são necessárias para a estabilização do complexo.³⁵

Dos oxisteróis endógenos aqueles que se ligam mais fortemente ao LXR são o 22(R)-hidroxicolesterol, 20(S)-hidroxicolesterol, 7 α -hidroxicolesterol e o 24(S)-hidroxicolesterol (figura 2.). Aparentemente a oxigenação do anel B do núcleo esteroide confere especificidade para a isoformas alfa do recetor e a oxigenação da cadeia lateral resulta numa maior afinidade e potência de ativação.¹⁵ Por sua vez, o 5 α ,6 α -epoxicolesterol exerce um efeito antagonista sobre o LXR e está inclusivamente relacionado com o *onset* da doença aterosclerótica.³⁶ Outras moléculas endógenas estruturalmente distintas dos oxisteróis são capazes de ativar ou inibir o recetor. Alguns exemplos são o desmosterol e os ácidos biliares 6 α -hidroxilados, como ativadores e os ácidos gordos polinsaturados como inativadores.³⁶

A semelhança entre as duas isoformas no LBD é muito grande sendo que diferem apenas em dois resíduos de aminoácidos.³⁵ Juntamente com a flexibilidade do LBD será de esperar que exista uma possibilidade de interação do recetor não só com os oxisteróis mas também com análogos oxigenados de origem vegetal e microbiana. De fato, foram recentemente isoladas moléculas de origem vegetal e fúngica, capazes de modular o LXR, apresentando uma grande diversidade química. Entre elas figuram o sitosterol e o sitostanol, diversos diterpenos, o ácido acantóico (*rollinia*), o ácido podocárpico, a ginosaponina TRI (*Gynostemma pentaphyllum*) e o honokiol (*Magnolia abovata*).³⁶

Vários moduladores sintéticos têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos. Apesar de muitos terem demonstrado grande afinidade para o recetor e potência consideravelmente superior aos agonistas naturais, traduzindo-se inclusivamente em efeitos positivos sobre diversos modelos celulares e murinos de cancro, nunca nenhum deles conseguiu avançar além da fase I de ensaios clínicos.³⁵ O motivo principal é a ativação indiscriminada de ambas as isoformas do LXR. A forte ação lipogénica resultante da ativação do LXR α traduz-se em esteatose hepática, altos níveis de colesterol LDL circulantes e aumento do tamanho dos adipócitos.

Um problema importante relacionado com a especificidade dos agonistas do LXR para cada uma das isoformas do recetor e o tratamento do cancro prende-se com algumas evidências de que o LXR α será essencial na atividade antitumoral³⁷. Assim torna-se imperioso, não só a busca de agonistas específicos para isoformas β , isto provando-se que a sua ativação seletiva é suficiente, mas também o desenvolvimento de agonistas capazes de ativar o LXR em tecidos específicos.

6. O papel do LXR no cancro

6.1 LXR e o ciclo celular

Existe uma profunda relação entre o ciclo celular e o desenvolvimento e progressão de neoplasias. Durante o ciclo celular ocorrem alterações relevantes do metabolismo e do funcionamento interno da célula com vista à sua preparação para a fase final do ciclo, a mitose, em que esta se divide em duas células individuais. De uma forma muito sintética, o ciclo celular é composto por quatro fases: G₁, S, G₂ e M. Durante a fase G₁ a célula aumenta a síntese

proteica a fim de construir a maquinaria molecular necessária à replicação do DNA que ocorre na fase seguinte, a fase S. Posteriormente, já na fase G_2 , a célula aumenta novamente a síntese proteica, reproduzindo organelos e demais constituintes com vista à preparação da fase M, a mitose.

Dada a sua importância constitutiva para a vida, o ciclo celular é alvo de complexos mecanismos de regulação e controlo. A passagem da célula de uma determinada fase do ciclo para a seguinte é controlada por mecanismos de verificação

(*checkpoints* – figura 5) que certificam que as tarefas dessa fase foram concluídas corretamente e se as condições do meio intracelular e extracelular são favoráveis à continuação do ciclo.³⁸ Dois grupos de moléculas importantes na regulação do ciclo celular são as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDK), que formam complexos responsáveis por sinalizar a entrada e progressão das células nas diversas fases do ciclo. As CDK são apenas ativas quando formam um complexo com as ciclinas. Logo, a concentração e disponibilidade destas influenciam a atividade das primeiras. Além disso a sua atividade é também controlada por uma série de inibidores das CDK (p15, p16, p18, p19, p21, p27 e p53).³⁸

É fácil perceber que a alteração destes mecanismos de controlo podem conduzir as células à aquisição de um potencial neoplásico, sendo comum encontrar alguns destes reguladores alterados em células tumorais. A *S-phase kinase-associated protein 2* (Skp2), relacionada com degradação do inibidor p27 das CDK encontra-se muitas vezes sobre-expressa em muitas neoplasias.³⁹ O aumento da degradação deste inibidor relaciona-se com a proliferação descontrolada e a progressão dos tumores.⁴⁰

Diversos estudos científicos realizados ao longo da última década têm vindo a estabelecer uma relação causal entre a ativação do LXR e o bloqueio da proliferação de diversas linhas celulares neoplásicas humanas quer *in vitro* quer *in vivo*, nomeadamente em murganhos



Figura 6. Esquema simplificado dos checkpoints do ciclo celular.³³

transplantados com tumores. Atualmente considera-se que parte da atividade anti-tumoral do LXR é mediada pela regulação da transcrição dos genes de alguns dos controladores do ciclo celular anteriormente referidos.

