

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Universidade da Beira Interior  
2009



**C**ARCINOMA DA **B**EXIGA NUM **M**ODELO  
**A**NIMAL **E**XPERIMENTAL – **E**FEITO  
**P**REVENTIVO DE UMA **E**STATINA

*Ângela Filipa Fonseca Pinto*

***Orientador:** Doutor Flávio Reis*

***Co-orientadora:** Professora Doutora Petronila Rocha  
Pereira*







## **AGRADECIMENTOS**

Expresso a minha sincera gratidão:

Ao Senhor Professor Doutor Frederico Teixeira, pela forma como me acolheu no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e por tornar possível a realização deste trabalho, disponibilizando todos os meios necessários à sua prossecução.

Ao Senhor Doutor Flávio Reis, pela orientação científica e acompanhamento deste trabalho, conduzidos com elevado grau de exigência e rigor, pela confiança em mim depositada e pelo apoio e amizade incondicional que recebi. O seu incentivo e encorajamento estiveram sempre presentes.

À Senhora Professora Doutora Petronila Rocha Pereira, elo de ligação da Universidade da Beira Interior a este Instituto, pelo seu contributo na co-orientação deste trabalho, mas também pelo apoio e amizade prestada.

À Dra. Liliana Ferreira, pela sua importante colaboração na realização deste trabalho, pelas sugestões preciosas durante a construção da tese, por ouvir os meus desabafos e desesperos nos momentos mais difíceis e pelas suas palavras de alento, que tanto me ajudaram a ultrapassar os momentos “menos bons”.

A todo os que são parte integrante do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, especialmente ao Dr. Belmiro Parada, Doutora Edite Lemos, Doutora Teresa Morgadinho, Dra. Patrícia Garrido, Dr. José Sereno, Dra. Sofia Baptista, Dra. Joana Gonçalves e D. Graciela, que me integraram de forma sempre simpática e familiar, para além da ajuda prestada ao longo do trabalho.

Ao Pedro Nunes e à Célia Pires, pelos “pequenos grandes favores”, mas acima de tudo, pela manifestação da sua Amizade em todos os momentos, bons e maus, do meu percurso.

À minha Amiga Sandra Lemos que, apesar da distância, sempre acompanhou todos os meus passos nesta etapa tão importante.

A todas as pessoas que, através de palavras de incentivo e de amizade, tornaram mais fácil a realização deste trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais, aos meus irmãos Miguel e Cristina, aos meus sobrinhos Pedro e Ana e à minha “segunda mãe” Helena, a quem também dedico esta tese, por serem as pessoas que dão sentido à minha existência e que me ajudaram, mais uma vez, a concretizar uma etapa importante da minha vida.

## PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

### a) Publicações em Revistas Científicas

- B Parada, J Sereno, F. Reis, E. Teixeira-Lemos, P. Garrido, A.F. Pinto, M.F. Cunha, R. Pinto, A. Mota, A. Figueiredo, F. Teixeira. Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis. *Cancer Biol & Ther* 2009 (submetido)
- E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, J Sereno, L Ferreira, AF Pinto, F Teixeira Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population. *Proc Eur Assoc Clin Pharmacol* 2009
- N Piloto, F Reis, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, E Costa, R Pinto, AF Pinto, L Ferreira, P Rocha-Pereira, A Santos-Silva, F Teixeira Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model. *Proc Eur Assoc Clin Pharmacol* 2009
- N Piloto, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, AF Pinto, E Costa, L Belo, A Santos-Silva, R Pinto, P Couceiro, P Neto, F Xavier, L Carvalho, F Teixeira, F Reis. Erythropoietin doping as cause of sudden death in athletes – an experimental study. *Proceedings IALM* 2009

### b) Comunicações em reuniões científicas

- E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, J Sereno, L Ferreira, AF Pinto, F Teixeira. Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population. 9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 – 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

- N Piloto, F Reis, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, J Sereno, E Costa, R Pinto, AF Pinto, L Ferreira, P Rocha-Pereira, A Santos-Silva, F Teixeira. Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model. 9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 – 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

# Índice

RESUMO/ABSTRACT .....	1
Resumo .....	3
Abstract .....	6
A - Introdução.....	9
I. Fisiopatologia do Cancro da Bexiga.....	11
1- Características anátomo-histopatológicas da via urinária normal .....	13
2- Características morfológicas e histopatológicas do carcinoma vesical .....	15
2.1- Classificação histológica e significado prognóstico.....	16
2.2- Classificação quanto ao estadiamento .....	20
3- Epidemiologia do cancro da bexiga .....	23
4- Fisiopatologia do carcinoma da bexiga .....	26
4.1- Factores de risco .....	26
4.1.2- Alterações genéticas .....	28
4.1.3- Outros mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga .....	32
4.1.3.1 – O papel da inflamação na carcinogénese.....	32
4.1.3.2 – Stresse Oxidativo .....	32
4.1.3.3 – Formação de ROS .....	33
4.1.3.4 – Funções fisiológicas e fisiopatológicas das ROS .....	34
4.1.3.5 – Peroxidação lipídica.....	35
4.2 - Biomarcadores tumorais .....	35
4.2.1- Biomarcadores para o efeito da vigilância do tumor da bexiga .....	35
4.3- Sintomas e diagnóstico clínico do carcinoma da bexiga.....	38
4.4- Tratamento e sobrevivência .....	38
II. Modelo Animal de Indução do Carcinoma pelo BBN .....	41
III. Uso das Estatinas na Prevenção Tumoral .....	47
1- Introdução.....	49
2- Via do Mevalonato .....	50
2.1- Bioquímica da via do mevalonato .....	51
2.2- Via do mevalonato como alvo terapêutico.....	53
2.3- HMG-CoA reductase .....	53
3- Mecanismo de Acção das Estatinas .....	54
4- Propriedades Farmacodinâmicas.....	54

5- A Atorvastatina .....	56
5.1- Estrutura .....	57
5.2- Propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas .....	57
Absorção.....	58
Distribuição .....	59
Metabolismo .....	59
Excreção .....	59
Propriedades farmacodinâmicas.....	60
6- As estatinas na prevenção da carcinogénese .....	60
B - Objectivos .....	67
C - Material e Métodos .....	73
1 – Animais e dieta: protocolo experimental.....	75
1.1 – Animais e acondicionamento .....	75
1.2 – Grupos em estudo .....	75
1.3 – Monitorização da massa corporal .....	79
1.4 – Monitorização da bebida ingerida .....	79
2 – Avaliação das pressões arteriais.....	79
3 – Colheita de sangue e recolha de órgãos .....	80
4 – Determinação de alguns parâmetros indicadores de trofismo.....	81
5 – Perfil bioquímico .....	81
5.1 – Perfil glicémico .....	81
5.2 – Avaliação da função renal .....	82
5.2.1 – Creatinina .....	82
5.2.2 – Ácido úrico.....	82
5.2.3 – Azoto ureico .....	83
5.3 – Avaliação da função hepática.....	83
5.3.1 - Transaminase glutamo-oxaloacética (TGO) .....	84
5.3.2 – Transaminase glutamo-pirúvica (TGP) .....	84
5.4 – Avaliação do perfil lipídico .....	85
5.4.1 – Determinação das concentrações de colesterol total, lipoproteínas e triglicéridos.....	85
6 – Hemograma .....	86
7 – Equilíbrio oxidativo.....	86
7.1 – Doseamento de TBARs ( <i>Tiobarbituric Acid Reactive substances</i> ) .....	87

7.2 – Doseamento da capacidade antioxidante total (TAS).....	87
8 – Estudo Histomorfológico da bexiga.....	88
8.1 – Processamento das amostras para histopatologia .....	88
8.2 – Obtenção das secções .....	89
8.3 – Técnicas histológicas .....	89
8.3.1 – Hematoxilina-Eosina.....	90
9 – Estudo de marcadores de proliferação, carcinogénese e inflamação .....	90
9.1 – Fundamento geral do método micro ELISA em “Sandwich” .....	91
10 – Tratamento estatístico dos resultados.....	92
D - Resultados .....	93
1 – Avaliação da massa corporal e da bebida ingerida .....	95
1.1 – Registo da massa corporal.....	95
1.2 – Monitorização da quantidade de bebida ingerida .....	97
2 – Glicemia .....	99
3 – Pressão arterial e função cardíaca .....	100
3.1 – Pressões arteriais e frequência cardíaca .....	100
3.2 – Indicadores de trofismo cardíaco.....	103
3.3 – Actividade enzimática da creatina cinase (CK).....	104
4 – Função Renal .....	105
4.1 – Parâmetros séricos .....	105
4.2 – Indicadores de trofismo renal .....	106
5 – Função Hepática .....	107
5.1 – Parâmetros séricos .....	107
5.2 – Indicadores de trofismo hepático .....	109
6 – Perfil Lipídico .....	110
6.1 – Parâmetros séricos .....	110
6.2 – Índices aterogénicos.....	112
7 – Hemograma .....	113
7.1 – Indicadores plaquetares .....	113
7.2 – Indicadores eritrocitários .....	114
8 – Equilíbrio Oxidativo .....	115
8.1 – Peroxidação lipídica (MDA) .....	115
8.2 – Capacidade antioxidante total .....	116
8.3 – Razão MDA/TAS em soro .....	117

9 – Histomorfologia da bexiga .....	118
9.1 – Avaliação do perfil macroscópico.....	118
9.2 – Avaliação do perfil microscópico.....	124
9.3 – Avaliação quantitativa e qualitativa do tumor da bexiga.....	128
10 – Marcadores inflamatórios e tumorais.....	130
10.1 – Marcadores inflamatórios .....	130
10.2 – Marcadores tumorais .....	132
E - Discussão .....	133
F - Conclusões.....	133
G - Referências Bibliográficas.....	133
H - Abreviaturas.....	133



**RESUMO/ABSTRACT**



## RESUMO

No mundo ocidental, o cancro da bexiga ocupa o quarto lugar no *ranking* das neoplasias mais frequentes nos homens e o oitavo nas mulheres e contabiliza 5 a 10% de todas as patologias no sexo masculino. É uma neoplasia com taxas de incidência e prevalência preocupantes, para além de ter elevados custos socioeconómicos.

Os índices de mortalidade, ainda que elevados, têm vindo a diminuir nos últimos anos devido a uma detecção mais precoce e a melhorias na sobrevivência; no entanto, ainda não é suficiente para causar impacto positivo na morbilidade e mortalidade globais. Por estas razões, tornou-se importante a realização de mais estudos no sentido de descobrir os mecanismos fisiopatológicos associados ao cancro da bexiga, quer a nível celular quer molecular, uma vez que só a partir destes se poderá, com maior eficácia, testar fármacos com potencial preventivo que revertam esses mecanismos.

O modelo de indução de carcinoma da bexiga por nitrosaminas, em particular o N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina – BBN – em ratos Wistar tem sido o modelo mais utilizado no estudo da fisiopatologia do tumor e dos efeitos terapêuticos de alguns fármacos, devido às semelhanças histológicas com o carcinoma da bexiga nos humanos.

Estudos anteriores sugeriram alguns fármacos com potencial efeito na prevenção do carcinoma, especialmente pela sua possível interferência em mecanismos de proliferação, stresse oxidativo e inflamação.

Um dos fármacos de potencial interesse são os inibidores da reductase da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA), mais conhecidos por estatinas, que, para além das propriedades anti-dislipidémicas, são-lhes atribuídas outras capacidades, conhecidas como efeitos pleiotrópicos, que podem aqui ter um papel fulcral na prevenção do desenvolvimento tumoral.

O objectivo final deste estudo, composto por duas fases distintas, consistiu na avaliação das potencialidades das estatinas, em particular a atorvastatina, na terapêutica preventiva do carcinoma da bexiga. A primeira fase do estudo tinha como finalidade a caracterização e validação do modelo de carcinoma da bexiga induzido por BBN em ratos Wistar machos e a segunda fase compreendeu a avaliação da capacidade da atorvastatina na prevenção do desenvolvimento do carcinoma da bexiga, tanto em monoterapia de baixa e alta dose, como em associação com um inibidor selectivo da ciclooxigenase-2 (COX-2) – celecoxibe.

Para alcançar os objectivos propostos, foi elaborado um protocolo experimental que envolveu 7 grupos: i) grupo Controlo- apenas veículo; ii) grupo EST (30 mg), administrado com

30 mg/Kg/dia de atorvastatina (Zarator®); iii) grupo CEL (10 mg), tratado com 10mg/Kg/dia de celecoxibe (Celebrex®); iv) grupo BBN, administrado com BBN (0,05%); v) grupo preventivo EST (30 mg) + BBN, tratado com 30 mg/Kg/dia de atorvastatina e BBN; vi) grupo preventivo EST (3 mg) + BBN, ao qual foram fornecidas 3 mg/Kg/dia de atorvastatina e BBN e vii) grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, com administração simultânea de 3 mg/Kg/dia de atorvastatina e de 1 mg/Kg/dia de celecoxibe, e BBN.

Os fármacos foram dissolvidos em sumo de laranja e administrados por via oral, e o BBN foi diluído na água de bebida (*ad libitum*), ambos durante as primeiras 8 semanas. Atingidas as 20 semanas de tratamento, procedeu-se à colheita de sangue dos ratos, para posterior análise de vários parâmetros bioquímicos, e de seguida foram sacrificados para efectuar a colheita de órgãos.

Foram efectuadas uma avaliação histomorfológica qualitativa (obtida da microscopia) e uma avaliação quantitativa da percentagem de tumores por grupo, número de tumores por rato e volume tumoral. O estudo histomorfológico foi complementado com a determinação de concentrações séricas de alguns marcadores tumorais (TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6 e PCR) e de equilíbrio oxidativo (MDA e TAS). Os parâmetros hemodinâmicos foram também analisados, nomeadamente pressões arteriais, perfil glicémico, função renal e hepática, perfil lipídico e hemograma ao nível plaquetar e eritrocitário, assim como apreciados os indicadores de trofismo cardíaco, renal e hepático.

Os resultados obtidos no grupo BBN em relação ao grupo Controlo demonstraram uma elevada percentagem de tumores (65%), acompanhada por um número médio de tumores por rato de 1,2 e de um elevado volume tumoral médio (cerca de 720 mm<sup>3</sup>). Neste grupo constatou-se a presença de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas como hiperplasias, displasias de alto e de baixo grau, tumores papilares, além da evidente atrofia do urotélio e metaplasia epidermóide. Como complemento destas observações, os marcadores de lesão tumoral manifestaram um aumento tendencial da concentração sérica de TGF- $\beta$  e de TNF- $\alpha$  e os valores dos marcadores inflamatórios apresentaram um aumento bastante significativo dos níveis de PCR e de IL-6 no soro. Assim, com os resultados obtidos a fim de caracterizar e validar o modelo de carcinoma da bexiga induzido por BBN em ratos Wistar é possível afirmar que o modelo experimental escolhido é válido e adequado.

