

POLIMORFISMO DO GENE COX-2 E A SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE CÓLON E RETO

Polymorphism of the Cox-2 gene and susceptibility to colon and rectal cancer

Denise Camilios **COSSIOLO**¹, Helen Caroline Magalhães **COSTA**¹, Karen Barros Parron **FERNANDES**¹,
 Lino Luis Sanches **LARANJEIRA**^{1,2}, Marcos Tadeu Parron **FERNANDES**³, Regina Célia **POLI-FREDERICO**³

Trabalho realizado na ¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Medicina, Londrina, PR; ²Cirurgia Colorretal, Instituto de Câncer de Londrina, Londrina, PR; e ³UNOPAR, Centro de Ciências da Reabilitação, Londrina, PR, Brasil

RESUMO - Racional: A neoplasia colorretal representa a quarta malignidade mais comum entre homens e a terceira entre as mulheres. No mundo ocidental estima-se que 5% da população a desenvolverá, tornando-a grave problema de saúde pública. **Objetivo:** Analisar a prevalência de polimorfismo na região -765G/C do gene COX-2 em pacientes com câncer colorretal em relação a um grupo controle, analisando a possível associação entre este polimorfismo e a suscetibilidade a ele. **Método:** Foram incluídos neste estudo caso-controle 85 participantes. Selecionou-se 25 com neoplasia colorretal (grupo caso) e 60 pacientes sem neoplasia colorretal (grupo controle). Realizou-se análise genético-molecular para identificação do polimorfismo -765G/C do gene COX2 com técnica padrão da literatura. Além disso, foram levantados dados clínicos e anatomopatológicos dos pacientes. **Resultado:** Constatou-se discreto aumento de prevalência entre os homens no grupo caso, embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa. Os resultados revelaram alta prevalência do genótipo GC e CC nos indivíduos com câncer colorretal, demonstrando associação entre a presença do polimorfismo no gene COX2 e a suscetibilidade ao câncer colorretal nesta amostra ($p=0,02$). Similarmente, também se observou diferença nas frequências alélicas em relação aos grupos. Quando os pacientes com a neoplasia foram separados por localização do tumor, verificou-se maior prevalência do polimorfismo em pacientes de cólon esquerdo ($p=0,02$). **Conclusão:** O polimorfismo no gene COX2 está associado com a maior suscetibilidade ao câncer colorretal, especialmente em tumores do retossigmoide.

DESCRIPTORIOS - Neoplasias do cólon. Neoplasias retais. Frequência do gene.

Correspondência:

Denise Camilios Cossio
 E-mail: deniseccossio@gmail.com;
 deniseccossio@gmail.com

Fonte de financiamento: não há
 Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 06/01/2017
 Aceito para publicação: 11/04/2017

HEADINGS - Colonic neoplasms. Rectal neoplasms. Gene frequency.

ABSTRACT - Background: The colorectal neoplasm is the fourth most common malignancy among males and the third among females. In the Western world is estimated that 5% of the population will develop it, making this disease a major public health problem. **Aim:** To analyze the prevalence of the polymorphism -765G / C region of the COX-2 gene in colorectal cancer patients compared to a control group, analyzing the possible association between this polymorphism and susceptibility to colorectal cancer. **Method:** This is a case-control study with 85 participants. Were selected 25 with colorectal cancer (case group) and 60 participants without colorectal neoplasia (control group). The molecular genetic analysis was performed to identify the polymorphism -765G / C COX2 gene with standard literature technique. In addition, patient's clinical and pathological data were analyzed. **Results:** There was a light increase in prevalence between men in the case group, although this difference was not statistically significant. The results showed a high prevalence of GC and CC genotype in individuals with colorectal cancer, demonstrating an association between the presence of the polymorphism in the COX2 gene and susceptibility to colorectal cancer in this pattern ($p=0.02$). Similarly, there was also difference in allele frequencies in the groups. When patients with cancer were separated by tumor location, there was a higher prevalence of polymorphism in the left colon ($p=0.02$). **Conclusion:** The polymorphism in the COX2 gene is associated with increased susceptibility to colorectal cancer, specially rectosigmoid tumors.

INTRODUÇÃO

A neoplasia colorretal é uma das doenças malignas mais comuns no mundo, sendo a quarta entre os homens e a terceira entre as mulheres, revelando ser importante problema de saúde pública²⁵. Fatores ambientais e dietéticos exercem influência na gênese do câncer colorretal (CCR). Estima-se que aproximadamente 25% de todos os tumores colorretais tenham história familiar¹⁰. No entanto, ainda existem lacunas quanto à identificação dos marcadores precoces que possibilitariam o acompanhamento dos pacientes e seu prognóstico.