Os trabalhos de Nguyen-vu et al. demonstraram que, em 4 linhas celulares de cancro, a ativação do LXR estimula a transcrição de 23 genes relacionados com o metabolismo do colesterol e dos lípidos e reprime a transcrição de outros 60 relacionados com a regulação do ciclo celular.¹⁹

A ativação do LXR com agonistas de síntese e com os oxisteróis 24(S)-hidroxicolesterol e 22(R)-hidroxicolesterol demonstrou importantes efeitos antiproliferativos em células do adenoma da próstata (quer dependente de androgénios como independente de androgénios).^{41,42} O efeito observado foi dependente da dose sendo que o agonista sintético

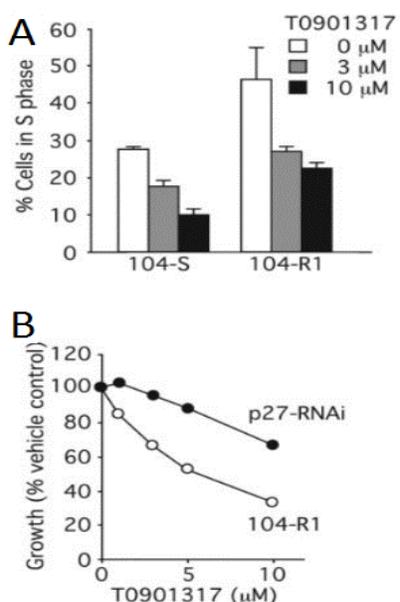


Figura 7. Efeito da ativação do LXR no ciclo celular. A: Proporção de células em fase S B: comparação da proliferação em células 104-R1 e 104-R1 p27 knockout.³⁶

não esteroide T0901317 (figura 5.) demonstrou um efeito mais intenso que os oxisteróis, provavelmente devido à sua maior afinidade para o LXR. Fukuchi et al. evidenciou, recorrendo à citometria de fluxo, que a activação do recetor aumentava o número de células “bloqueadas” na fase G1 de uma forma proporcional à diminuição da população na fase S (Figura 6. A). Simultaneamente verificou-se um aumento significativo da expressão do inibidor p27 das CDK embora análise por PCR tenha mostrado que o mRNA desta proteína não estivesse aumentado, sugerindo um mecanismo pós-transcricional de indução. Uma diminuição da expressão da Skp2 em células tratadas com T0901317 deverá ser a responsável pelo aumento da p27 uma vez que a primeira, como referido anteriormente, está envolvida no processo de degradação via ubiquitina-proteassoma da segunda.⁴² O *knockout* do gene do p27 torna as células resistentes ao efeito do T090137,⁴⁰ demonstrando o

envolvimento crucial desta proteína no bloqueio do ciclo celular uma vez que estas células eram mais resistentes ao efeito anti-proliferativo do T0901317 (Figura 6. B).

Além das linhagens LNCaP, Fukushi et al. procurou avaliar a capacidade dos agonistas do LXR noutros tipos de células cancerígenas, nomeadamente da mama (MCF-7 e MDA-MB435S)

que acabaram por se revelar relativamente insensíveis ao T0901317. Depois de verificar que, nas linhagens mais sensíveis, a expressão do LXR era maior, recorrendo a técnicas biotecnológicas induziu as células MDA-MB435S, as com menor sensibilidade ao T0901317, a expressar o LXR α verificando então que a sensibilidade destas ao agonista de síntese aumentava, corroborando a hipótese de que o trio LXR,Skp2 e p27 é capaz de inibir a progressão tumoral.

Aparentemente há uma relação entre a atividade lipogénica do LXR e a sua capacidade inibitória da proliferação celular.³⁴ Kim et al. estudou a relação entre o LXR e a proliferação celular incubando várias linhas celulares (RWPE1 – próstata; THP1 – monócitos leucémicos do sangue periférico; SNU16 – carcinoma gástrico; LNCaP – adenocarcinoma da próstata; HepG2 – carcinoma hepático; PC3 – adenocarcinoma da próstata de grau IV) com o T0901317 e o GW3965 tendo verificado que, à semelhança dos resultados de Fukushi et al., em algumas delas ocorria uma supressão da proliferação dependente da dose e o mesmo bloqueio do ciclo celular em G₁, noutras não era verificável qualquer efeito.