Relativamente à segunda fase dos objectivos deste estudo, os resultados mostraram que as doses de 3 mg e de 30 mg, reduziram o desenvolvimento neoplásico, embora a dose mais baixa se tenha mostrado mais eficaz, uma vez que se verificou uma inibição do crescimento tumoral para 12,5% dos ratos, o que significa que apenas um rato apresentou os 2 únicos tumores registados com um volume tumoral total de 4,7 mm<sup>3</sup>. O tipo de lesões

reveladas pela avaliação histomorfológica foram notavelmente mais moderadas e em menor número, especialmente no grupo EST (3 mg) + BBN. Relativamente aos marcadores tumorais e inflamatórios verificou-se uma diminuição bastante significativa das concentrações de TNF- $\alpha$ , de IL-6 e de PCR.

A associação da atorvastatina ao celecoxibe não potenciou o efeito benéfico que cada um dos fármacos demonstra isoladamente, uma vez que se verificou em 50 % dos ratos a presença de 3 tumores e um volume tumoral total de 27,6 mm<sup>3</sup>. Os resultados sugerem que parecem existir mecanismos exercidos por parte dos dois fármacos que se sobrepõem negativamente.

Concluindo, este estudo confirma a eficácia do protocolo no desenvolvimento tumoral, revelando lesões pré-neoplásicas e neoplásicas leves a moderadas, não invasivas. Por outro lado, a atorvastatina é um fármaco eficaz na prevenção do carcinoma da bexiga, se os seus efeitos anti-proliferativos, antioxidantes e anti-inflamatórios aqui evidenciados, bem como as questões levantadas, forem confirmados em estudos posteriores do trabalho.

**ABSTRACT**

In the Western world, bladder cancer is the fourth most common malignancy in men and the eighth in women and accounts for 5-10% of all malignancies in men. It's a neoplasia with concerning incidence and prevalence rates, besides the high socioeconomic costs.

The mortality rates, although high, have been decreasing in the last years, due to an early detection and survival improvements; however, it is not yet enough to cause a positive impact in the global morbidity and mortality. For these reasons, further studies are needed in order to search for the physiopathology mechanisms associated to bladder cancer, at a cellular and molecular level. Only these could allow, with higher efficiency, test drugs with a tumor preventive capacity that will reverse underlying mechanisms.

The experimental model of nitrosamines-induced bladder cancer, namely by the N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine – BBN – in Wistar rats, have been the most used model in the study of the tumor physiopathology as well the therapeutics effects of some drugs, due to the histological resemblance to human bladder cancer.

Previous studies have suggested some drugs with potential effect for tumor prevention, in particular the possible influence in proliferation, oxidative stress and inflammation.

Of potential interest are the 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) inhibitors, also known as statins, which, besides the anti-dyslipidemic properties, have other capabilities attributed to pleiotropic effects, which could have an important role in the tumor growth.

The final aim of this study, divided in two distinct parts, consisted in assessment of the statins potential, atorvastatin in particular, in the bladder cancer preventive therapy. The first part of this study had as a goal the characterization and validation of the BBN-induced bladder cancer in Wistar male rats and a second part to assess the atorvastatin ability in the development and prevention of the bladder cancer, either in the low and high dose monotherapy, or in association with a selective inhibitor of the cyclooxygenase-2 (COX-2) – celecoxib.

In order to achieve our objectives, an experimental procedure was designed, involving seven groups: i) Control group – vehicle only; ii) EST (30 mg) group – administrated with atorvastatin 30 mg/Kg/day (Zarator®); iii) CEL (10 mg) – treated with 10 mg/Kg/day of Celecoxib (Celebrex®); iv) BBN group, administrated with BBN (0,05%); v) EST (30 mg) + BBN preventive group, treated with BBN and 30 mg/Kg/day of atorvastatin; vi) EST (3 mg) + BBN preventive group, which were given BBN and 3 mg/Kg/day and vii) EST (3 mg) + CEL (1 mg) +

---

BBN synergistic group, with simultaneous administration of BBN, 3 mg/Kg/day of atorvastatin and 1 mg/Kg/day of celecoxib.

The drugs were dissolved in orange juice and administered orally and the BBN was diluted in drinking water (*ad libitum*), both during the first 8 weeks. When 20 weeks of treatment were reached, blood samples were taken for analysis of several biochemical parameters, after which the rats were sacrificed in order to harvest their organs.

A qualitative histomorphological evaluation (by microscopy) was made, as well as a quantitative assessment of the tumor percentage per group, number of tumors per rat and tumor volume. The histomorphological study was complemented with the determination of serum concentration of some tumor markers (TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-6 and PCR) and oxidative balance (MDA and TAS). Haemodynamic parameters were also analyzed, namely blood pressure, glycaemia, renal and liver functions, lipid profile and haemogram at platelets and red blood cells levels, as well as cardiac, renal and liver trophism.

The BBN results, regarding the Control group, has demonstrate an higher percentage of tumors (65%), with an average number of tumors of 1.2 and an higher average tumor volume (around 720 mm<sup>3</sup>). In this group we observed the presence of pre-neoplastic and neoplastic lesions, such as hyperplasias, high and low grade dysplasias, papilar tumors, and also an evident atrophy of the urothelium and epidermoid metaplasia.

Complementing these observations, the tumor lesion markers have revealed a trend to increase in serum TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentrations and the inflammatory markers values have shown a significant increase of serum PCR and IL-6 levels. Hence, with the results gathered with the goal of characterize and validate the BBN-induced bladder cancer in Wistar rats, it is possible to confirm that the experimental model is valid and adequate.

Regarding the second goal of the study, results have shown that 3 mg and 30 mg dosage reduced de neoplastic development, although the lower dosage has proven to be more effective, since we could verify the inhibition of tumor growth for 12.5% of the rats, which means that only one rat had the 2 registered tumors with a tumor volume of 4.7 mm<sup>3</sup>. The type of injuries resulting from the histomorphologic evaluation were notably moderate and fewer, especially in EST (3 mg) + BBN group. In respect of tumor and inflammatory markers, there was a significant decrease in serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6 and PCR. Atorvastatin-associated celecoxib did not potentiate de beneficial effect that each drug shows alone, since we verify, in 50% of rats, the presence of 3 tumors and a total tumor volume of 27.6 mm<sup>3</sup>. The results suggest that there are mechanisms exerted by those drugs that negatively overlapping.

In conclusion, this study confirms the efficiency of this procedure in tumor development, revealing low and moderate pre-neoplastic and neoplastic lesions, non-invasives. Also, atorvastatin is an effective drug in preventing bladder cancer, if the anti-proliferative, antioxidant and anti-inflammatory effects here highlighted, as well as if the issues now raised, will be further confirmed.



# INTRODUÇÃO



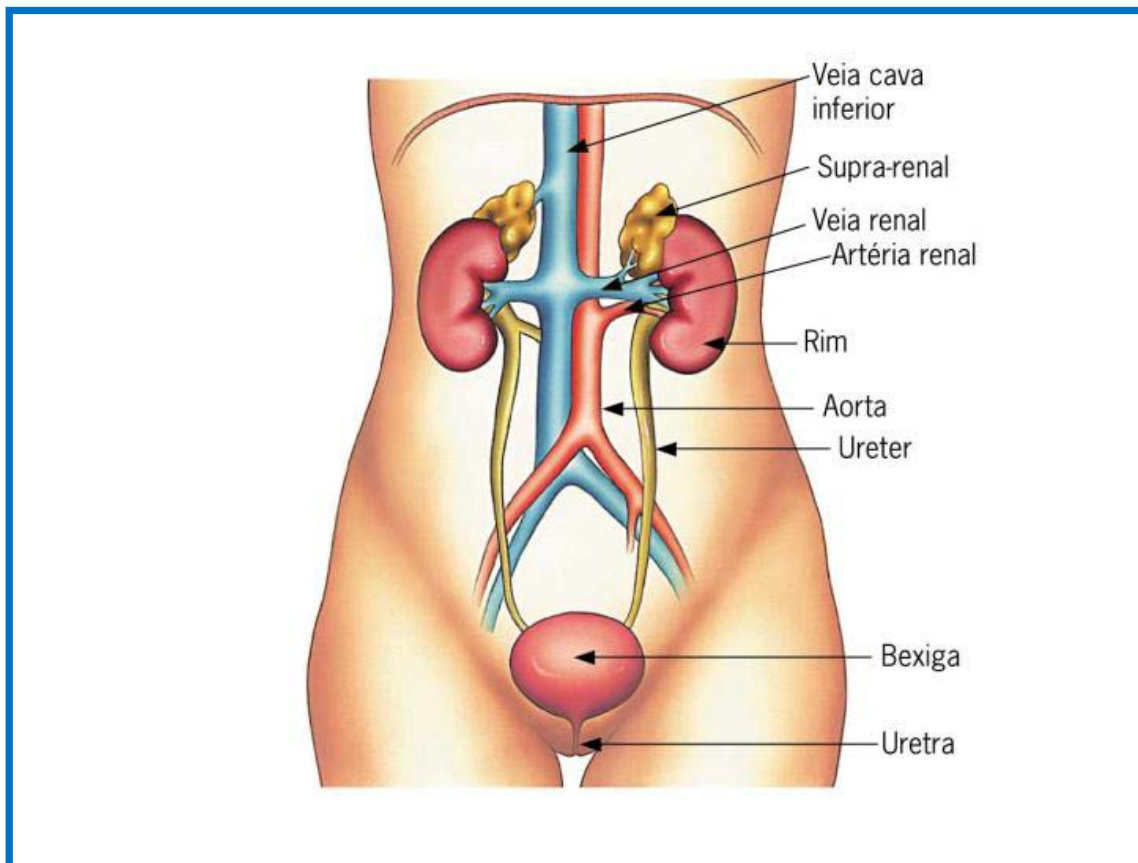


# I. FISIOPATOLOGIA DO CANCRO DA BEXIGA



## 1- CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICAS DA VIA URINÁRIA NORMAL

A bexiga é um órgão oco que faz parte do aparelho urinário e funciona como um depósito provisório da urina proveniente dos rins, até à sua posterior eliminação (Figura 1). Situa-se na parte inferior do abdómen e é revestida pelo urotélio.



**Figura 1** – Anatomia do Sistema Urinário

**Fonte:** César e Sezar, Biologia, Editora Saraiva.

A parede da bexiga é composta por diversos tecidos que se adequam à sua função. Assim, de acordo com o volume de urina que a bexiga apresente, esta pode assumir diferentes conformações. Quando tem grandes volumes de urina, a bexiga está distendida, adquirindo uma forma de balão. Se, pelo contrário, estiver vazia, a bexiga apresenta invaginações.

A base morfofuncional é o músculo vesical (*muscularis própria*) que, impermeabilizado pelas células epiteliais, inclui a parede muscular da bexiga. Esta é constituída por três camadas de músculo liso e fibras elásticas que se contraem durante a micção.

Externamente, este órgão está envolvido por tecido adiposo e conjuntivo, denominado pericisto, por onde passam os vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos.

A mucosa da bexiga é composta por um epitélio de transição – designado urotélio – e por uma lâmina própria, composta por tecido conjuntivo laxo.

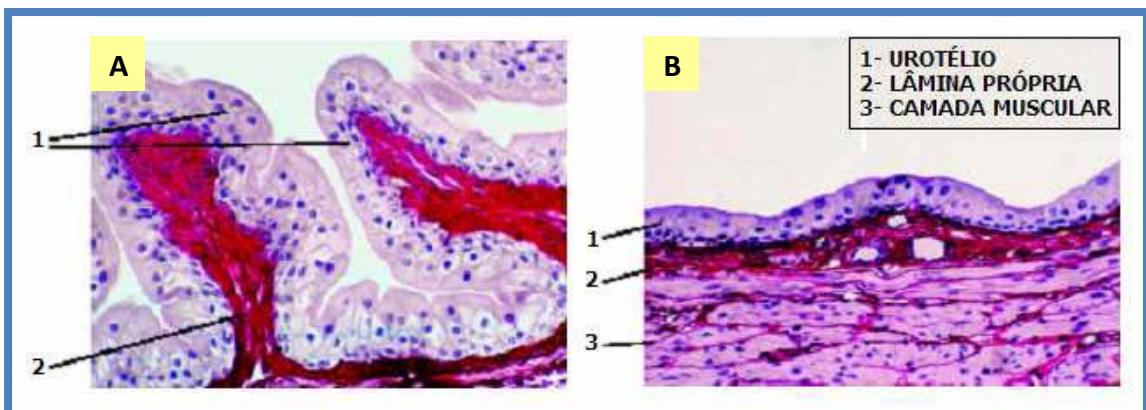
O urotélio modifica-se para se adaptar às variações fisiológicas da bexiga e, por isso, é poliestratificado, sendo constituído por 3 a 7 camadas de células de transição, e compreende (Figura 2):

- Uma zona basal de células compactas e cúbicas/cilíndricas;
- Uma camada intermédia de células mais poligonais com núcleos alongados perpendiculares à membrana basal;
- Uma camada superficial de células maiores, com citoplasma abundante, dispostas paralelamente à membrana basal, conhecidas por células em “guarda-chuva”.

As células em guarda-chuva têm características singulares, nomeadamente especializações da membrana plasmática que lhes permite manter a impermeabilidade permanente do epitélio à urina e a produtos tóxicos que esta contenha.

A transformação tumoral do urotélio pode suceder da mesma forma em todo o tracto urinário, já que este tipo de epitélio reveste grande parte dos constituintes do aparelho urinário. No entanto, a frequência do aparecimento de tumores é bastante diferente, já que cerca de 90% dos tumores uroteliais são formados na bexiga.

A localização da bexiga varia entre o homem e a mulher, tendo em conta as diferentes fisionomias. Anatomicamente, está em contacto, na posição anterior, com a sínfise púbica e a parede abdominal, e posteriormente com o recto no homem e com a vagina na mulher.