Acredita-se que as prostaglandinas estão envolvidas na sua gênese. As prostaglandinas são pequenas moléculas derivadas do ácido araquidônico, as quais são produzidas a partir da enzima ciclo-oxigenase (COX). Essa enzima é subdividida em: COX-1 responsável pelas atividades fisiológicas e por isso é chamada constitutiva e COX-2 expressa após estímulo de citocinas, fator crescimento e mitógenos¹.

Em condições fisiológicas a COX-2 é expressa em tecido do trato gastrointestinal

em baixíssimos níveis. No entanto, seu nível se eleva nos CCR²¹. Desse modo, em um estudo realizado por Eberhart et al constatou-se que aproximadamente 85% dos tumores de cólon e reto apresentam níveis elevados de COX-2⁸. Relatos na literatura sugerem que o polimorfismo de um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphism SNP) no gene COX-2 seria capaz de modificar a função da enzima e, assim, ampliar o risco de um indivíduo desenvolver câncer de cólon²⁴.

As alterações no gene COX-2 podem implicar em mudanças na função da enzima e contribuir para a resposta inflamatória ou para o aumento do risco de desenvolver CCR^{5,15}. Porém, vários polimorfismos já foram identificados no gene COX-2 e ainda não foi estabelecido nenhuma relação conclusiva com a gênese do CCR²¹. Desse modo, há a possibilidade de estabelecer a expressão da COX-2 como fator de prognóstico, já que tem sido vinculada com o desenvolvimento de metástases e com um índice menor de sobrevida⁸.

Nesse contexto, o presente estudo visa estimar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene COX-2, a fim de avaliar a possível associação entre essas frequências e a suscetibilidade ao CCR.

MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Protocolo no. 884/397). É caso-controle, realizado em parceria com o Instituto do Câncer de Londrina. Todos os pacientes foram informados previamente sobre os objetivos e procedimentos a serem realizados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pacientes

Os incluídos tinham CCR com indicação cirúrgica. Aqueles que perderam seguimento logo após a intervenção cirúrgica foram excluídos. Para o grupo controle, foram incluídos indivíduos sem neoplasia colorretal e pareados por gênero e faixa etária em relação ao grupo caso. Por outro lado, indivíduos com histórico de outras neoplasias ou com a presença de pólipos durante a colonoscopia foram excluídos da amostra.

Dados clínicos

Das informações clínicas dos pacientes foram retirados os seguintes dados demográficos e antropométricos: gênero, idade, IMC, histórico de tabagismo e etilismo. Análises sanguíneas forneceram informações sobre linfocitometria, hemoglobina, cálcio, transferrina, albumina, antígeno carcinoembrionário inicial e pós-operatório, a partir de cópia dos linfócitos (absoluto) do leucograma tanto na internação quanto na alta. Além disso, avaliou-se o resultado do estudo anatomopatológico e estadiamento do tumor fornecido pelo laudo patológico e/ou por oncologista. Foram analisadas as retossigmoidoscópias/colonoscópias pré-operatórias, contendo a descrição do tamanho da lesão pré-operatória e o local do tumor. Também, foram considerados os tratamentos e operações realizadas e a descrição do procedimento se realizado e se foi necessária segunda ou terceira intervenção. Para obter informações a respeito de óbito e sobrevida foi utilizado contato via telefônica com paciente ou familiar para identificação atual da situação do paciente.

Coleta de sangue

Foi realizada em veia periférica em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA). Os tubos foram centrifugados e as células nucleadas (leucócitos) foram separadas para posterior extração de DNA ou armazenamento em freezer a -80°C, até o momento da extração. As amostras foram transferidas para frascos estéreis e o DNA foi obtido após digestão enzimática em tampão contendo proteinase K e SDS e posterior extração com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio).