A discrepância no efeito da ativação do LXR nas diferentes linhagens celulares está relacionada com os diferentes níveis de expressão dos genes alvo do recetor nestas. Nas linhagens celulares onde a proliferação foi fortemente reduzida verificou-se um aumento da expressão de genes relacionados com o metabolismo do colesterol (ABCA1, ABCG1) e com o metabolismo dos lípidos (SREBP1c e FAS). Contudo, naquelas em que a proliferação não foi significativamente afetada, apesar de haver um aumento considerável do mRNA dos genes ABCA1 e ABCG1, não foram verificadas alterações ao nível do SREBP1c e do FAS sugerindo que o efeito antiproliferativo estará mais relacionado com a atividade do LXR sobre o metabolismo lipídico do que sobre o metabolismo do colesterol. O silenciamento do RNA do FAS permitiu às células retomar a proliferação.³⁴ Foi inclusivamente demonstrado que, nas células sensíveis a síntese de ácidos gordos estava aumentada sendo que existe uma relação entre a elevação da quantidade de ácidos gordos livres nas células e a probabilidade destas sofrerem apoptose.^{43,44} Contudo esta relação entre a atividade lipogénica e antiproliferativa do LXR não está definitivamente estabelecida. Os trabalhos de Vedin et al. parecem apontar no sentido contrário. O efeito antiproliferativo do LXR parece ser independente do lipogénico em células do cancro da mama sendo, no entanto, fortemente dependente da via de sinalização dos estrogénios.⁴⁵

A ativação do LXR em células tumorais parece ainda ser capaz de bloquear o ciclo celular interferindo com a via de sinalização das ciclinas. Em células LNCaP com ativação dos LXR os níveis da ciclina A determinados por *microarrays* de DNA complementar e PCR quantitativo em tempo real encontram-se diminuídos³⁴ muito provavelmente por meio do aumento do p27 resultante da diminuição da expressão da Skp2.

Em células do músculo liso a ativação do LXR conduziu à inibição da fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb) que funciona como um dos principais reguladores da transição da célula da fase G₁ para a fase S.⁴⁶

6.2 LXR e homeostase do colesterol

Um dos principais requisitos à progressão de um tumor é o acesso aos “tijolos” com que constrói as suas “paredes”, isto é, as moléculas com que sustentam o seu crescimento e proliferação. Uma das mais importantes matérias-primas para a progressão de um tumor é o colesterol dado o seu relevante papel na constituição das membranas celulares, havendo mesmo uma relação entre a hipercolesterolemia e o desenvolvimento de determinados cancros como, por exemplo, o da próstata.⁴⁷

Foi aqui discutida a capacidade do LXR de influenciar o metabolismo do colesterol, aumentando a expressão dos genes responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, a conversão deste em ácidos biliares e a inibição da sua síntese *de novo*. Será portanto de esperar que a ativação do recetor nas células cancerígenas possa ter um efeito sobre a capacidade destas proliferarem privando-as desse importante constituinte da parede celular.

Pommier et al. estabeleceu, em 2013, uma relação entre o LXR, uma dieta rica em colesterol e o cancro em modelos murinos ao demonstrar que em células epiteliais da próstata de murganhos *knockout* para ambas as isoformas do LXR, a histologia da próstata revelava uma desorganização do epitélio semelhante à neoplasia intraepitelial prostática de grau II.⁴⁸ A ausência de recetores LXR impede as células de responder adequadamente à acumulação de colesterol no compartimento intracelular e foi ainda detetado um aumento do recetor das LDL (LDLR) acompanhada por uma diminuição da expressão de um gene alvo do LXR que codifica o *inducible degrader of LDL Receptor*, IDOL, uma proteína responsável pela degradação via ubiquitina-proteassoma do LDLR.

Pommier et al. (2013) estabeleceu ainda uma relação entre a dieta hipercolesterolémica e a repressão de dois importantes genes supressores de tumores que se encontram frequentemente desregulados em câncros da próstata, o *Nkx3.1* e o *Msmb*. Estes dois genes são controlados pela *EZH2*. Nos murganhos *LXR knockout* esta enzima encontra-se particularmente sobre-expressa. Numa análise retrospectiva de *microarrays* de DNA de doentes de cancro da próstata estabeleceram uma relação entre a expressão diminuída do *LXRβ* e o aumento da expressão da *EZH2*.