**Figura 2** – Corte da bexiga vazia (A) e cheia (B) e respectivas camadas celulares.

**Fonte:** Adaptado do livro *Histologia Básica* de Junqueira L. C e col., 2004.

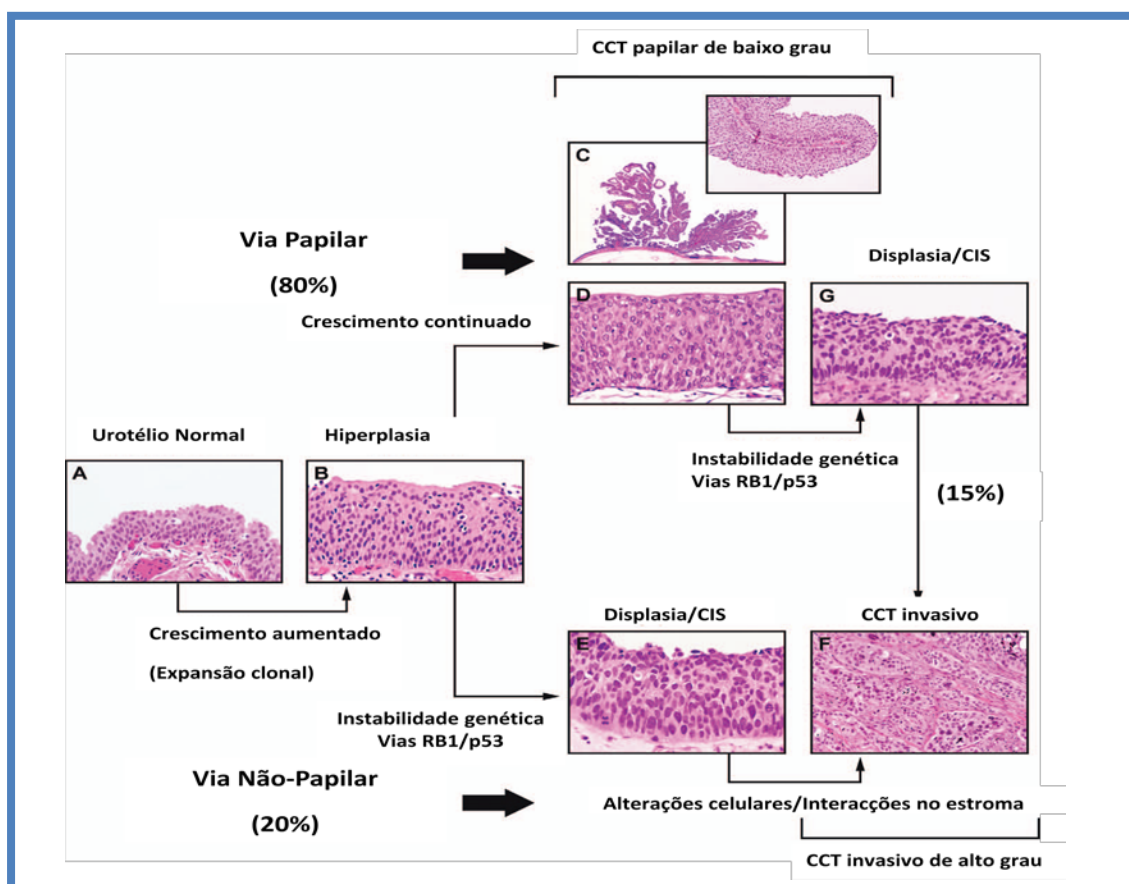
## 2- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO CARCINOMA VESICAL

O primeiro passo da transformação maligna da bexiga é intraepitelial.

O urotélio estabelece uma barreira de permeabilidade entre a urina e o sangue, o que permite que este epitélio esteja constantemente exposto a uma variedade de potenciais carcinogénios. Por esta razão, o tumor da bexiga é a neoplasia mais comum do tracto urinário (Wu, 2005).

Do ponto de vista histológico, mais de 90% dos casos de tumor da bexiga são carcinomas uroteliais (ou carcinomas de células de transição), aproximadamente 5% são carcinomas escamosos e menos de 2% são adenocarcinomas. Estes últimos tipos histológicos, bem como outros ainda mais raros, são geralmente classificados como carcinomas uroteliais com diferenciação divergente. Surgem, da mesma forma, nas células uroteliais, o que demonstra a natureza pluripotente do urotélio (Pasin e col., 2008).

Os carcinomas uroteliais da bexiga emergem a partir de diferentes mecanismos, surgindo duas variantes fenotípicas histopatologicamente diferentes (Figura 3).



**Figura 3** – Representação esquemática do urotélio normal (A) e desenvolvimento dos diferentes tipos de neoplasias uroteliais: hiperplasia urotelial (B), carcinoma urotelial papilar de baixo grau (superficial) - CCT (C e D), displasia severa/carcinoma *in situ* - CIS (E), carcinoma urotelial não-papilar de alto grau (invasivo) (F) e displasia severa desenvolvida na mucosa da bexiga, adjacente ao tumor papilar de baixo grau (G).

Cerca de 70 a 80% dos tumores são carcinomas papilares confinados ao urotélio e lâmina própria. Geralmente, apresentam um baixo grau de malignidade, uma vez que têm origem em lesões hiperplásicas, que correspondem ao aumento do número de camadas celulares do urotélio, sem que a sua morfologia seja alterada. Apesar das recidivas serem comuns, raramente ocorre progressão da patologia. Por outro lado, 20 a 30% dos carcinomas uroteliais têm morfologia não-papilar e são invasivos, o que confere maior potencial de invasão e metastização. Esta variante agressiva ocorre *de novo*, surgindo a partir de neoplasias intrauroteliais de alto grau (displasia ou carcinoma *in situ*) (Wu, 2005; Spiess e col., 2006).

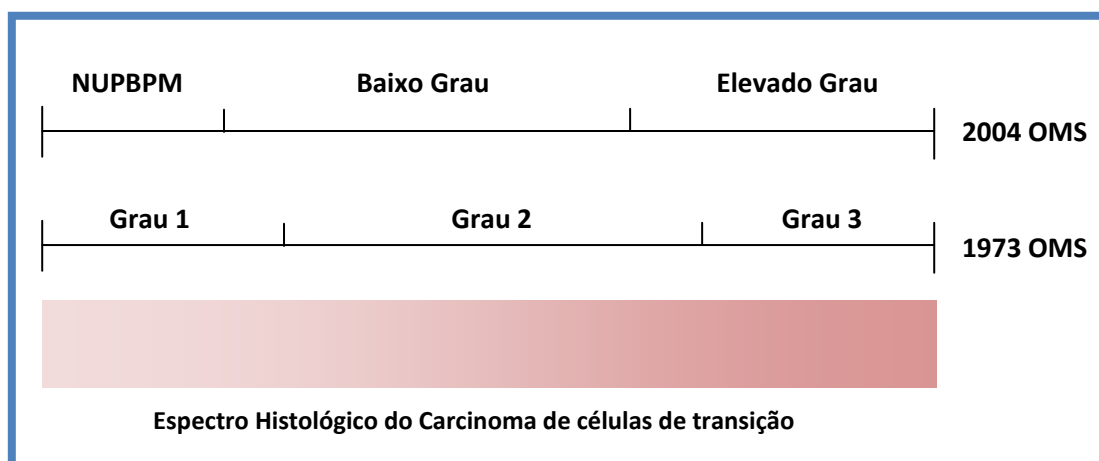
## 2.1- Classificação histológica e significado prognóstico

O carcinoma da bexiga é classificado como superficial se a lesão se estende apenas até à lâmina própria. Quando ultrapassa esta camada celular é considerado invasivo (Redman e col., 2005; Epstein e col., 1998; Droller e col., 2000).

Um dos factores clássicos de prognóstico dos carcinomas da bexiga é o grau de diferenciação, recorrendo-se a critérios morfológicos relacionados com o padrão de alterações citológicas e estruturais do urotélio. A polarização das células e dos núcleos, a atipia citológica (tamanho e forma do núcleo), as características da cromatina nuclear e a frequência de mitoses são pontos relevantes na determinação do prognóstico do tumor da bexiga. Outro factor de prognóstico clássico é o grau de invasão da parede da bexiga (Algaba e col., 2000; MacLennan, 2007).

O carcinoma superficial da bexiga engloba um conjunto de tumores que podem variar no grau de diferenciação e no tipo de morfologia, podendo ocorrer dois padrões de crescimento distintos. De uma forma geral, os tumores superficiais podem ser papilares ou planos. Os tumores papilares são constituídos por proliferações do epitélio urotelial em torno de um eixo estromal fibrovascular. Se a arquitectura de neoformação epitelial é plana, o carcinoma recebe a designação de carcinoma *in situ* (Pasin e col., 2008; Algaba e col., 2000).

Foram elaborados vários esquemas de classificação dos tipos de carcinomas superficiais da bexiga (Figura 4). No entanto, permanecem controvérsias no que diz respeito aos critérios de inclusão e nomenclatura, principalmente de tumores papilares (MacLennan e col., 2007).



**Figura 4** – Correspondência entre a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1973 e de 2004 para carcinomas uroteliais da bexiga.

Alguns carcinomas de grau 1 do esquema de classificação de 1973 da OMS assumem uma nova posição em 2004, uns para a categoria da neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno (NUPBPM) e outros para a categoria de baixo grau. De forma idêntica, os carcinomas de grau 2 da classificação de 1973 da OMS passam a assumir novas categorias em 2004. Dos carcinomas de grau 2, uns são considerados carcinomas de baixo grau, e outros já são carcinomas de elevado grau.

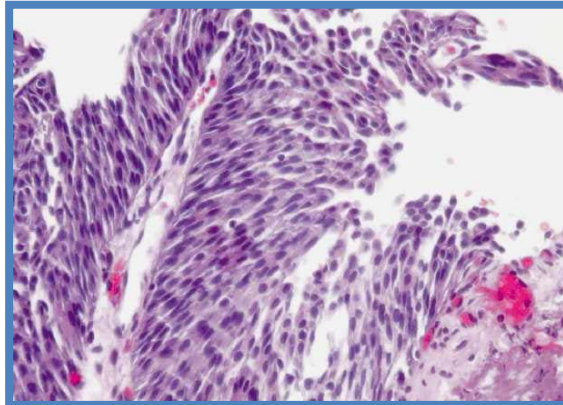
Os carcinomas considerados de grau 3 (em 1973) passam a pertencer à categoria de elevado grau em 2004.

**Fonte:** Adaptado de MacLennan e col., 2007

O sistema de classificação mais recente da OMS (2004) é idêntico à classificação proposta em 1998 pela Sociedade Internacional da Patologia Urológica e diferencia papiloma, neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno (NUPBPM) e carcinoma papilar de baixo e alto grau. Os principais objectivos deste sistema são eliminar a definição de “carcinoma” para um grupo significativo de doentes, por um lado, e criar uma melhor definição de critérios para os diferentes graus, por outro (Columbel e col., 2008, MacLennan e col., 2007).

Apesar de existir muita discordância quanto à definição dos papilomas, considera-se que são lesões papilares benignas nas quais o eixo fibrovascular é revestido por um urotélio praticamente normal, embora possa surgir alguma atipia celular na camada superficial. Os papilomas representam 1 a 3% das neoplasias da bexiga e surgem, na maioria dos casos, em indivíduos jovens. Por vezes ocorrem recidivas, no entanto não há geralmente o risco de progressão (McKenney e col., 2003; Montironi e col., 2008).

A NUPBPM (Figura 5) é definida por uma lesão em que as papilas têm uma espessura maior relativamente aos papilomas. Apresenta alguma atipia celular, embora a polaridade celular se mantenha. As mitoses são raras e limitadas à camada basal. Ocorrem recidivas em aproximadamente 29% dos casos, mas o risco de progressão é baixo. No entanto, estes tumores não são considerados lesões totalmente benignas (Kirkali e col., 2005; Jones e col., 2006).

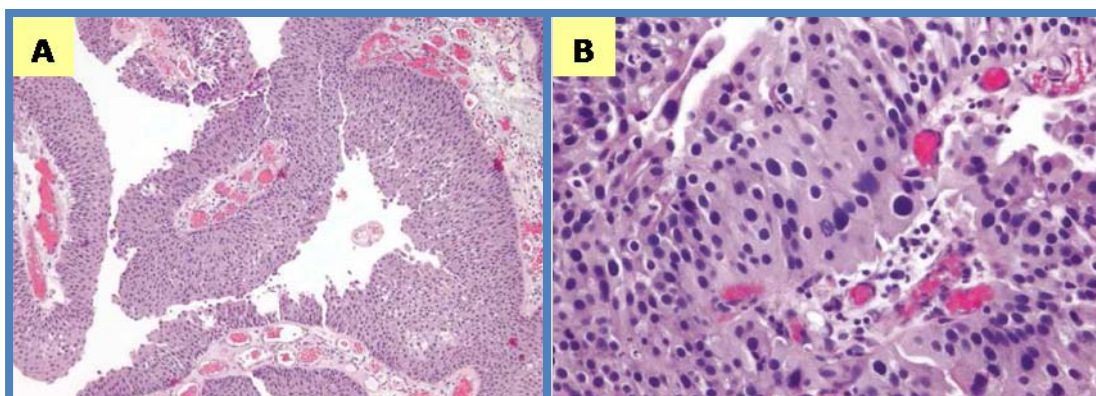


**Figura 5** – Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno.

**Fonte:** Kirkali e col., 2005

No carcinoma urotelial papilar de baixo grau (também conhecido por displasia intraurotelial), ilustrado na Figura 6A, a espessura do urotélio é, geralmente, normal, embora possa aumentar ou diminuir. Este tipo de carcinoma é caracterizado por uma atipia celular mais evidente do que na NUPBPM, mas não tão severa como no carcinoma *in situ*. Há perda da polaridade celular em diferentes áreas, nucleomegalia e mitoses ocasionais. A lâmina própria permanece, geralmente, inalterada mas é susceptível a uma inflamação aumentada e/ou neovascularidade. Estes tumores têm um risco maior de recidiva (65 a 70%) e de progressão (entre 10 a 15%) (Montironi e col., 2008).

O carcinoma papilar de alto grau (Figura 6B) é caracterizado pela predominância de desordem, com um pleomorfismo nuclear acentuado. Há atipia celular severa e ocorre perda da polaridade celular. Estes tumores apresentam uma taxa de progressão muito elevada (Kirkali e col., 2005).

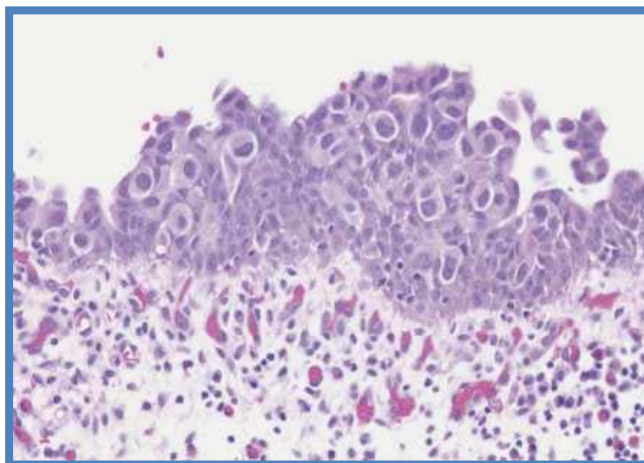


**Figura 6** – Carcinoma urotelial de baixo (A) e alto grau (B).

**Fonte:** Kirkali e col., 2005

O carcinoma *in situ* (CIS) (Figura 7), apesar de ser considerado um tumor superficial, é identificado pela presença de células com núcleo hiper cromático e irregular. A espessura do urotélio pode ser menor ou normal, mas a desorganização celular é evidente e há alteração ou perda completa da polaridade das células (Montironi e col., 2008). Estes tumores são considerados carcinomas de alto grau, com um elevado risco de progressão.

Existe uma relação entre o desenvolvimento de CIS e a presença simultânea de tumores papilares. A maioria dos carcinomas *in situ* está associada a formas papilares, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de tumores invasivos. Por esta razão, a ocorrência de carcinomas *in situ* é considerada precursora da variante mais agressiva de carcinomas uroteliais (Kirkali e col., 2005; Montironi e col., 2008; Wu, 2005).