Análise molecular do polimorfismo do gene COX-2

Após a extração de DNA das amostras, a análise do polimorfismo -765G/C COX2 foi avaliada por meio da técnica de PCR de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), sendo o primer para PCR selecionado de acordo com o banco de dados de genoma (sequência da região -765G/C: Forward" 5'-ATT CTG GCC ATC GCC GCT TC-3' e "Reverse", 5'-CTC CTT CTT TGG AAA GAG CG-3'). As condições de amplificação serão determinadas pelas seguintes condições de temperaturas e tempos: 94° C - 3 min.; 94° C, 59° C e 72° C durante 60 s cada, com 35 ciclos e 72° C durante 5 min. Para a detecção do alelo prolina serão utilizados os seguintes parâmetros: 94° C - 3 min.; 94° C, 57° C e 72° C durante 30 s cada, com 35 ciclos e 72° C durante 5 min. Após a PCR os produtos foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição denominada BstUI (Bsh 1236I) por 8 h a 37° C. Os produtos amplificados foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados por Sybr Safe. Fragmentos amplificados de tamanhos de 134 e 23 pares de bases (pb) indicarão homozigose para o alelo selvagem (-765GG). Um único fragmento de 157 pares de bases indicará homozigose para o alelo C (-765CC) e a presença de três fragmentos de 157, 134 e 23 pares de bases indicará heterozigose (-765GC).

RESULTADOS

O estudo foi composto por 85 participantes sendo 25 portadores de CCR (idade 56,3±12,2 anos) e 60 do grupo controle (idade 60,5±6,8 anos). Quanto ao gênero, observou-se discreto aumento de prevalência de homens no grupo caso (n= 14, 56,0%), embora esta diferença não seja estatisticamente significativa.

Foi encontrada alta prevalência do genótipo GC e CC nos indivíduos com CCR, constatando associação entre a presença do polimorfismo no gene COX2 e a suscetibilidade ao CCR nesta amostra (Teste Fisher-Freeman-Halton, p=0,02, Tabela 1). Também houve diferença nas frequências alélicas em relação aos grupos (Teste do Qui Quadrado, p<0,05, Tabela 2)

TABELA 1- Frequências genotípicas do gene COX2 em relação ao câncer colorretal

| Frequências genotípicas | Câncer colorretal | | Total |
|-------------------------|-------------------|--------|--------|
| | Não | Sim | |
| GG | 43 | 11 | 54 |
| | 71,7% | 44,0% | 63,5% |
| GC | 16 | 13 | 29 |
| | 26,7% | 52,0% | 34,1% |
| CC | 1 | 1 | 2 |
| | 1,7% | 4,0% | 2,4% |
| Total | 60 | 25 | 85 |
| | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

TABELA 2- Distribuição das frequências alélicas do gene COX2 e nos indivíduos com e sem câncer colorretal

| Frequências alélicas | Câncer colorretal | | Total |
|----------------------|-------------------|--------|--------|
| | Não | Sim | |
| G | 102 | 35 | 137 |
| | 85,0% | 70,0% | 80,60% |
| C | 18 | 15 | 33 |
| | 15,0% | 30,0% | 19,40% |
| Total | 120 | 50 | 170 |
| | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Quando as frequências genotípicas do gene em questão foram analisadas em relação à presença e localização do tumor, constatou-se prevalência do genótipo GC e CC em pacientes com câncer e cuja localização era em cólon esquerdo. Isso

comprova que há associação mais significativa entre a presença do polimorfismo do gene COX-2 com tumores localizados em cólon esquerdo (Teste Fisher-Freeman-Halton, $p < 0,05$, Tabela 3)

TABELA 3 - Distribuição das frequências genotípicas do gene COX2 em relação à presença e localização do tumor

| Frequências genotípicas | Câncer colorretal | | Controle | Total |
|-------------------------|-------------------|----------------|----------|--------|
| | Cólon direito | Cólon esquerdo | | |
| GG | 7 | 4 | 43 | 54 |
| | 70,0% | 26,7% | 71,7% | 63,5% |
| GC | 3 | 10 | 16 | 29 |
| | 30,0% | 66,7% | 26,7% | 34,1% |
| CC | ----- | 1 | 1 | 2 |
| | ----- | 6,7% | 1,7% | 2,4% |
| Total | 10 | 15 | 60 | 85 |
| | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

DISCUSSÃO

A enzima COX-2 é responsável pela conversão do ácido aracídônico em prostaglandina. Sua ação é induzível por inúmeros mediadores presentes no processo inflamatório. Estudos evidenciaram significativo aumento da expressão da COX-2 em vários tipos de neoplasia, sobretudo as epiteliais, incluindo o CCR^{3,9}. O polimorfismo de único nucleotídeo com a troca de uma guanina por uma citosina na posição -765 do gene COX2 tem sido descrito como fator de aumento de risco da ocorrência de CCR¹².