Um importante papel do colesterol nas membranas biológicas é a manutenção da estrutura e função dos *rafts* lipídicos, regiões específicas da membrana celular envolvida nos processos de sinalização⁴⁹ aparentando ainda influenciar a distribuição de proteínas membranares que povoam os *rafts*.⁵⁰ Uma das proteínas que normalmente se encontra nos *rafts* lipídicos é a proteína cinase B (AKT), que é ativada por fosforilação mediada pelo colesterol, e está envolvida na proliferação e sobrevivência celular prevenindo a apoptose. Elevada quantidade de AKT fosforilada está frequentemente relacionada com a resistência à quimioterapia em câncros da próstata.⁵⁰ Pommier et al. (2013) estudou o efeito do tratamento de células LNCaP com o agonista T09010317 do LXR sobre a via de sobrevivência celular mediada pela AKT. Os seus trabalhos permitiram concluir que ativação do LXR estimula a apoptose pela via canónica (verificado pela observação de uma acumulação de caspases clivadas) e pela redução da fosforilação da AKT. Uma justificação para a redução da fosforilação da AKT e consequente indução da apoptose é o aumento da expressão do *ABCG1* e consequente efluxo do colesterol contribuindo assim para a diminuição do tamanho e número dos *rafts*. Também no melanoma, o mais maligno e quimiorresistente dos câncros da pele, o LXR representa um promissor alvo terapêutico. A ativação do LXR neste tipo de cancro induz a morte das células cancerígenas pela via apoptótica canónica.⁵¹

No glioblastoma, um dos tipos de tumores cerebrais mais comuns e mais resistentes à quimio e radioterapia, o LXR poderá representar uma valiosa nova abordagem terapêutica. Neste tipo de tumor são características mutações génicas responsáveis pela manutenção da síntese lipídica *de novo* essencial ao crescimento do mesmo. Este efeito lipogénico é dependente da ativação do *SREBP1c* mediada pelo fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) que se encontra hiperativo em 90% dos glioblastomas.⁵² A hiperativação desta enzima é responsabilidade de uma mutação no gene do recetor do fator de crescimento epitelial (EGFR), nomeadamente a mutação

EGFRvIII, que se encontra amplificado. Esta mutação apresenta um certo grau de ativação constitutiva e está geralmente associada a um prognóstico clínico muito reservado. Em 40% dos casos, a mutação do EGFR é ainda acompanhada pela perda de uma proteína supressora de tumores, a PTEN, que exerce ação inibitória sobre a PI3K.⁵³

O tratamento destes tumores com o agonista sintético do LXR, GW3965 resulta, segundo os trabalhos de Guo et al., numa inibição dose-dependente do crescimento e proliferação promovendo ainda a morte das células cancerígenas. Este efeito da ativação do LXR nas células do glioblastoma é mediado por uma alteração da disponibilidade do colesterol uma vez que consegue ser revertido adicionando LDL. De fato, a análise de PCR e imunoblot sobre o gene do ABCA1 e do IDOL evidenciou uma expressão aumentada dos mesmos acompanhados por uma diminuição do LDLR ao nível proteico.

A eficácia do GW3965 foi também observada *in vivo* após administração forçada por via oral em murganhos nos quais tinham sido transplantadas subcutaneamente células de glioblastoma, inibindo o crescimento e proliferação destas e promovendo a morte celular.⁵²

O crescimento e proliferação dos tumores dependem de um importante e complexo fenómeno chamado angiogénese. Os tumores em crescimento são capazes de produzir uma série de moléculas que induzem sinais químicos necessários à construção da rede vascular que sustenta o aporte energético e de oxigénio da massa tumoral. Um interessante estudo científico realizado por Noghero et al. lançou a hipótese de que a modulação do metabolismo do colesterol das células endoteliais via ativação do LXR poderá ser útil no bloqueio da angiogénese, impedindo assim a progressão de tumores sólidos. O efeito do LXR na angiogénese é mediado por alterações da composição dos *rafts* lipídicos interferindo assim na sinalização do recetor do VEGF e com a sintetase do óxido nítrico endotelial.⁵⁴

6.3 O LXR e a proliferação dependente de hormonas

Outra importante forma como LXR atua sobre a proliferação dos tumores está relacionada com a sinalização hormonal.

Alguns tumores estão associados a elevadas quantidades de hormonas e seus recetores que, de certa forma, contribuem para o seu desenvolvimento e proliferação. Os casos mais conhecidos são, por exemplo, a associação entre o recetor de estrogénios e o cancro da mama e o recetor de androgénios e o cancro da próstata.

O cancro da próstata é um dos mais comuns entre os adultos do sexo masculino e um dos mais letais, tendo a sua incidência aumentado nos últimos anos.⁵⁵ A próstata é uma glândula exócrina importante na fisiologia sexual masculina cuja morfologia é intrinsecamente influenciada por androgénios, como a testosterona. Alterações na homeostasia da sinalização androgénica são importantes fatores de desencadeamento do cancro da próstata.

O recetor dos androgénios tem um papel preponderante na sustentação do desenvolvimento tumoral, induzindo ainda a acumulação de colesterol intracelular via SREBP2 e inibição dos LXR.⁵⁶ Um dos principais métodos de intervenção nestes tumores passa pela ablação dos androgénios por castração química ou cirúrgica.⁵⁷

Uma nova abordagem para o tratamento do cancro da próstata sensível aos androgénios poderá passar por promover a desativação dos androgénios via sulfonação através de uma enzima de fase II, a sulfotransferase SULT2A1. As hormonas esteroides sulfonadas são incapazes de ligar aos seus recetores alvo. Além disso são anfífilas, característica que facilita a sua excreção.⁵⁷

Lee et al. (2008) investigou o efeito da ativação do LXR em murganhos tendo evidenciado que o LXR é capaz de aumentar a expressão hepática da enzima metabolizadora dos androgénios SULT2A1 mas não na próstata. Além da ativação da expressão da SULT2A1 o LXR é capaz de reduzir a expressão do gene da sulfatase dos esteroides (STS) uma enzima responsável pela conversão dos esteroides sulfonados inativos a esteroides livres. Estas alterações de expressão génica foram acompanhadas pela observação da regressão da proliferação das células tumorais.