**Figura 7** – Carcinoma urotelial *in situ*.

**Fonte:** Kirkali e col., 2005

O grupo dos carcinomas uroteliais invasivos envolve, como já foi referido anteriormente, tumores de morfologia não-papilar que invadem a parede muscular da bexiga em maior ou menor extensão, apresentando, por isso, alto poder de invasão e metastização. Ocorrem especialmente em indivíduos sem historial prévio de carcinomas uroteliais papilares, apesar de cerca de 10 a 15% terem origem, por progressão, a partir de tumores papilares superficiais de baixo grau de malignidade. Habitualmente são indiferenciados, exibindo características histopatológicas agressivas e, como tal, estão associados a prognósticos adversos (Wu, 2005; Spiess e col., 2006).

## 2.2- Classificação quanto ao estadiamento

O sistema de classificação de estadiamento facilita não só a compreensão da associação entre as diferentes características histológicas do tumor e o prognóstico como também a análise do tratamento de resultados de tumores num dado estágio, permitindo comparações entre os diferentes tratamentos que deverão ser adoptados.

Tradicionalmente, o sistema de classificação do estadiamento do tumor da bexiga tem correlacionado o prognóstico com a profundidade da invasão de um tumor no interior e através das diferentes camadas celulares da parede da bexiga.

É de realçar que o sistema de estadiamento não é significado da representação da história natural de uma doença. Apenas descreve a histologia de um tumor de forma “momentânea”, a sua aparência num dado tempo, permitindo indicar a sua forte actividade num contexto histórico.

O método de classificação quanto ao estadiamento, desenvolvido por Jewett e Strong em 1946, sugeriu a distinção entre tumor “superficial” e “invasivo no tecido muscular” (Richie e col., 1999).

Ao longo de décadas, este sistema de classificação foi reajustado e foram acrescentadas classificações mais específicas, gerando novos sistemas de classificação.

Actualmente, o sistema de estadiamento aplicado na prática clínica é a classificação TNM, elaborada em 2002 pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). (Tabela 1)

O acrónimo TNM deriva das palavras “tumor”, “nódulos” e “metástases”. A letra “T” baseia-se na descrição da extensão do tumor, o “N” indica o envolvimento ou não de nódulos linfáticos (acompanhados pelo número de nódulos) e a letra “M” indica se existem ou não metástases em locais mais distantes.

A categoria de tumores superficiais divide-se em tumores apenas confinados ao urotélio (estádio Ta) e em tumores que atravessam o tecido conjuntivo sub-epitelial (estádio T1).

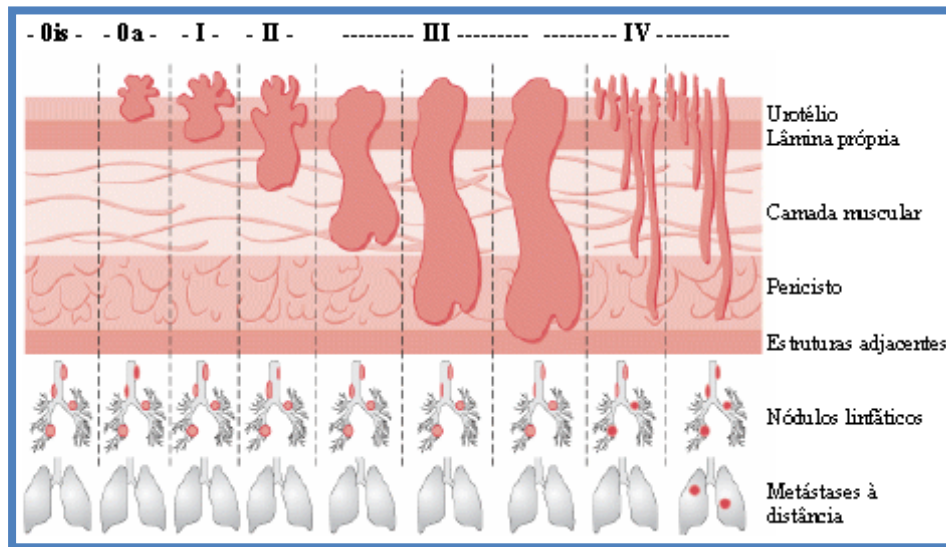
Muitos anos depois, foi reconhecido o carcinoma *in situ* (estádio Tis) e foi considerado independente dos outros tipos de tumor.

Os tumores invasivos, tal como a sua designação indica, invadem o tecido muscular de forma superficial (estádio T2a) ou mais profunda (estádio T2b), podendo também invadir a gordura perivesical macroscopicamente (estádio T3a) ou extensivamente (estádio T3b).

Os tumores que invadem estruturas adjacentes foram incluídos na categoria T4, sendo ainda subdivididos nas categorias T4a (caso invadam a próstata, a vagina ou o útero) e T4b (se tratar de um tumor fixo na parede pélvica ou abdominal).

Quando estas categorias são complementadas com informações anatomo-patológicas, utiliza-se o prefixo “p”.

A Figura 8 ilustra os diferentes tipos de tumor, tendo em conta a morfologia e a evolução, de acordo com o sistema de classificação TNM representado na tabela 1.



**Figura 8** – Representação esquemática da classificação do tumor vesical quanto ao estadiamento, segundo o sistema de classificação TNM.

**Fonte:** Adaptado de Kufe e col., 2003.

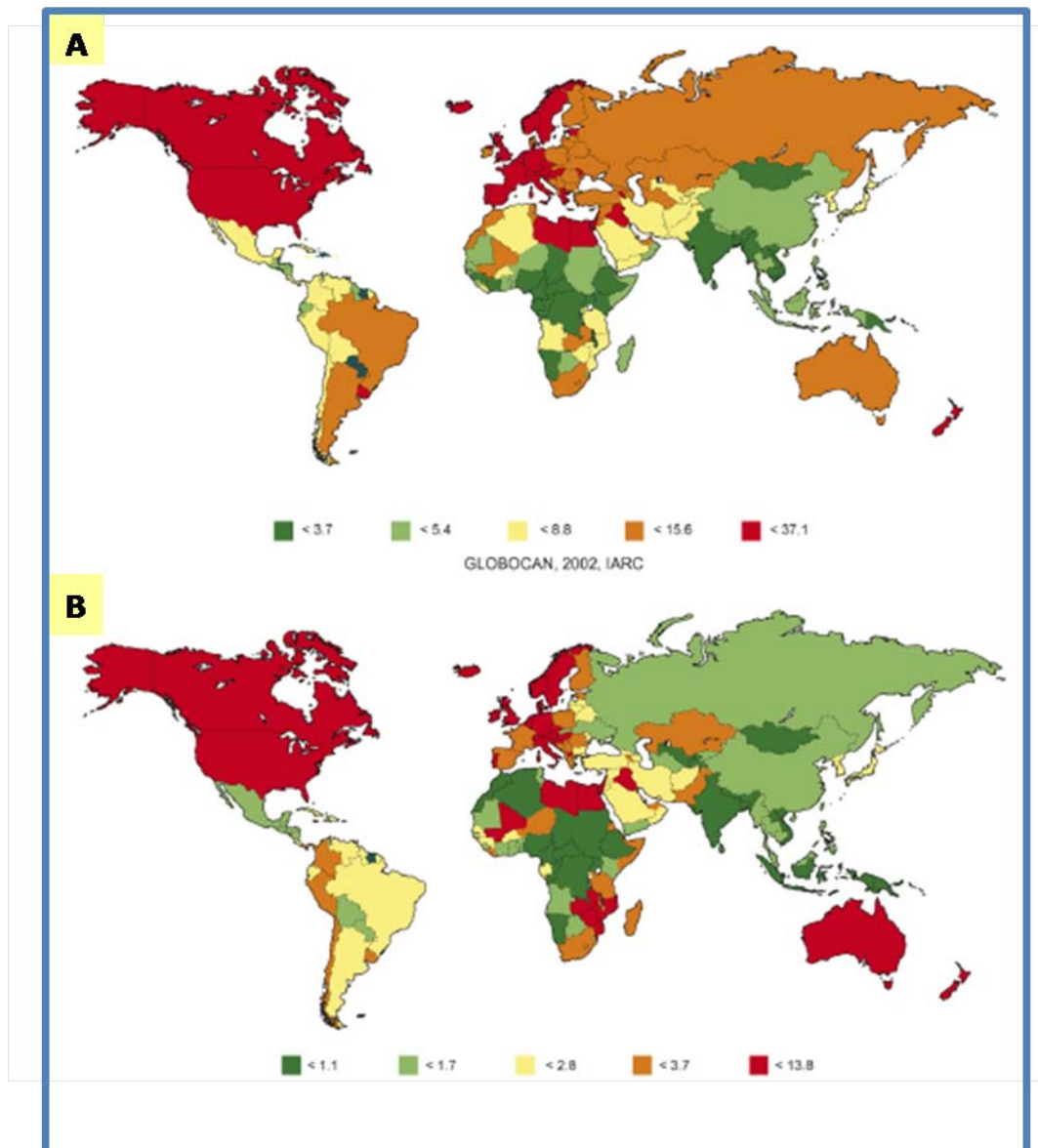
**Tabela 1-** Classificação do tumor quanto ao estadiamento, segundo o sistema de classificação TNM.

Tumor	Estádio	Descrição
Tumor primário (T)	TX	Incapacidade de avaliação do tumor primário
	T0	Nenhuma evidência de tumor primário
	Ta	Tumor papilar não-invasivo
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
	T1	Invasão do tecido conjuntivo sub-epitelial
	T2	Invasão do tumor no tecido muscular
	pT2a	Invasão superficial do tumor no tecido muscular
	pT2b	Invasão profunda do tumor no tecido muscular
	T3	Invasão do tumor no tecido perivesical
	pT3a	Invasão microscópica do tecido perivesical
	pT3b	Invasão macroscópica do tecido perivesical
	T4	Invasão do tumor nos seguintes órgãos: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal
	pT4a	Invasão do tumor na próstata, útero e vagina
	pT4b	Tumor invade a parede pélvica ou a parede abdominal
Nódulos linfáticos (N)	NX	Impossível avaliar os nódulos linfáticos
	N0	Ausência de metástases nos nódulos linfáticos
	N1	Metástases num único nódulo linfático, inferior a 2 cm
	N2	Metástases num único nódulo linfático superior a 2 cm e inferior a 5 cm Múltiplos nódulos linfáticos inferiores a 5 cm
	N3	Metástases em, pelo menos, um nódulo linfático superior a 5 cm
Metástases distantes (M)	MX	Impossível avaliar a presença de metástases
	M0	Ausência de metástases distantes
	M1	Metástases distantes

Fonte: Adaptado de Lerner e col., 2006

### 3- EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO DA BEXIGA

No mundo ocidental, o cancro da bexiga ocupa o quarto lugar no *ranking* das neoplasias mais frequentes nos homens e o oitavo nas mulheres e contabiliza 5 a 10% de todas as patologias no sexo masculino. É uma neoplasia com taxas de incidência e prevalência preocupantes, para além de ter um elevado custo socioeconómico (Grasso, 2008).



**Figura 9** – Estimativas das taxas de incidência, ajustadas por idade (por 100 000 habitantes), para tumores da bexiga em indivíduos do sexo (A) masculino e (B) feminino, a nível mundial, em 2002. **Fonte:** Ferlay col., 2002

Os dados mundiais revelam uma acentuada proporção na incidência deste tumor nos países ocidentais.

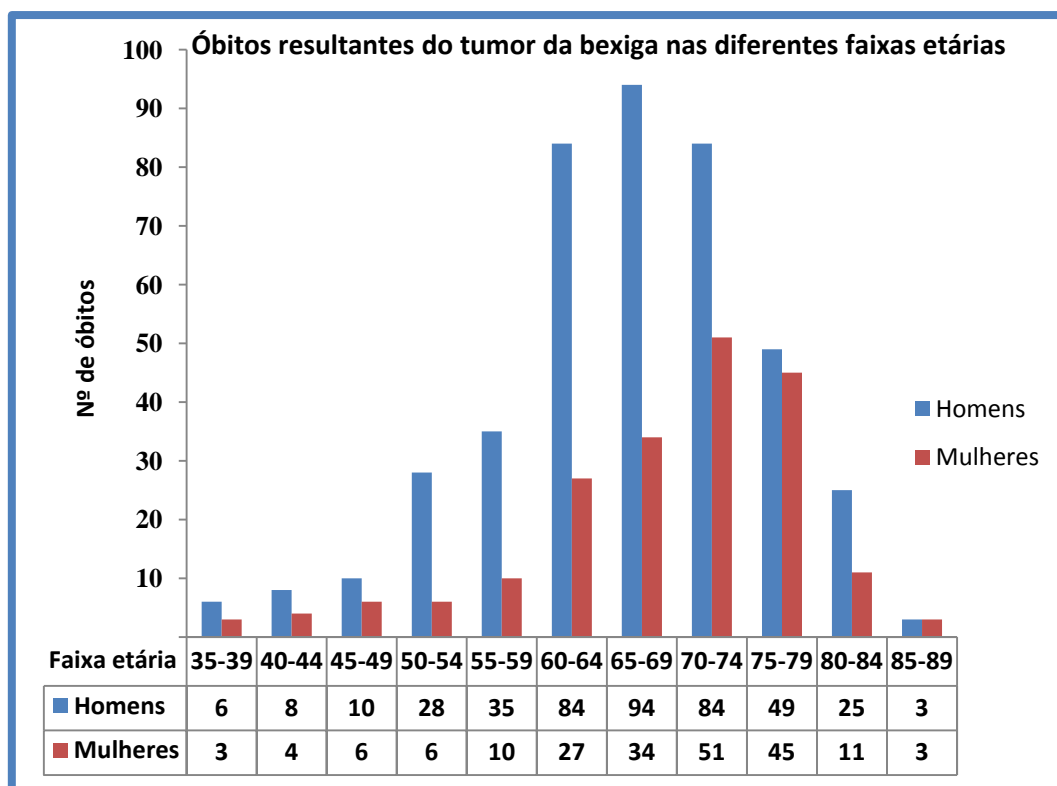
Em 2006, só na Europa, cerca de 104,400 casos de tumor da bexiga foram diagnosticados e a sua incidência poderá atingir a razão de 30/100,000 em alguns países (Ferlay e col., 2007; Kirkali e col., 2005).

Ao nível mundial, ilustrado na figura 9, a incidência do tumor da bexiga varia de forma significativa, com o Egito, a Europa Ocidental e a América do Norte a atingirem as taxas de incidência mais elevadas, ao contrário dos países asiáticos, com valores inferiores (Columbel e col, 2008).

Apesar desta doença poder ocorrer em jovens, mais de 90% de novos casos ocorrem em pessoas com idades iguais ou superiores a 55 anos.