Os resultados deste estudo evidenciaram associação do alelo polimórfico C com aumento da susceptibilidade ao CCR. Ao comparar os pacientes que apresentaram a neoplasia (grupo caso) com o grupo controle foi observado prevalência dos genótipos GC e CC nos indivíduos portados do CCR. Essa associação, também, foi preservada ao subdividir o grupo de neoplasia de acordo com o local da ocorrência do tumor primário, em cólon direito e cólon esquerdo; porém, foi mais fortemente significativa nas lesões de cólon esquerdo. Esses resultados são compatíveis com dados presentes em vários estudos prévios, incluindo a metanálise de Cao et al e de Peng et al, a qual analisou 6774 casos de CCR e 9772 controles^{19,30}. Apesar disso, alguns estudos não demonstraram nenhuma correlação entre o polimorfismo -765 G/C do gene COX2 e neoplasias colorretais^{6,24,27}. A análise de todos esses estudos demonstra predisposição em correlacionar o polimorfismo de um único nucleotídeo e o CCR em populações asiáticas, mas isso não se aplica a populações caucasianas.

Acredita-se na hipótese de que a enzima COX-2 esteja envolvida na estimulação da proliferação celular e da angiogênese, na inibição da apoptose e na supressão imunológica, todos eventos com potencial carcinogênico^{11,14,17,29}. O presente estudo analisou polimorfismo de único nucleotídeo com a troca de uma guanina por uma citosina na posição -765 do gene COX2¹⁸. Esse polimorfismo ocorre na região promotora do gene, resultando em um possível aumento da expressão genética com consequente elevação dos níveis da proteína COX-2²⁶. Nesse contexto, o estudo realizado por Eberhart et al. demonstrou que os níveis de COX-2 estavam elevados em 85% dos casos de CCR⁸.

Existem inúmeras evidências da influência do polimorfismo -765 G/C na gênese de vários tumores, como o câncer de próstata, de mama, de ovário, de pulmão, de fígado e o CCR^{14,13}. A associação encontrada no atual estudo foi para a ocorrência do CCR em qualquer localização, porém ela foi mais significativa nos casos de tumores do cólon esquerdo do que nos do direito. Isso reforça a hipótese de que, apesar de estarem no cólon, tratam-se de neoplasias de causas diferentes, como aventado por Peng et al. em sua metanálise¹⁹. No retossigmoide as lesões

têm aspecto e comportamento mais predominantemente inflamatório, o que seria uma possível explicação para essa maior correlação da COX-2 com os tumores à esquerda em comparação com os casos de cólon direito.

No Brasil, são escassos os estudos de polimorfismos do COX-2 e a ocorrência de tumores colorretais, sendo este trabalho um dos primeiros relatos que comparam não só a suscetibilidade ao câncer, mas também a associação com a topografia tumoral. Nesse contexto, este estudo contribui para a caracterização da associação do polimorfismo do gene COX-2 com o CCR na população brasileira, notadamente mais significativa nas lesões retossigmoideanas.

A pesquisa a respeito dos polimorfismos pode proporcionar avanços futuros significativos, pois possibilitará a identificação dos indivíduos mais suscetíveis ao risco de tumores, permitindo uma individualização na terapêutica. Em relação à neoplasia colorretal os pacientes polimórficos portadores do alelo C seriam potenciais candidatos ao tratamento com drogas anti-inflamatórias, sobretudo nas situações de câncer de cólon esquerdo.

CONCLUSÃO

O polimorfismo no gene COX-2 está associado à maior suscetibilidade ao câncer colorretal, especialmente em tumores do segmento retossigmoide.