Uma percentagem importante de indivíduos com cancro da próstata sofre recidivas evoluindo para um carcinoma independente de androgénios, sendo este de difícil tratamento. Há evidências de que o tumor consegue, nesta fase (cancro da próstata resistente à castração), produzir androgénios endogenamente a partir do colesterol acumulado.⁵⁸

Assim, é tentador pensar que uma nova abordagem terapêutica para este cancro avançado, cujo tratamento é meramente paliativo, possa passar pelos efeitos do LXR sobre a homeostase do colesterol, negando-lhe a matéria-prima para a síntese de androgénios. Contudo as potencialidades do LXR podem ir além deste conhecido efeito da ativação do metabolismo do colesterol uma vez que, além da capacidade de induzir enzimas metabolizadoras dos

androgénios, parece haver uma relação e comunicação entre o LXR e a via de sinalização destes. Surpreendentemente os trabalhos de Viennois et al. (2012) sugerem que o LXR α exerce um nível de controlo da via de sinalização dos androgénios, por um lado através mecanismos parácrinos nos quais estão envolvidas células do estroma e epitélio prostático e por outro regulando uma série de genes sensíveis aos androgénios.⁵⁹

Existem contudo indícios de que os recetores de androgénios poderão antagonizar a atividade do LXR. Krycer et al. (2013) estabeleceu uma relação entre os níveis de androgénios presentes em células cancerígenas prostáticas e uma redução da expressão de genes ABCG1 e ABCA1. A forma como recetor dos androgénios interfere com o LXR parece estar relacionada com uma competição para os mesmos co-ativadores uma vez que a ativação destes não diminui o nível de LXR quer ao nível do mRNA, quer proteico.

Também no cancro da mama a ativação do LXR pode influir benefícios terapêuticos no tratamento destes tumores. O estrogénio está associado ao cancro da mama e uma das principais armas terapêuticas atualmente empregues no seu tratamento são os moduladores seletivos dos recetores de estrogénio, como o tamoxifeno. Este é metabolizado *in vivo* gerando metabolitos que competem para os recetores de estrogénios impedindo a ativação destes pela hormona esteroide e bloqueando o crescimento de tumores hormono-dependentes.

À semelhança do cancro da próstata, também aqui o LXR poderá ter potencial aplicação terapêutica nomeadamente devido à sua capacidade de indução das enzimas responsáveis pela metabolização das hormonas esteroides. Gong et al. (2007) demonstrou que existe uma relação entre a ativação do LXR e a expressão da SULT1E1, a enzima sulfotransferase de fase II do estrogénio, no fígado de murganhos e que o gene desta enzima é um alvo transcricional do LXR α . Verificou ainda que este método de privação de estrogénios inibiu o crescimento de tumores da mama transplantados em murganhos.⁶⁰

Mais tarde, Vedin et al. constatou que a inibição da proliferação em células do cancro da mama via ativação do LXR era mais pronunciada naquelas que expressavam o recetor de estrogénios alfa (Er α) e quase nulo naquelas que não o expressavam.⁴⁵ Nas células que expressavam o Er α a ativação do LXR diminuiu o nível de mRNA e de proteína do recetor.

Estes dados fazem-nos especular sobre a importância da atividade dos efeitos sobre o ciclo celular e sobre outros mecanismos de promoção da proliferação para a obtenção de

resultados experimentais significativamente importantes que justifiquem a aposta nestes recetores para o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade antitumoral.

6.4 LXR e a resposta imunitária

Uma das mais importantes características dos tumores com vista ao seu sucesso biológico é a capacidade de evasão ao sistema imunitário. Tornando-se invisíveis e enganando os mecanismos imunes de reconhecimento de células aberrantes desviam e manipulam o metabolismo energético, promovem a proliferação de vasculatura responsável por abastecer o tumor de nutrientes necessários ao seu crescimento assim como eliminar os “dejetos” da sua atividade e, por fim disseminam-se para outros tecidos.