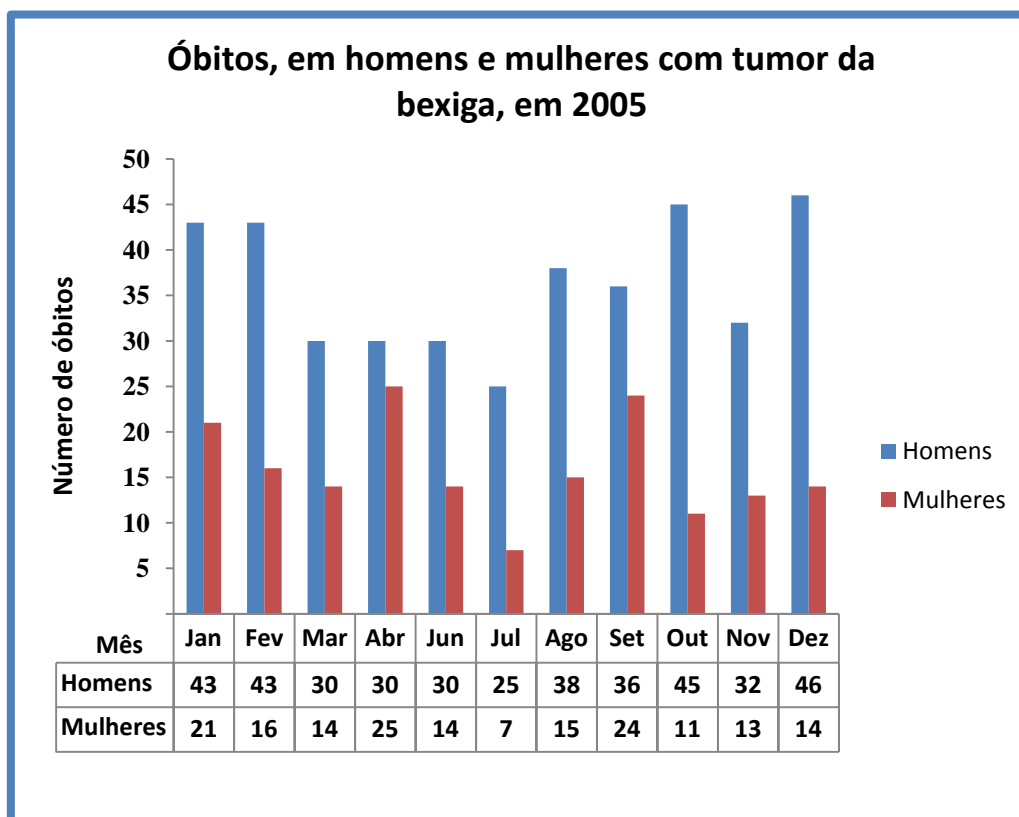
As diferenças raciais podem também caracterizar a incidência do tumor da bexiga. Homens e mulheres caucasianos são 2,8 e 1,5 (respectivamente) mais susceptíveis a tumores da bexiga do que em homens e mulheres africanos (Ries e col., 2003).

Em Portugal, como se pode verificar nos dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) de 2005 (Figura 10), a maioria dos casos diagnosticados estão compreendidos entre os 60 e os 79 anos, tanto nos homens como nas mulheres, ocupando o tumor da bexiga o décimo lugar no ranking das causas de morte, com 632 casos (2,7%) em 23 323 óbitos resultantes de tumores (Figura 11).



**Figura 10** – Número de óbitos resultantes do tumor da bexiga, nas diferentes faixas etárias de ambos os sexos, em 2005.

**Fonte:** Instituto Nacional de Estatística (INE)



**Figura 11** – Óbitos de homens e mulheres com tumor da bexiga, registados em 2005.

Fonte: INE

## **4- FISIOPATOLOGIA DO CARCINOMA DA BEXIGA**

### **4.1- Factores de risco**

O problema fundamental na epidemiologia é saber o que faz desencadear o tumor na bexiga. O risco de contrair este tipo de tumor pode variar em diferentes áreas e em diferentes populações, sugerindo a influência da exposição ambiental, o que é expectável dada a susceptibilidade molecular ou genética específicas.

Do ponto de vista histórico, a questão da exposição a carcinogénios e o papel da bexiga como reservatório de produtos de eliminação na urina tornam os carcinogénios ambientais os principais suspeitos no desencadeamento do carcinoma urotelial e escamoso. Esta ideia é fundamentada pelo aumento da incidência do tumor da bexiga verificado em operários expostos a corantes de anilina e aminas aromáticas e pelos estudos laboratoriais de indução de carcinogénios em modelos animais (Johansson e col., 1997). O tumor da bexiga pode, por isso, ser considerado produto da industrialização.

Por outro lado, as causas apontadas apenas à exposição a carcinogénios não é suficiente para explicar a incidência do cancro da bexiga. Outros factores adicionais poderão ser as características particulares que podem afectar mecanismos pelos quais os carcinogénios induzem a transformação neoplástica, podendo explicar algumas discrepâncias observadas na incidência do tumor na bexiga e na quantificação da exposição a potenciais carcinogénios.

O tumor da bexiga está associado a factores de risco exógenos. O tabagismo é um dos principais factores de risco associados ao carcinoma da bexiga, sendo responsável por 50% dos casos na população masculina e 35% na feminina (Kirkali e col., 2005; Zeegers e col., 2000). O risco nos fumadores está relacionado com o número de cigarros consumidos e com a quantidade de fumo inalado, sendo 2 a 4 vezes superior em relação aos não-fumadores (Kirkali e col., 2005).

Se um indivíduo deixar de fumar, o risco de desenvolver tumor da bexiga diminui mais de 30 % após um a quatro anos, e mais de 60% após 25 anos (Zeegers e col., 2000).

O tabaco contém uma diversidade de químicos, muitos deles genotóxicos, como hidrocarbonetos aromáticos, aminas aromáticas e aldeídos insaturados. Estes compostos estão associados à génese do carcinoma da bexiga. Tem-se dado particular destaque às aminas aromáticas, como a 4-aminobifenil (4-ABP), uma vez que estas não são apenas encontradas no fumo do tabaco, mas também em vários produtos químicos. A urina de fumadores parece ser

mutagénica, e contém o dobro da concentração total de aminas aromáticas comparativamente aos não-fumadores (Crallan e col., 2005).

Os carcinogénios ocupacionais, como as aminas aromáticas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são o segundo factor de risco mais importante.

As associações entre as exposições a várias substâncias que agem como carcinogénios e o desenvolvimento de tumores uroteliais, transformam este tipo de tumores um dos que podem ser prevenidos por uma aderência estrita às medidas da saúde pública e evitar a exposição a substâncias específicas. Enquanto a exposição reduzida a potenciais carcinogénios no local de trabalho pode diminuir o risco apresentado por carcinogénios em determinadas indústrias, os indivíduos também devem estar cientes da sua própria responsabilidade em evitar a exposição a essas substâncias, como é o caso do tabaco.

Um potencial mecanismo pelo qual as aminas induzem a carcinogénese consiste na formação de aductos de ADN que resultam em mutações. Tal está associado a polimorfismos dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo das aminas, revelando-se, assim, uma interacção genética e ambiental (Crallan e col., 2005).

Está também comprovada a relação entre a actividade ocupacional e o aumento do risco de carcinoma da bexiga. Considerado o segundo factor de risco mais importante, estima-se que a exposição constante e prolongada a químicos utilizados na indústria petroquímica, em tinturarias, na indústria têxtil e na indústria de transformação da borracha seja responsável por cerca de 25% dos casos (Grasso, 2008).

Outras situações de risco potencial são as que causam cistite crónica da bexiga, tais como cálculos ou a utilização permanente de cateteres. Estas condições estão associadas a um risco acrescido de carcinoma espinocelular (Jankovic e col., 2007).

Doentes tratados com ciclofosfamida apresentam um risco nove vezes superior de desenvolver tumores na bexiga (Costa e col., 2008). A maioria dos tumores são, na fase de diagnóstico, carcinomas uroteliais invasivos. Um dos metabolitos da ciclofosfamida – a acroleína – parece ser responsável pela indução tumoral.

Da mesma forma, o tratamento da região pélvica por radioterapia gera um aumento do risco. O tumor tende a surgir cinco a dez anos após exposição à radiação e, no momento de diagnóstico, é considerado de alto grau (Kirkali e col., 2005). O mecanismo exacto pelo qual a radiação induz tumores na bexiga ainda é desconhecido; no entanto, pensa-se que é possível que o mecanismo de carcinogénese esteja relacionado com a geração de radicais livres que causam mutações directas no DNA de genes reguladores importantes (Jung e col., 2000).

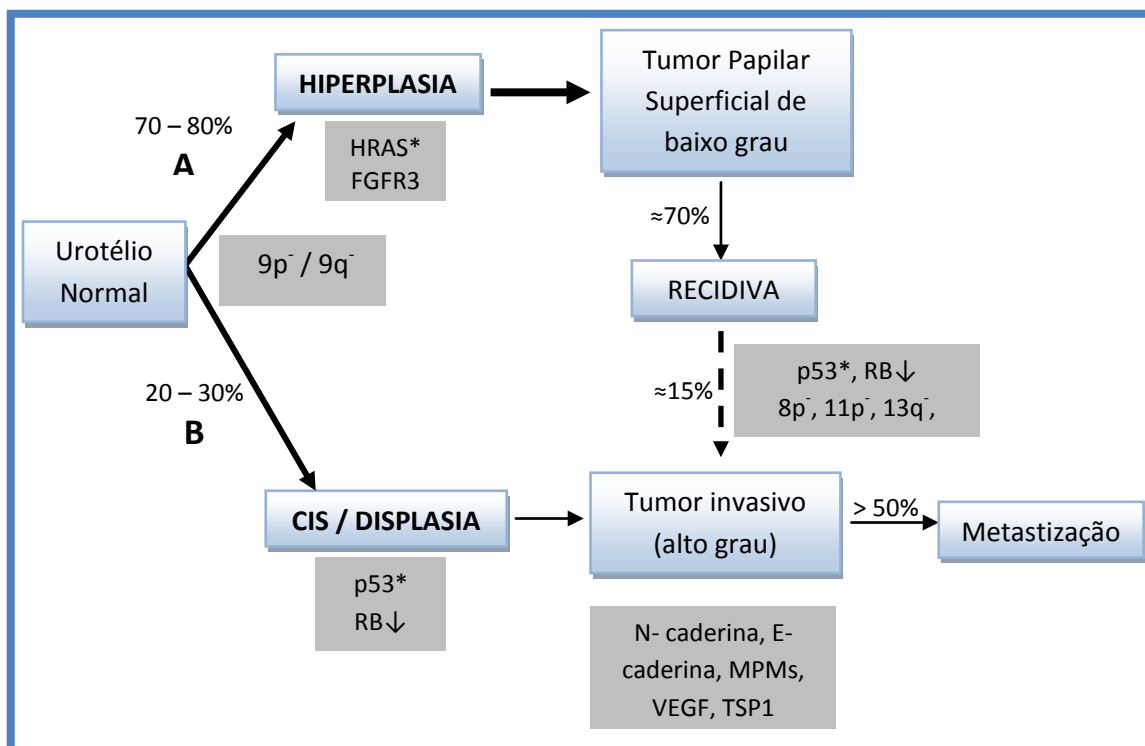
Casos de tumores de bexiga em indivíduos da mesma família ocorrem, apesar de serem bastante raros relativamente a outros tipos de tumor. Factores genéticos e ambientais combinados contribuem, provavelmente, para a ocorrência familiar de cancro da bexiga, especialmente nos indivíduos relativamente jovens (com idade inferior a 45 anos). Estudos que avaliaram os casos de cancro na mesma família comprovaram o risco aumentado de desenvolvimento deste tipo de tumores, realçando a possível predisposição genética do carcinoma urotelial da bexiga (Kirkali e col., 2005).

#### **4.1.2- Alterações genéticas**

A necessidade de identificar tumores superficiais com potencial de recidiva e/ou de progressão, ou tumores invasivos que poderão metastizar, levou ao desenvolvimento de vários estudos. A caracterização de um padrão de alterações moleculares e genéticas subjacentes ao processo de tumorigénese no urotélio é o principal objectivo.

No carcinoma vesical verificam-se alterações genéticas e epigenéticas, incluindo:

- Alterações cromossómicas responsáveis pela tumorigénese,
- Activação de oncogenes,
- Inactivação de genes supressores de tumores,
- Desregulação do ciclo celular, que conduz a uma proliferação celular aumentada por sobre-expressão de factores de crescimento, bem como perda de diferenciação,
- Desenvolvimento de metástases, para as quais contribui o processo de angiogénese e o défice de moléculas de adesão (Figura 12) (Wu, 2005).



**Figura 12** – Eventos moleculares que caracterizam as duas via de tumorigênese da bexiga.

Segundo diversos dados clínicos e experimentais, os tumores uroteliais estabelecem-se e progridem através de duas vias distintas. A primeira via (A), responsável por 70-80% dos tumores uroteliais, é antecedida por uma hiperplasia simples e papilar e exibe uma morfologia tumoral de baixo grau, superficial e papilar. Cerca de 70% destes tumores irão recidivar, mas apenas ~15% progridem para tumores invasivos (seta a tracejado). Estes tumores acolhem mutações frequentes no gene da H-ras (30-40%) e no gene FGFR3 (*Fibroblast growth factor receptor 3*) (~70%), indicando que a activação da RTK-Ras exerce um papel crucial e precoce nesta via de desenvolvimento tumoral. Delecções nos braços curtos dos cromossomas 8 e 11 (8p<sup>-</sup> e 11p<sup>-</sup>) e nos braços longos dos cromossomas 13 e 14 (13q<sup>-</sup> e 14q<sup>-</sup>) estão frequentemente associadas à progressão do tumor e aos estádios invasivos. A segunda via tumoral (B), responsável por 20 a 30% dos tumores uroteliais, é caracterizada pelos tumores invasivos de alto grau, que têm origem tanto no carcinoma *in situ* como a partir de displasias severas. Mais de metade destes tumores contêm defeitos estruturais e funcionais nas proteínas supressoras de tumores p53 e/ou retinoblastoma (RB) e mais de 50 % destes tumores progridem para metástases distantes ou locais. A invasão e as metástases desenvolvem-se por diversos factores que alteram o microambiente tumoral, incluindo a expressão anormal das N- e E-caderinas, metaloproteínases da matriz (MMPs), factores angiogénicos como VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e factores antiangiogénicos como a trombospondina 1 (TSP1). A delecção de ambos os braços do cromossoma 9 (9p<sup>-</sup>/9q<sup>-</sup>) ocorre na fase precoce da tumorigênese, embora não sejam considerados marcadores que diferenciam as duas vias tumorais.

**Fonte:** Adaptado de Wu, 2005.

Alguns estudos citogenéticos demonstraram a monossomia do cromossoma 9 em todos os estádios do carcinoma da bexiga, sugerindo que esta alteração poderá ocorrer de forma precoce no processo de tumorigênese (Stoehr e col., 2005; Fadl-Elmula e col., 2000). Para Lindgren e seus colaboradores (2006), esta evidência está mais associada ao desenvolvimento tumoral do que à iniciação em si (Lindgren e col., 2006).