REFERÊNCIAS

- Akkiz H, Bayram S, Bekar A, Akgollu E, Ulger Y. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 gene and risk for hepatocellular carcinoma. *Mol Cel Biochem*. 2011; 347(1-2): 201-8.
- Cakmakoglu, BA, Attar R, Kabraman OT, Dalan AB, lybozkurt AC, Karateke A, Attar E. Cyclooxygenase-2 gene and epithelial ovarian carcinoma risk. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(5): 3481-86.
- Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirina and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Eng J Med*. 2007; 356(21): 2131-42.
- Coskumpinar E, Eraltam IY, Turna A, Agachan B. Cyclooxygenase-2 gene and lung carcinoma risk. *Med Oncol*. 2011; 28(4): 1436-40.
- Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, Moreno V. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004; 91(2): 339-43.
- Daraei A, Salehi R, Mohamadhashem F. PTGS2 (COX2) -765G>C gene polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in Iranian population. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(5): 5219-24.
- Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H. Potentially functional COX-2 1195g>A polymorphism increase the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 25(6): 1042-50.
- Eberhart CE1, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*. 1994; 107(4): 1183-88.
- Edwards J, Mukherjee R, Munro AF, Wells AC, Almushatat A, Barlett JM. HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40(1): 50-55.
- Felin CR, Rocha AB, Felin IPD, Regner A, Grivicich I. Expressão das Proteínas p53 e Cox-2 em Adenocarcinoma Intestinal e Mucosa Adjacente. *Rev bras Coloproct*. 2008; 28(1): 19-23.
- Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, Mizokami A. Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate*. 2002; 53(3): 232-40.
- Hamajima N, Takezaki T, Matsuo K, Saito T, Noue M, Hirai T, Kato T, Ozeki J, Tajima K. Genotype frequencies of cyclooxygenase2 (COX2) rare polymorphisms for japanese with and without colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2001; 2(1): 57-62.
- Gao J, Ke Q, Ma HX, Wang Y, Zhou Y, Hu ZB, Zhai XJ, Wang XC, Qing JW, Chen WS, Jin GF, Liu JY, Tan YF, Wang XR, Shen HB. Functional polymorphisms in the cyclooxygenase 2 (COX-2) gene and risk breast cancer in a Chinese population. *J Toxicol Environ Health*. 2007; 70(11): 908-15
- Kirschenbaum A, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of Cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology*. 2001; 58(2 Suppl 1): 127-31.

15. Lin HJ, Lakkides KM, Keku TO, Reddy ST, Louie AD, Kau IH, Zhou H, Gim JS, Ma HL, Matthies CF, Dai A, Huang HF, Materi AM, Lin JH, Frankl HD, Lee ER, Hardy SI, Herschman HR, Henderson BE, Kolonel LN, Le Marchand L, Garavito RM, Sandler RS, Haile RW, Smith WL. Prostaglandin H synthase 2 variant (Val511Ala) in African Americans may reduce the risk for colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11(11):1305-15.
16. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woener BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2006; 60:1306-11.
17. Nithipathikom K, Isbell MA, Lindholm PF, Kadjacsy-Balla A, Kaul S, Campbell WB. Requirement of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandins for human prostate cancer cell invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19(7): 593-601.
18. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, Mcanalty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(10): 1631-36.
19. Peng Q, Yang S, Lao X, Tang W, Chen Z, Lai H, Wang J, Sui J, Qin X, Li S. Meta-analysis of the association between COX-2 polymorphisms and risk of colorectal cancer based on case-control studies. *Plos One.* 2014; 9(4): e94790.
20. Pereira C, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. Cyclooxygenase polymorphisms in gastric and colorectal carcinogenesis: are conclusive results available? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21(1):76-91.
21. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin and regulation of the immune response. *Immunol. Today.* 1991; 12(10): 349-52.
22. Reddy BS, Tokumo K, Kulkarni N, Aligia C, Kelloff G. Inhibition of colon carcinogenesis by prostaglandin synthesis inhibitors and related compounds. *Carcinogenesis.* 1992; 13(6):1019-23.
23. Sansbury LB, Millikan RC, Schroeder JC, North KE, Moorman PG, Keku TO, de Cotret AR, Player J, Sandler RS. Cox-2 polymorphism, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and risk of colon cancer in African Americans (United States). *Cancer Causes and Control.* 2006; 17(3):257-66.
24. Shalabi MA, Nounou HA, Alanazi MS, Alharby O, Azzam N, Saeed HM. Associations between single nucleotide polymorphisms of COX-2 And MMP-2 genes and colorectal cancer susceptibility in the Saudi population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(12): 4989-94.
25. She KM, Wang HM, Chen JB, Chou DS, Mar HF, Chen CC, Chiang FF, Chen MC, Chen YH. Colorectal cancer in younger than 30 years old group is not associated with poor prognosis. *J Soc Colon Rectal Surgeon.* 2011; 22(3): 93-98.
26. Szczeklika W, Sanak M, Szczeklika A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114 (2): 248-53.
27. Thompson CL, Plummer SJ, Merkulova A, Cheng I, Tucker TC, Casey G, Li L. No association between cyclooxygenase-2 and uridine diphosphate alucuronosyltransferase 1A6 genetic polymorphisms and colon cancer risk. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(18): 2240-44.
28. Thun, M.J.; Namboodiri, M.M.; Heath, C.W.Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Eng J Med.* 1991; 325(23):1593-96.
29. Wang W, Berg A, Damber JE. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(9):3250-56.
30. Zhao F, Cao Y, Zhu H, Huang M, Yi C, Huang Y. The -765G>C polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene and digestive system cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(19): p 8301-10.