Os tumores possuem um microambiente muito próprio do qual fazem parte inclusivamente células normais do organismo como, entre outras, células do sistema imunitário. Estas são sujeitas a uma grande diversidade de fatores produzidos pelo tumor⁶¹ e podem ter efeitos benéficos ou deletérios para o doente.^{4,62}

Um dos tipos de células do sistema imune que normalmente infiltra os tumores são as células dendríticas, responsáveis pela apresentação de antígenos. No microambiente tumoral encontram antígenos provenientes de células tumorais através de recetores de superfície capazes de detetar padrões moleculares patogénicos. Depois de fagocitarem os antígenos estes podem ser processados no compartimento intracelular e posteriormente ligados a proteínas do complexo major de histocompatibilidade e expressos à superfície da célula para, posteriormente, drenarem para os nódulos linfáticos onde reportam aos linfócitos T *naive* desencadeando uma resposta imune adaptativa. Este processo de maturação da célula dendrítica depende, entre outros, do recetor de citocinas CCR7.⁶²

Uma das formas como os tumores escapam ao sistema imunitário envolve o LXR e os oxisteróis.⁶³ Dependendo do estado de maturação da célula dendrítica, a ativação do LXR α pode exercer diferentes efeitos. Na célula dendrítica em maturação inibe a expressão do gene do recetor CCR7 impedindo que estas madurem e migrem para os nódulos linfáticos para iniciar a resposta imune adaptativa.^{61,63} Por outro lado, em células dendríticas imaturas estimula a expressão do mesmo recetor conduzindo contudo ao desenvolvimento de tolerância ou anergia por parte dos linfócitos T periféricos.^{61,63,64} Foi verificado que alguns tumores são capazes de produzir certos oxisteróis, nomeadamente o 22-hidroxicolesterol e o 24(R)-hidroxicolesterol

que por seu turno são responsáveis pela ativação do LXR α das células dendríticas do microambiente do tumor. Assim o tumor é capaz de escapar ao sistema imunitário. O knockout do LXR α reverte, parcialmente este efeito bem a inibição da síntese endógena de oxisteróis via transfeção viral com uma sulfotransferase citoplasmática SULT2B1b.⁴⁵

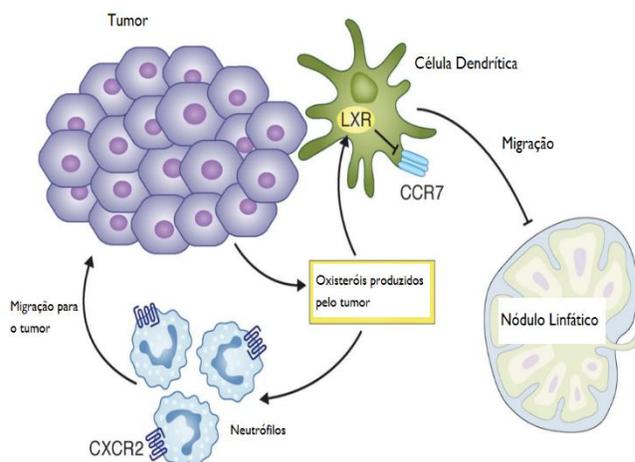


Figura 8. Efeitos dos oxisteróis tumorais sobre as células do sistema imune.⁴⁸

Mais tarde verificou-se que nos tumores onde a síntese de oxisteróis fora inativada via SULT2B1b, a população de neutrófilos que infiltrava o microambiente tumoral diminuía e começou a conjecturar-se a possibilidade de também eles serem alvos dos efeitos pró-tumorais dos oxisteróis e do LXR.⁶⁵ Contudo Raccosta et al. (2013) viria a demonstrar que a migração dos neutrófilos

para o microambiente tumoral, apesar de ser mediado pelos oxisteróis, é independente do LXR, mas sim mediado pelo recetor CXCR2 acoplado à proteína G.⁶⁵ Os neutrófilos recrutados para o tumor são de extrema importância para o seu desenvolvimento e é muito comum que o prognóstico clínico seja reservado para doentes em que se verifiquem taxas de infiltração de neutrófilos e expressão de CXCR2 elevadas.⁶⁶ Os neutrófilos recrutados contribuem para o estabelecimento da rede vascular da massa tumoral uma vez que secretam a metaloprotease-9 da matriz (MMP-9) e o fator pro-angiogénico BV8.

É importante referir que, apesar de tudo, têm sido encontrados dados conflituosos acerca do efeito da ativação do LXR sobre células dos sistema imune, especialmente nos macrófagos e células dendríticas parecendo ser dependente do contexto fisiopatológico em que a célula se encontra.⁶⁷ Torocsik et al. (2010) mostrou que a ativação do LXR de células dendríticas estimulou a sua maturação e consequente ativação das células T.⁶⁸

No futuro uma possível abordagem terapêutica para estes tumores secretores de oxisteróis poderá passar pelo desenvolvimento de inibidores do LXR ou da síntese dos oxisteróis, interferindo assim com a capacidade de evasão e subversão do sistema imunitário.

Conclusão

O LXR apresenta um rol de funções fisiológicas que o tornam um interessante alvo de estudo na busca de novas formas de combater o cancro. Considerando os inúmeros relatórios científicos das suas proezas, podemos continuar a alimentar a ideia de que, no futuro, poderão alinhar no arsenal terapêutico usado, não só no tratamento do cancro, mas também em diversas outras patologias, nomeadamente aquelas que envolvem desregulações do metabolismo do colesterol, dos glícidos e dos lípidos.