A análise do DNA a nível molecular revelou a perda de heterozigotia de 9q (Czerniak e col., 1999, Pasin e col., 2008; Obermann e col., 2003; Mhaweck-Fauceglia e col., 2006). Este facto tem atraído muita atenção, uma vez que está presente em estágios antecipados da tumorigénese urotelial.

Perdas em 3p e 11p são também eventos habituais, comprovando que a iniciação e progressão tumoral são produtos da acumulação de modificações a nível genético. Relativamente à perda de heterozigotia de 9q, os resultados são sobreponíveis aos resultados obtidos por análise citogenética, sugerindo uma associação com o desenvolvimento de tumores superficiais. Na realidade, alterações no cromossoma 9 são muito frequentes, levando à conclusão da existência de um gene supressor de tumoral crítico nesta região do genoma.

Provavelmente, estas alterações predispõem as células uroteliais para uma maior susceptibilidade a mutações genéticas mais profundas, estabelecendo um patamar para a dualidade das vias de tumorigénese urotelial (Wu, 2005).

O H-ras, o primeiro oncogene humano identificado em carcinomas uroteliais, sofre frequentemente mutações nos codões 12, 13 e 61 durante estádios precoces destes carcinomas. Para além disso, o *splicing* alternativo do último intrão do gene H-ras pode resultar na sobre-expressão da proteína associada (H-ras). A sobre-expressão desta proteína parece estar associada à indução tumoral mas, por outro lado, foi também descrita a sua associação à ocorrência de recidivas. Por isso, o papel da activação da H-ras na tumorigénese urotelial permanece controverso (Zhang e col., 2001; Wu, 2005), tornando-se impreterível a realização de mais estudos.

Adicionalmente, vários receptores de cinases de tirosinas (RTK) são constitutivamente activos em carcinomas uroteliais. De particular interesse são as descobertas recentes de mutações no gene do receptor 3 do factor de crescimento do fibroblasto (FGFR3). O FGFR3 é um membro dos RTKs, sendo importantes para o crescimento celular, diferenciação, proliferação e angiogénese (Ornitz e col., 2001).

Pensa-se que o gene FGFR3 está associado ao desenvolvimento de tumores superficiais de baixo grau. Devido à elevada taxa de mutações (70-80%) neste grupo, vários autores sugeriram o papel oncogénico determinante na transformação maligna do urotélio (Lindgren e col., 2006; Wu, 2005; Billerey e col., 2001).

No grupo dos carcinomas uroteliais invasores, além da perda de heterozigotia do braço longo do cromossoma 9 (9q), foram identificadas outras alterações como deleções em 8p, 11p, 13q e 14q e estão associadas à recidiva e progressão de tumores superficiais para estádios mais invasivos (Wu, 2005).

Os genes supressores tumorais retinoblastoma (Rb) e p53 parecem desempenhar um papel importante na progressão do carcinoma urotelial. Estes genes estão envolvidos na regulação do ciclo celular, constituindo um aspecto crítico no equilíbrio entre a proliferação e diferenciação (Wu, 2005; Shariat e col., 2004). Desta forma, a perda da sua função implica a desregulação dos mecanismos de controlo do ciclo celular (Knowles e col., 2005). Nestes genes, ocorrem mutações simultâneas em mais de 50% dos tumores invasivos de alto grau, associando-se a um pior prognóstico, com aumento das taxas de recidiva e progressão (Knowles e col., 2005; Wu, 2005).

O fenótipo mais agressivo do carcinoma vesical associa-se a vários fenómenos. Entre estes, a angiogénese constitui um pré-requisito para a progressão tumoral e metastização. A angiogénese ocorre nos tumores uroteliais de forma aumentada, devido ao aumento da expressão de indutores da angiogénese como o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e por inibidores da mesma, como a trombospondina 1 (TSP 1) (Wu, 2005; Spiess e col., 2006). Estes factores, bem como a densidade dos vasos sanguíneos, podem constituir indicadores de prognóstico. Na verdade, valores aumentados da densidade vascular associam-se com a progressão da doença e com a diminuição da sobrevivência global. A diminuição da imuno-expressão da TSP 1 apresenta a mesma associação (Mhawech-Fauceglia e col., 2006).

A expressão aberrante de moléculas de adesão celular está igualmente associada à invasão e metastização de vários tipos de tumores malignos, inclusive os tumores do sistema genitourinário.

Em situações normais, a E-caderina (E-cad) forma uma barreira à metastização. Já a N-caderina (N-cad) parece estar relacionada com a promoção da invasão (Wu, 2005). Em tumores da bexiga, ocorre diminuição/ aumento da imuno-expressão destas proteínas, correlacionando-se com um aumento do potencial de invasão muscular e formação de metástases à distância (Serdar e col., 2005; Lascombe e col., 2006)

As metaloproteínases da matriz (MPM) desempenham igualmente um papel fundamental na invasão tumoral (Wu, 2005). São enzimas proteolíticas que podem degradar a matriz extracelular e membranas basais (Vihinen e col., 2002). Os níveis de MMP apresentam-se frequentemente aumentados na urina, soro e amostras tumorais de doentes com carcinomas uroteliais, particularmente, de variantes invasivas (Kanayama, 2001).

### **4.1.3- Outros mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga**

#### **4.1.3.1 – O papel da inflamação na carcinogénese**

A inflamação crónica induzida por factores biológicos, químicos e físicos está associada com o risco aumentado de cancro.

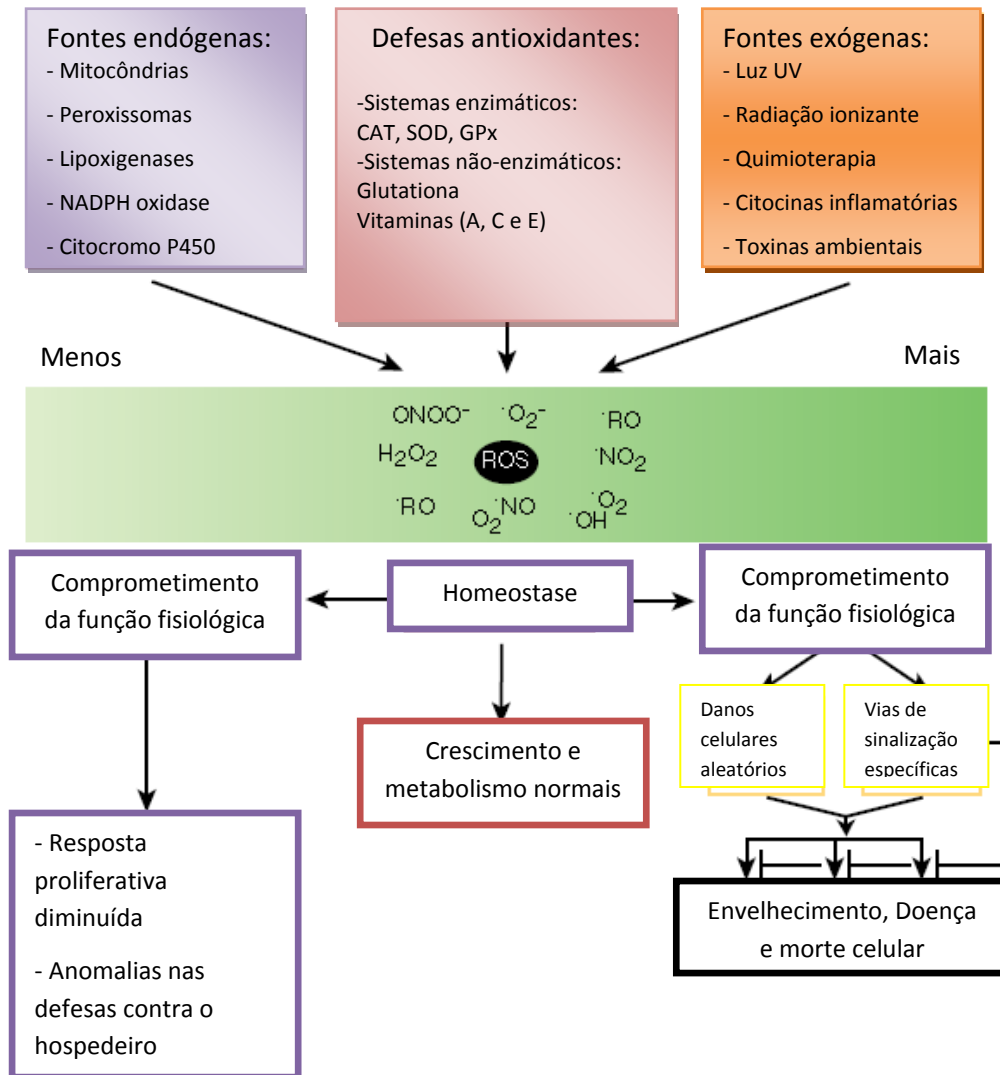
A inflamação reúne um conjunto de passos que inclui a lesão, a reparação e a resolução. Todas as células inflamatórias, como os neutrófilos, os monócitos os macrófagos, os eosinófilos, as células dendríticas, os mastócitos e os linfócitos, são recrutadas após lesão ou infecção e podem contribuir para que o tumor se instale e progrida. As prostaglandinas, as citocinas, o factor nuclear NF-KB, as quimiocinas e factores angiogénicos são moléculas-chave no estabelecimento da ligação entre a inflamação e as alterações genéticas (Federico e col., 2007).

Os principais efetores químicos são os radicais livres de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS). Os radicais livres podem actuar como agentes nefastos directos ou indirectos através da sua reacção com outros componentes estruturais e químicos nas células.

#### **4.1.3.2 – Stresse Oxidativo**

Todos os organismos aeróbios produzem e degradam espécies reactivas de oxigénio, originando concentrações fisiológicas, resultantes da realização de funções celulares normais, ou quantidades excessivas, em circunstâncias fisiopatológicas, que, ao superarem as defesas antioxidantes naturais, dão origem a um estado denominado de stresse oxidativo (Nordberg e col., 2001). Resumidamente, o stresse oxidativo pode resultar de dois factores: da diminuição dos antioxidantes (devida a mutações que afectam enzimas antioxidantes ou a depleção de antioxidantes e outros constituintes essenciais na dieta humana) ou da produção elevada de ROS ou de RNS. Devido ao seu potencial nefasto indesejável, as ROS e todos os eventos associados ao stresse oxidativo têm sido relacionados com uma grande variedade de patologias.

Para manter o equilíbrio entre a produção e a degradação de ROS e RNS, existem uma série de moléculas protectoras conhecidas como agentes antioxidantes, nas quais se incluem as enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase, proteínas que captam metais de transição, glutathione, vitaminas, etc (Federico e col., 2007).



**Figura 13** – Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio. Os oxidantes são gerados como resultado de um metabolismo intracelular normal na mitocôndria e nos peroxissomas, bem como numa variedade de sistemas enzimáticos citosólicos. Para além disso, um número de agentes exógenos podem despoletar a produção de ROS. Um sofisticado sistema antioxidante não-enzimático incluindo a CAT, SOD e GPx contrabalança e regula os níveis de ROS a fim de manter a homeostasia fisiológica. Diminuindo os níveis de ROS abaixo dos seus níveis homeostáticos pode interromper o papel fisiológico dos oxidantes na proliferação celular e na defesa do organismo. Da mesma forma acontece para valores aumentados de ROS. O dano provocado pelo aumento dos níveis de ROS pensa-se que resulta do dano aleatório de proteínas, lípidos e DNA. Para além destes efeitos, a subida dos níveis de ROS pode também constituir um sinal de stresse que activa vias de sinalização específicas sensíveis às reacções redox. Uma vez activadas, estas diversas vias tanto podem desencadear danos como funções potencialmente protectoras.

**Fonte:** Adaptado de Finkel e col., 2000.

#### 4.1.3.3 – Formação de ROS

Entre as espécies reactivas de oxigênio incluem-se diferentes moléculas. Os radicais livres intracelulares (moléculas livres de baixo peso molecular, com um electrão

desemparelhado) são considerados como espécies reactivas de oxigénio, sendo os dois termos usados muitas vezes como equivalentes (Nordberg e col., 2001).

A mitocôndria é a principal fonte de radicais livres intracelulares (Sharma e col., 2001), que são também produzidas pela actividade do citocromo P450 e dos peroxissomas (Federico e col., 2007). Esse facto deve-se à presença da cadeia transportadora de electrões, onde cerca de 95% do oxigénio é reduzido pela citocromo oxidase, levando o restante à formação de radicais livres. Uma diminuição da actividade da citocromo oxidase pode, assim, levar a uma maior libertação de radicais livres a partir da cadeia respiratória mitocondrial. Além da fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria, existem outros mecanismos moleculares que podem levar à formação de ROS, tais como a conversão enzimática de catecolaminas e indolaminas pela monoamina oxidase ou a auto-oxidação não-enzimática de catecolaminas. Podem também ocorrer alterações no metabolismo da glicose, na oxidação da glutamina e na homeostasia do cálcio. A activação pelo cálcio da fosfolipase A2 liberta ácido araquidónico, cuja conversão enzimática a tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos pelas ciclooxigenases e lipoxigenases leva à formação de ROS (Nordeberg e col., 2001).

#### ***4.1.3.4 – Funções fisiológicas e fisiopatológicas das ROS***

Todas as células produzem quantidades fisiológicas de espécies reactivas de oxigénio, necessárias para levar a cabo diversas funções. Uma das funções das ROS é participar na defesa do organismo contra a infecção. Quando os fagócitos são activados, produzem estas espécies em quantidades suficientes para destruir os microrganismos intrusos.

Para além disso, as ROS podem afectar directamente a conformação e as actividades de todas as moléculas que contêm grupos sulfidrílo, através da oxidação do grupo tiol. Este tipo de regulação redox afecta muitas proteínas importantes na transdução de sinal e na carcinogénese, tais como a proteína cinase C, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, a cinase da tirosina, entre outras enzimas e receptores membranares. Para muitos factores de transcrição, as ROS funcionam como mediadores fisiológicos do controlo da transcrição, uma vez que esses factores também são sensíveis a uma regulação redox (Nordberg e col, 2001; Dalton e col., 1999).

Apesar disso, as ROS podem, devido à sua elevada reactividade, causar danos em diversas macromoléculas, sendo por isso consideradas como potencialmente tóxicas, mutagénicas e carcinogénicas (Nordberg e col., 2001). Estes danos também podem ser induzidos pelo ferro, embora ainda seja desconhecido pormenorizadamente os mecanismos

pelos quais este ião, em conjunto com o oxigénio, amplifica os danos em alvos celulares oxidáveis como os ácidos nucleicos, as proteínas e os lípidos (Eaton e col., 2002).

#### **4.1.3.5 - Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica é, provavelmente, a área de investigação mais explorada quando se fala de espécies reactivas de oxigénio. Isto deve-se ao facto de os ácidos gordos poli-insaturados serem excelentes alvos para ataque por parte dos radicais livres, uma vez que possuem várias ligações duplas.

Podem distinguir-se três passos na peroxidação lipídica: iniciação, propagação e terminação. A peroxidação pode ser induzida por radicais suficientemente reactivos para remover um átomo de hidrogénio aos ácidos gordos poli-insaturados. Este é o ponto de partida para um ciclo de propagação que leva ao aumento da produção de radicais livres e ao aumento de hidroperóxidos lipídicos formados pela oxidação de inúmeras moléculas lipídicas. Este ciclo de propagação é quebrado quando dois radicais se juntam, formando não-radicais, e formam o último passo da peroxidação lipídica (terminação).

Os diversos produtos originados pela peroxidação lipídica permitem a sua quantificação (Meagher e col., 2000). A medição do malondialdeído é o método mais utilizado para quantificar a peroxidação lipídica.

## **4.2 - Biomarcadores tumorais**

A detecção precoce do tumor da bexiga e das suas recidivas é essencial para melhorar o prognóstico e aumentar o tempo de sobrevivência. A detecção destes tumores baseia-se na cistoscopia, que é muito cara e invasiva, e na citologia, que é um marcador padrão não invasivo e não muito sensível. Por estas razões, surge a necessidade de se desenvolverem novos testes à urina, com a finalidade de se descobrirem novos biomarcadores no tumor da bexiga que tenham um uso potencial na vigilância e no rastreio do tumor da bexiga.

### **4.2.1- Biomarcadores para o efeito da vigilância do tumor da bexiga**

#### **1. Teste ao tumor da bexiga**

O teste ao tumor da bexiga, também conhecido pelo teste UBC (*urinary bladder cancer*), é um teste de ELISA que detecta a presença de fragmentos das citoqueratinas 8 e 18 na urina. Estas citoqueratinas fazem parte da estrutura celular normal e, por isso, encontram-

se no epitélio de uma bexiga normal, especialmente nas células em “guarda-chuva”. A expressão e modificação aumentadas verificam-se no carcinoma de células transicionais, especialmente em tumores papilares de alto grau. Estudos recentes demonstraram que este teste apresentava uma sensibilidade de 54% e uma especificidade de 97%, concluindo, assim, que este teste tem uma baixa sensibilidade para a detecção de recidivas do tumor da bexiga e não pode ser usado na rotina para reduzir o número de cistoscopias (Lokeshwar e col., 2006).

## **2. Citoqueratina 20**

As citoqueratinas são proteínas de filamento intermediárias específicas para as células epiteliais. A citoqueratina 20 é expressa selectivamente no epitélio da bexiga e no epitélio gastrointestinal. É detectada em células normais, mas a sua regulação é aumentada no carcinoma. O teste da citoqueratina 20 apresenta uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 76%. A expressão da citoqueratina 20 é determinada por RT-PCR ou por imunohistoquímica (Tilborg e col., 2006).

## **3. ImmunoCyt**

O teste ImmunoCyt utiliza três anticorpos monoclonais de fluorescência direccionados contra o antigénio idêntico às mucinas (M344 e LDQ10) e contra uma forma glicosilada de elevado peso molecular do antigénio carcinoembrionário (19A211). As mucinas são complexos de glicoproteínas expressas na superfície da membrana apical de todas as células epiteliais das mucosas. Em células epiteliais malignas, incluindo o tumor da bexiga, pensa-se que podem influenciar a adesão celular, e são alvos clínicos para a imunoterapia tumoral. Recentemente, um estudo de vigilância demonstrou que este teste tem uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 78% (Tilborg e col., 2006).

## **4. NMP22**

A NMP22 é um membro da família de proteínas da matriz nuclear que faz parte da estrutura do núcleo e dá suporte à forma nuclear. A NMP22 é responsável pela regulação do cromatídio e pela separação das células durante a replicação. Nas células do tumor urotelial, a concentração de NMP22 é elevada e é libertada na urina em níveis detectáveis. A detecção desta proteína é feita através do ensaio ELISA quantitativo (Lokeshwar e col., 2006).

### 5. Ácido hialurónico e hialuronidase

O ácido hialurónico é um glicosaminoglicano e é um componente normal dos tecidos e fluídos corporais. O ácido hialurónico associado ao tumor e a sua enzima de degradação hialuronidase estão associados à angiogénese dos tumores da bexiga e são secretados na urina. As suas concentrações estão relacionadas com o grau do tumor. Com o teste do ácido hialurónico e da hialuronidase na urina são medidos por ELISA ou por RT-PCR.

### 6. Proteína Fas solúvel

A via de sinalização celular Fas está envolvida na apoptose e o ligando Fas (FasL) induz a apoptose quando se liga ao seu receptor transmembranar Fas. O *splicing* alternativo do RNAm da Fas pode gerar formas solúveis da proteína Fas. Os níveis de Fas solúvel são elevados no tecido e no soro de indivíduos com tumor da bexiga.

### 7. Survivina

Vários estudos identificaram a survivina como um biomarcador promissor na vigilância, rastreio e prognóstico após tratamento do tumor da bexiga.

A survivina tem um peso molecular de 16,5 kDa e faz parte da família de proteínas que regulam a morte celular. A sua expressão aumentada inibe vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose. No tumor da bexiga, a survivina é expressa na urina e a sua expressão está relacionada com a recidiva do tumor, estadiamento e progressão. A expressão da survivina é detectada quantitativamente por RT-PCR.

Para a vigilância, a detecção da survivina é um potencial teste não-invasivo com elevada sensibilidade e especificidade.

### 8. Análise micro-satélite

Muitos tumores, incluindo o tumor da bexiga, são caracterizados pelo aumento de anomalias cromossómicas e pela perda de heterozigotia. Estas alterações genéticas podem ser detectadas através da análise por altos marcadores polimórficos como o micro-satélite. A ocorrência frequente da perda e da alteração do comprimento dos micro-satélites tem sido descrito no carcinoma das células transicionais da bexiga (Lokeshwar e col., 2006).

### **4.3- Sintomas e diagnóstico clínico do carcinoma da bexiga**

O sintoma principal do carcinoma da bexiga é a hematuria e ocorre em 85% dos doentes. Outros sintomas mais comuns como a irritação vesical, a frequência urinária aumentada e disúria estão normalmente associados ao CIS difuso ou ao tumor da bexiga invasivo. Também podem surgir obstrução uretal com dores lombares e dificuldades miccionais, edema nas extremidades inferiores e massa pélvica palpável.

Os doentes com tumores na bexiga apresentam muito raramente sinais de doença avançada como perda de peso e dores ósseas ou abdominais. No entanto, estes sintomas praticamente nunca ocorrem sem um historial prévio de hematuria (Kirkali e col., 2005).

O objectivo da monitorização do carcinoma vesical é o de aumentar a sobrevivência através da sua detecção num estágio preliminar.

Os tumores vesicais são diagnosticados através de citopatologia urinária e cistoscopia. A ressecção transuretral (RTU), além de ser utilizada como método de diagnóstico, tem igualmente benefícios terapêuticos. É uma técnica cirúrgica bem tolerada e cuja taxa de morbilidade é mínima. O método de RTU remove a neoplasia e preserva a funcionalidade do órgão (Kirkali e col., 2005; Spiess e col., 2006).

Para o diagnóstico de tumores invasivos, recorre-se à tomografia axial computadorizada (TAC) e/ou à ressonância magnética (RM), com o objectivo de delimitar a gordura perivesical e avaliar o possível envolvimento ganglionar e a ocorrência de outros padrões de metastização. Os métodos de diagnóstico de metástases à distância são utilizados de acordo com as características de cada caso, individualmente (Kirkali e col., 2005).

### **4.4- Tratamento e sobrevivência**

O estadiamento e o grau de diferenciação são variáveis com significado prognóstico, mas o tamanho do tumor e a ocorrência de multifocalidade são igualmente factores que se associam ao aumento das taxas de recidiva e progressão (Wu e col., 2005; Knowles, 2005; Sakai e col., 2006).

De facto, os carcinomas superficiais da bexiga são frequentemente multifocais. Cerca de 65% recidivam após tratamento, ocorrendo progressão da doença em 10-15% dos casos e metade destes desenvolverão metástases (Spiess e col., 2006; Dutta e col., 2001; Herr, 2000).

A maioria dos carcinomas uroteliais da bexiga corresponde a lesões superficiais papilares de baixo grau de malignidade. Estes tumores são facilmente tratados por RTU, quimioterapia intra-vesical e imunoterapia, após estratificação de risco baseada em factores clínicos e patológicos (Spiess e col., 2006; Sylvester e col., 2006). Apesar de o tratamento ser adequado, 30 a 80% destes doentes desenvolvem recidivas num espaço de 5 anos e mais de 45% progridem para formas tumorais mais invasivas e agressivas (Sylvester e col., 2006).

A elevada taxa de recidivas associada aos tumores superficiais, sobretudo nos grupos de alto risco, implica uma monitorização regular dos doentes através da cistoscopia (Spiess e col., 2006; Knowles e col., 2005). Curiosamente, o número de RTUs efectuadas parece correlacionar-se com o desenvolvimento tumoral.





## II. MODELO ANIMAL DE INDUÇÃO DO CARCINOMA PELO BBN



Os modelos animais válidos e apropriados para a indução da carcinogénese da bexiga devem ser semelhantes ao tumor da bexiga nos humanos, tendo em conta as suas propriedades histológicas e bioquímicas e as características genéticas e moleculares.

São muitas as vantagens ao usar roedores na investigação experimental, nomeadamente os ratos, já que estes animais são relativamente fáceis de sustentar e as suas propriedades nos campos da fisiologia e da genética são já bastante conhecidas e, tal como os humanos, são mamíferos.

Os roedores desenvolvem tumores de uma forma relativamente fácil e rápida em resposta a carcinogénios químicos e a estrutura e função do seu tracto urinário inferior é muito semelhante ao dos humanos.

Por estas razões, este modelo animal será o ideal para a indução do carcinoma da bexiga.

Nas décadas de 60 e 70 do século passado, descobriram-se carcinogénios quimicamente organo-específicos, capazes de induzir tumores na bexiga nos roedores. Estes compostos químicos e as suas aplicações forneceram modelos reprodutíveis para estudos de mecanismos bioquímicos, patológicos, biológicos e imunológicos envolvidos na patogénese do tumor da bexiga.

Existem vários métodos de indução deste tipo de tumor:

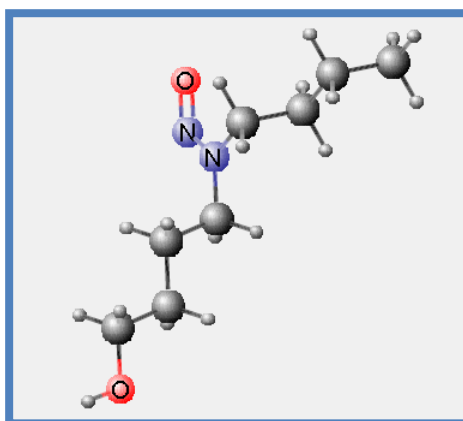
- Por administração oral de um carcinogénio na dieta, na bebida ou por intubação gástrica (gavagem), ou por injeção;
- Por exposição a raios X.

O primeiro composto a ser aplicado num modelo experimental de indução da carcinogénese da bexiga foi o 2-acetilaminofluoreno (AAF). Apesar da sua utilidade no estudo da carcinogénese da bexiga, o AAF é um carcinogénio pluripotente, induzindo tumores em vários tecidos para além do urotélio, como o fígado, o pâncreas, a pele, entre outros. Assim, os tumores induzidos no fígado poderão provocar a morte precoce dos animais e induzir a erros na interpretação dos resultados. Tornou-se, então, necessário o desenvolvimento de um modelo animal que permitisse reproduzir a indução de tumores na bexiga sem que outros órgãos fossem afectados.

São três os compostos químicos que parecem ser particularmente efectivos, e que, ao serem devidamente administrados em doses apropriadas e em estirpes de animais adequadas, poderão produzir cerca de 100% de incidência de tumores apenas na bexiga. Entre eles, inclui-se o N-butil-N- (4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN), cuja estrutura química se encontra ilustrada na figura 14. (Oliveira e col., 2006)

O BBN é dos carcinogénios mais adequados para a indução do carcinoma da bexiga em modelos animais, já que o seu potencial carcinogénico é principalmente limitado a este órgão e é provavelmente o carcinogénio mais referenciado para este fim. (Oliveira e col., 2005)

Em modelos animais, os machos parecem ser mais susceptíveis que as fêmeas de desenvolver tumores na bexiga induzidos por determinados tipos de carcinogénios, nomeadamente o BBN que é uma amina aromática. Esta evidência é concludente com a epidemiologia observada nos humanos, já que existe uma maior incidência do tumor da bexiga no homem relativamente à mulher. (Miyamoto e col., 2007)



**Figura 14** – Estrutura tridimensional do BBN.

**Fonte:** <http://sis.nlm.nih.gov/chemical.html>

O BBN é um líquido oleoso amarelo, não é muito volátil mas é solúvel devido ao grupo hidroxilo terminal. Quando dissolvido em água, o BBN é facilmente aplicável, no entanto, é sensível à luz. (Oliveira e col., 2006)

Este carcinogénio é um composto genotóxico. Após administração, o grupo OH do BBN é rapidamente oxidado a um grupo carboxilo por intermédio do sistema enzimático álcool/aldeído desidrogenase, gerando-se um metabolito do BBN denominado N-butyl-N-(3-carboxibutyl) nitrosamina. (Bonfanti e col., 1988)

Este metabolito é também um carcinogénio da bexiga e contacta com o urotélio através da urina. (Oliveira e col., 2006)

Druckrey e col., em 1964, foram os pioneiros no estudo do efeito carcinogénico do BBN na bexiga de ratos. Desde aí, este modelo tem sido amplamente utilizado para o estudo da histogénese e dos vários agentes intervenientes na formação e crescimento de tumores na bexiga. Em estudos anteriores, Osawa e col. (1999) descobriram que, quando se administrava diariamente BBN com a concentração de 0,05% aos ratos durante um período de 8 semanas,

desenvolviam-se tumores da bexiga em todos os ratos e que, após 20 semanas, 70-80% destes tumores eram carcinomas. (Osawa e col., 1999)

Este modelo animal foi adoptado para este trabalho, tendo em conta a taxa de sucesso relativamente à percentagem de tumores na bexiga formados num curto espaço de tempo.