Para que tal seja possível é necessário abordar e preencher certas lacunas que hoje imperam no conhecimento acerca do seu funcionamento. É necessário aprofundar o conhecimento em torno das funções específicas e diferenciadoras de cada isoforma e mapear os genes alvo da ativação de cada uma em tecidos distintos a fim de estabelecer um conhecimento empírico e metódico da fisiologia individual de cada uma delas.

Com base nesse conhecimento será possível desenhar moduladores seletivos que permitam contornar aquelas que hoje são as principais limitações da sua utilização. O efeito lipogénico resultante da ativação do LXR tem consequências como o aumento pernicioso do colesterol LDL circulante e acumulação intra-hepática de lípidos conduzindo a esteatose hepática e o aumento da acumulação de lípidos nos adipócitos. Outro grave efeito secundário da ativação dos LXR é a ativação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) associada à formação e aumento das lipoproteínas associadas à aterosclerose.³⁵ Estes efeitos adversos não podem ser descartados nem encarados com ânimo leve.

Os benefícios terapêuticos que o LXR promete, continuarão a motivar a comunidade científica no sentido de procurar respostas para as questões que imperam e soluções para os problemas que bloqueiam a sua progressão do avanço na trincheira da guerra contra o cancro. A possibilidade de tratar cancros como o da próstata, sem recorrer à castração ou evitar o risco de desenvolvimento de cancro do endométrio no tratamento do cancro da mama com o tamoxifeno, seriam pontos de viragem na clínica destas doenças.

Para que tudo isto seja possível serão ainda necessários dar longos passos no sentido de provar novamente os benefícios até aqui constatados, mas agora em humanos.

Bibliografia

1. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2014. **64**, 9–29 (2014).
2. American Cancer Society. Livestrong. The Global Economic Cost of Cancer. in (2010). at <www.cancer.org>
3. Eckhouse, S., Lewison, G. & Sullivan, R. Trends in the global funding and activity of cancer research. *Mol. Oncol.* **2**, 20–32 (2008).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
5. Silva, M., Sá e Melo, M. L. & Carvalho, F. S. J. Oxisteróis: O seu papel na saúde e na doença. *Bol. da Soc. Port. Química* 53–58 (2011).
6. Bjorkhem, I. Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 734–742 (2002).
7. Otaegui-Arrazola, a, Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D. & Astiasarán, I. Oxysterols: A world to explore. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3289–303 (2010).
8. Brown, A. J. & Jessup, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 111–22 (2009).
9. Olkkonen, V. M., Béaslas, O. & Nissilä, E. Oxysterols and Their Cellular Effectors. *Biomolecules* **2**, 76–103 (2012).
10. Christie, W. W. Oxysterols and other cholesterol derivatives: structure, occurrence and biochemistry. 1–9 (2013). at <lipidlibrary.aocs.org/lipids/chol_der/file.pdf>
11. DeBose-Boyd, R. a. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* **18**, 609–21 (2008).
12. Grønning-wang, L. M., Bindsbøll, C. & Nebb, H. I. The Role of Liver X Receptor in Hepatic de novo Lipogenesis and Cross-Talk with Insulin and Glucose Signaling. (2013).
13. Wójcicka, G., Jamroz-wiśniewska, A. & Horoszewicz, K. Liver X receptors (LXR). Part I : Structure , function , regulation of activity , and role in lipid metabolism Receptory wątrobowe X (LXR). Część I : Budowa , funkcja , regulacja aktywności i znaczenie w metabolizmie lipidów. 736–759 (2007).
14. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J.-Å. & Steffensen, K. R. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 394–404 (2012).

15. Viennois, E. *et al.* Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 129–41 (2012).
16. Oosterveer, M. H., Grefhorst, A., Groen, A. K. & Kuipers, F. Progress in Lipid Research The liver X receptor : Control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. *Prog. Lipid Res.* **49**, 343–352 (2010).
17. Viennois, E. *et al.* Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* **15**, 219–32 (2011).
18. Baranowski, M. belong to the nuclear receptor superfamily . They were first identified in 1994 by may be activated by ligands for either partner in an independent manner (4). In exchanged with coactivators upon receptor activation (6). 31–55 (2008).
19. Nguyen-Vu, T. *et al.* Liver × receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. *Breast Cancer Res.* **15**, R51 (2013).
20. Peet, D. J. *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* **93**, 693–704 (1998).
21. Tomoyuki Yasuda, Didier Grillot, Jeffery T. Billheimer, François Briand, P. & Delerive, Stephane Huet, and D. J. R. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage RCT in vivo. *Arter. Thromb Vasc Biol.* **30**, 781–786 (2011).
22. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. 2831–2838 (2000). doi:10.1101/gad.850400.On
23. Naik, S. U. *et al.* Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* **113**, 90–7 (2006).
24. Yu, L. *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J. Biol. Chem.* **278**, 15565–70 (2003).
25. Gerin, I. *et al.* LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J. Biol. Chem.* **280**, 23024–31 (2005).
26. Dalen, K. T., Ulven, S. M., Bamberg, K., Gustafsson, J.-A. & Nebb, H. I. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 48283–91 (2003).
27. Stulnig, T. M. *et al.* Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1299–305 (2002).
28. Efanov, A. M., Sewing, S., Bokvist, K. & Gromada, J. Metabolism in Pancreatic β -Cells. **53**, 2–5 (2004).

29. Laffitte, B. a *et al.* Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5419–24 (2003).
30. Grefhorst, A. *et al.* Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob / ob mice. 829–838 (2005). doi:10.1152/ajpendo.00165.2005.
31. Joseph, S. B. *et al.* LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* **119**, 299–309 (2004).
32. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. a, Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–9 (2003).
33. Joseph, S. B. *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 11019–25 (2002).
34. Kim, K. H. *et al.* Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J. Lipid Res.* **51**, 3425–33 (2010).
35. Tice, C. M. *et al.* The Medicinal Chemistry of Liver X Receptor (LXR) Modulators. *J. Med. Chem.* (2014). doi:10.1021/jm500442z
36. Huang, C. Natural modulators of liver X receptors. *J. Integr. Med.* 76–85 (2014).
37. Mehrotra, A., Kaul, D. & Joshi, K. LXR- α selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **349**, 41–55 (2011).
38. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell.* 1053–1115 & 1205–1269 (Garland Science, 2008).
39. Hershko, D. D. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* **112**, 1415–24 (2008).
40. Chuu, C.-P., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. a & Liao, S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J. Biomed. Sci.* **14**, 543–53 (2007).
41. Chuu, C.-P. & Lin, H.-P. Antiproliferative effect of LXR agonists T0901317 and 22(R)-hydroxycholesterol on multiple human cancer cell lines. *Anticancer Res.* **30**, 3643–8 (2010).
42. Fukuchi, J., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A., Chuu, C. & Liao, S. Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells. 7686–7689 (2004).

43. Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W. & Gores, G. J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 12093–101 (2006).
44. Feldstein, A. E. *et al.* Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* **40**, 185–94 (2004).
45. Vedin, L.-L., Lewandowski, S. a, Parini, P., Gustafsson, J.-A. & Steffensen, K. R. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 575–9 (2009).
46. Blaschke, F. *et al.* Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ. Res.* **95**, e110–23 (2004).
47. Bravi, F. *et al.* Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann. Oncol.* **17**, 1014–7 (2006).
48. Pommier, A. J. C. *et al.* Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* **9**, e1003483 (2013).
49. Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655–67 (2003).
50. Pommier, a J. C. *et al.* Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* **29**, 2712–23 (2010).
51. Zhang, W. *et al.* Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway. *Cancer Cell Int.* **14**, 16 (2014).
52. Guo, D. *et al.* An LXR agonist promotes GBM cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. **1**, 442–456 (2012).
53. Gan, H. K., Cvrljevic, A. N. & Johns, T. G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J.* **280**, 5350–70 (2013).
54. Noghero, A. *et al.* Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2280–8 (2012).
55. Hoang, J.-J., Baron, S., Volle, D. H., Lobaccaro, J.-M. a & Trousson, A. Lipids, LXRs and prostate cancer: are HDACs a new link? *Biochem. Pharmacol.* **86**, 168–74 (2013).
56. Krycer, J. R. & Brown, A. J. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1835**, 219–29 (2013).
57. Lee, J. H. *et al.* Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* **149**, 3778–88 (2008).

58. Mostaghel, E. a, Solomon, K. R., Pelton, K., Freeman, M. R. & Montgomery, R. B. Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. *PLoS One* **7**, e30062 (2012).
59. Viennois, E. *et al.* Lxra regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* **153**, 3211–23 (2012).
60. Gong, H. *et al.* Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1781–90 (2007).
61. Traversari, C., Sozzani, S., Steffensen, K. R. & Russo, V. LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. *Eur. J. Immunol.* **1**, 1–8 (2014).
62. Benencia, F., Sprague, L., McGinty, J., Pate, M. & Muccioli, M. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 425476 (2012).
63. Villablanca, E. J. *et al.* Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* **16**, 98–105 (2010).
64. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411–6 (2000).
65. Raccosta, L., Fontana, R., Traversari, C. & Russo, V. Oxysterols recruit tumor-supporting neutrophils within the tumor microenvironment: The many facets of tumor-derived oxysterols. *Oncoimmunology* **2**, e26469 (2013).
66. York, A. G. & Bensinger, S. J. Subverting sterols: rerouting an oxysterol-signaling pathway to promote tumor growth. *J. Exp. Med.* **210**, 1653–6 (2013).
67. Traversari, C. & Russo, V. Control of the immune system by oxysterols and cancer development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **12**, 729–35 (2012).
68. Töröcsik, D. *et al.* Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* **184**, 5456–65 (2010).