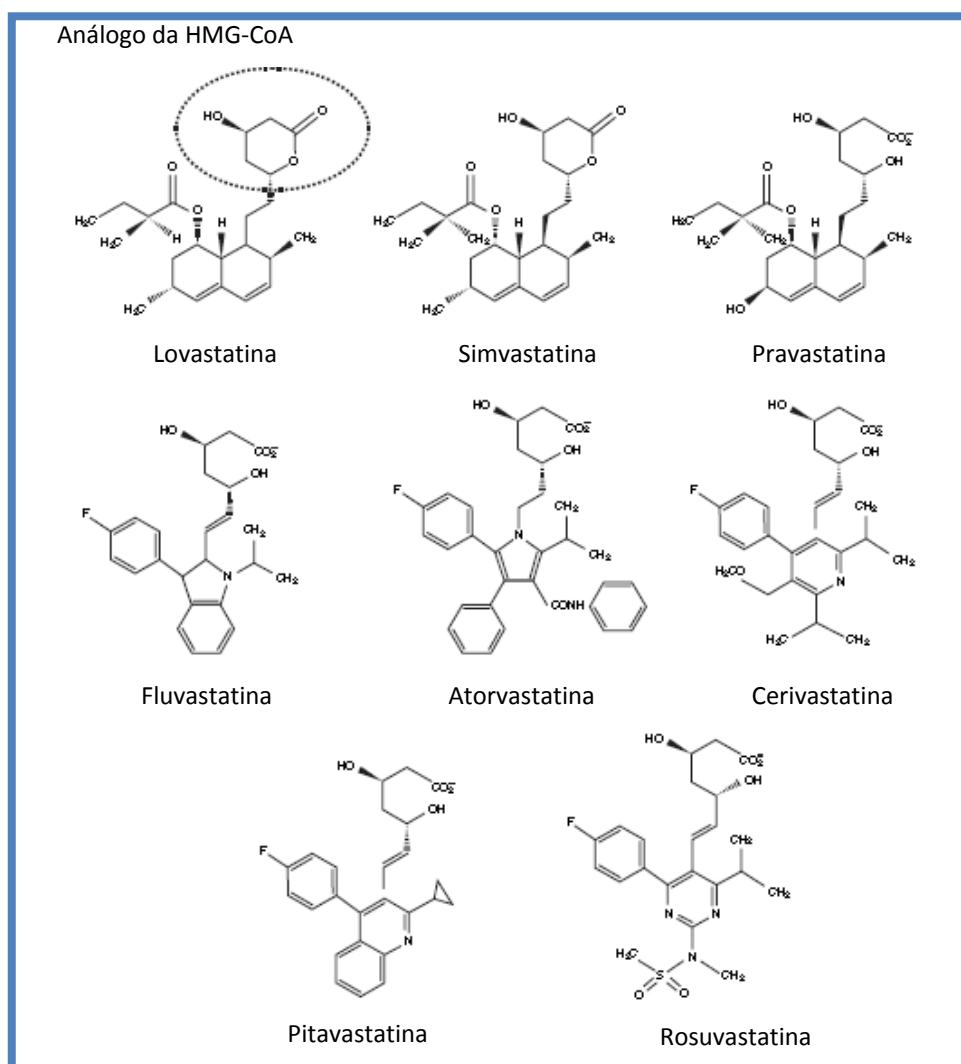
### III. USO DAS ESTATINAS NA PREVENÇÃO TUMORAL



## 1- INTRODUÇÃO

As estatinas são uma classe de fármacos que inibem a reductase da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) (Shachaf e col., 2007), provocando, assim, uma redução da biossíntese de colesterol no fígado, resultando na redução substancial da mortalidade cardiovascular em doentes com hipercolesterolemia (Sleijfer e col., 2005).

Estes compostos, capazes de mimetizar o substrato natural, podem derivar de fungos, como a lovastatina, simvastatina ou a pravastatina (Demierre e col., 2005; Campo e col., 2007), ou serem produzidas sinteticamente (como é o caso da atorvastatina, da rosuvastatina e da fluvastatina), diferindo fundamentalmente no perfil farmacocinético, interações farmacológicas e efeitos indesejados relacionados com a miotoxicidade (Campo e col., 2007).



**Figura 15** – Estrutura química das estatinas.

**Fonte:** Schachter, 2004.

À excepção da pravastatina, todas as outras estatinas são lipofílicas (Demierre e col., 2005), uma vez que partilham grupos rígidos e hidrofóbicos ligados a uma fracção semelhante à HMG (Istvan e col., 2001).

Todas as estatinas possuem uma cadeia lateral com estruturas, ou em anel aberto (forma ácida) ou em anel fechado (lactona). Esta última estrutura é um pró-fármaco inactivo que é convertido na forma activa  $\beta$ -hidroxi-ácido) pelas carboxiesterases presentes no fígado e no plasma (Demierre e col., 2005) (Figura 15).

Estes compostos antilipidémicos comprometem a síntese de colesterol num passo limitante da via do mevalonato, que corresponde à desacilação reductiva de quatro electrões da HMG-CoA a CoA e mevalonato (ácido gordo intermediário) catalisada pela reductase da HMG-CoA (Istvan e col., 2001).

Como resultado da actividade destes agentes, há uma diminuição da produção de mevalonato e de outros compostos subjacentes a este, como as estruturas farnesil e geranylgeranil, conhecidas por isoprenóides.

Os compostos isoprenóides farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranil pirofosfato (GGPP) são estruturas importantes para a activação de diversas proteínas intracelulares via farnesilação ou geranylgeranilação, ou prenilação (Moyad e col., 2005).

Estes mecanismos das estatinas não são os únicos propostos sendo alguns deles independentes da sua acção na actividade da HMG-CoA reductase. É por esta razão que as estatinas são consideradas agentes pleiotrópicos.

A pleitropia atribuída às estatinas resulta, assim, da inibição da síntese de intermediários isoprenóides da via do mevalonato, com as consequências daí decorrente a diferentes níveis, como seguidamente se abordará.

## 2- VIA DO MEVALONATO

A via do mevalonato é uma importante via metabólica e desempenha um papel crucial em diversos processos celulares, fornecendo às células biomoléculas essenciais.

Esta via converte o mevalonato em isoprenóides esteróides, como o colesterol, e em isoprenóides não-esteróides, como o dolicol e a ubiquinona. Estes intermediários participam activamente na modificação pós-translacional de uma vasta gama de proteínas envolvidas na sinalização intracelular e são essenciais ao crescimento e diferenciação celulares, na expressão genética, na glicosilação de proteínas e na formação do citosqueleto.

Apesar do estudo extenso em relação à biossíntese de colesterol e às suas implicações nas doenças cardiovasculares, a via do mevalonato tornou-se recentemente um desafio e, ao mesmo tempo, um assunto fascinante, designadamente a partir do momento em que vários estudos clínicos e experimentais sugerem que a inibição dos isoprenóides não-esteróides poderá ser de grande interesse na patologia humana a outros níveis que não apenas a dislipidémia.

### **2.1- Bioquímica da via do mevalonato**

A via do mevalonato envolve, primeiramente, a síntese de HMG-CoA a partir da acetil-CoA e do acetoacetil-CoA.

A segunda etapa desta via é um passo limitante que corresponde à conversão da HMG-CoA a mevalonato e é catalisada pela reductase da HMG-CoA (Buhaescu e col, 2007).

Na ausência de isoprenóides esteróides na célula, a transcrição do gene da reductase da HMG-CoA é directamente activado por uma família de factores de transcrição, designados proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróides (SREBP) (Weber and col., 2004; Horton and col., 2002).

Para além de activarem a expressão do gene da reductase da HMG-CoA, os SREBP's aumentam, também, a expressão genética de todas as enzimas que participam na via do mevalonato. Adicionalmente, existem outros mecanismos reguladores que podem influenciar a actividade da reductase da HMG-CoA (Buhaescu e col, 2007).

Em sucessivos passos de reacção, o mevalonato é fosforilado, por acção de cinases, para logo a seguir ser descarboxilado, dando origem a unidades isoprenóides activadas, designadas por isopentenil-pirofosfato e dimetilalil-pirofosfato. Em reacções de transferência, estas unidades isoprenóides geram, sucessivamente, o geranyl-pirofosfato, o farnesil-pirofosfato e, finalmente, o esqualeno.

O esqualeno é depois convertido após dois passos de ciclização em lanosterol, que por sua vez é convertido em colesterol após uma série de 19 reacções adicionais.

A Figura 16 apresenta a via do mevalonato e a consequente síntese de isoprenóides, onde se encontram apenas representados os principais passos desta via.

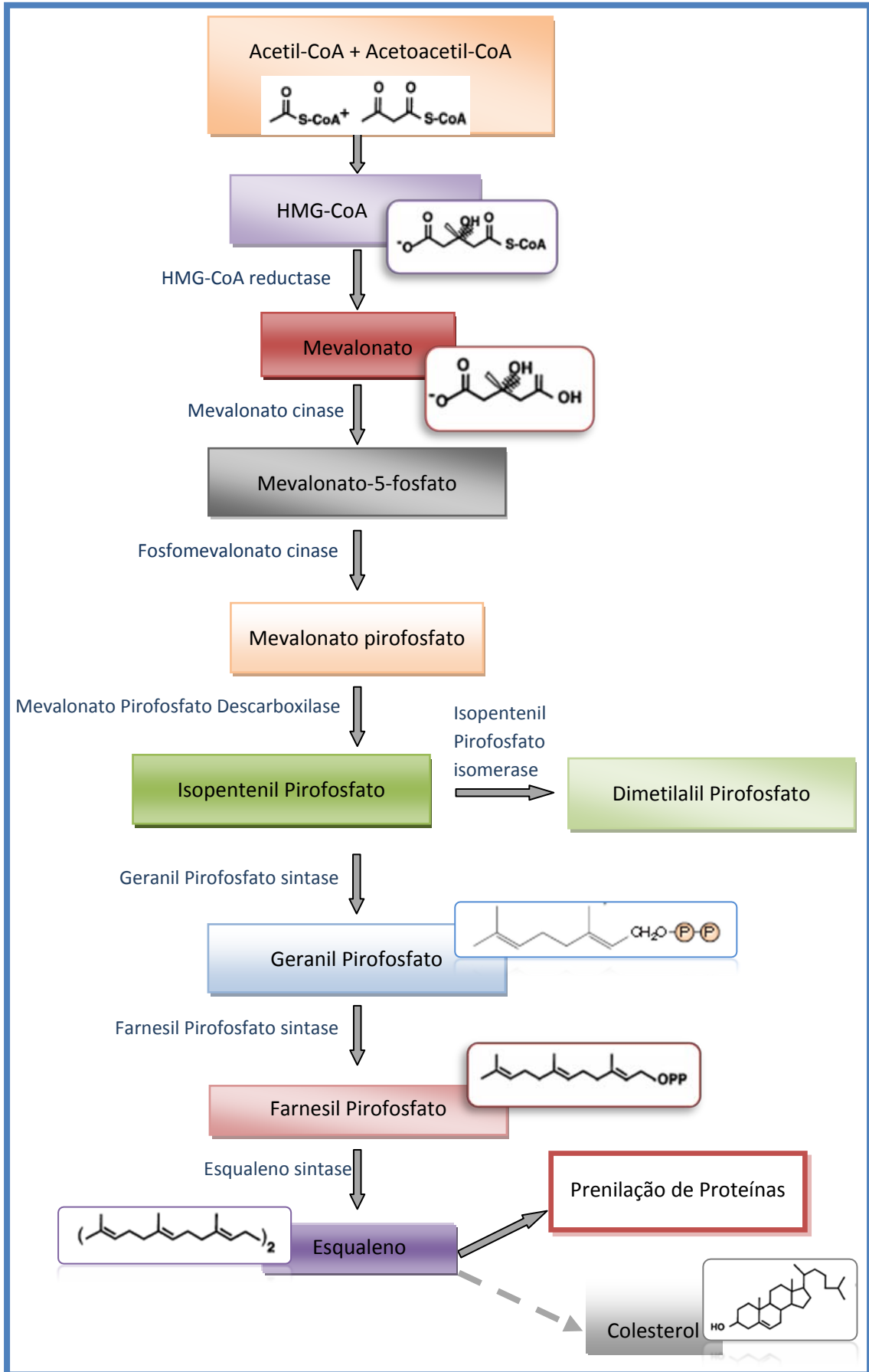


Figura 16 – Via do mevalonato e síntese de isoprenóides.

Fonte: Adaptado de Buhaescu e col., 2007 e de Istvan, 2003.

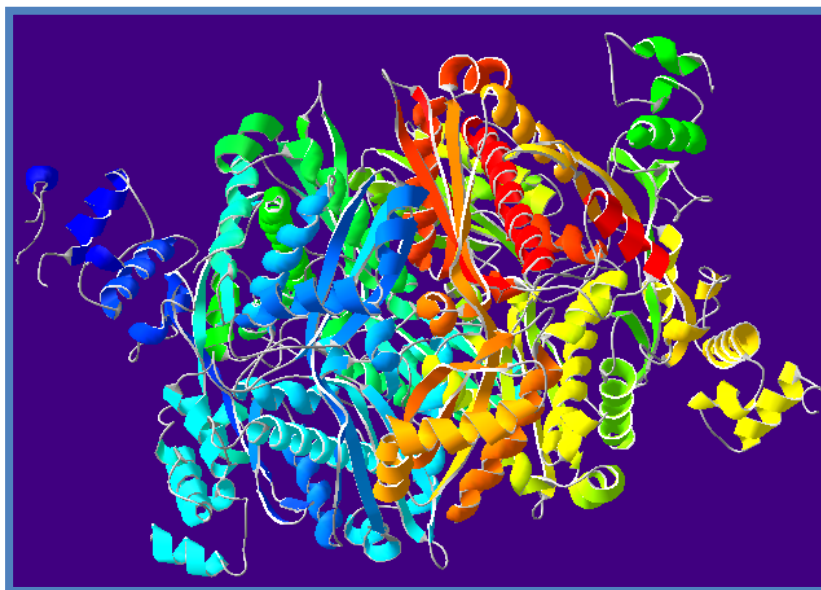
## 2.2- Via do mevalonato como alvo terapêutico

A manipulação terapêutica da via do mevalonato e da síntese de isoprenóides através das estatinas tem sido muito estudada numa variedade de doenças, através de mecanismos não relacionados com alterações do colesterol.

Apesar de estes mecanismos não estarem completamente elucidados e de ainda permanecer muita controvérsia devido a diferenças observadas entre ensaios clínicos e experimentais, existem algumas evidências que indicam que, ao interferirem com a biossíntese de isoprenóides, poderão abrir, no futuro, um novo campo de indicações terapêuticas.

## 2.3- HMG-CoA reductase

A reductase da HMG-CoA é uma enzima microsossomal de 110 kDa que catalisa a conversão do HMG em mevalonato, um passo limitante na síntese de vários compostos, nomeadamente do colesterol (Hamelin e col., 1998) (Figura 17).



**Figura 17** – Estrutura da reductase da HMG-CoA

**Fonte:** Protein Data Bank

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1T02>)

A reductase da HMG-CoA é a enzima-alvo de uma classe de inibidores da síntese de colesterol, as estatinas, que inibem a sua acção de forma competitiva.

Esta enzima apresenta-se na forma de tetrâmero, no qual dois dos quatro monómeros interagem para formar o centro catalítico. O grupo hidroximetilglutarílico (HMG) do substrato

HMG-CoA posiciona-se na interface destes monómeros, onde ocorrem as reacções de redução (Campo e col., 2007).

O centro catalítico da reductase da HMG-CoA possui uma região catalítica importante, denominada “loop” *cis*, envolvendo os resíduos de aminoácidos 682-694, característicos apenas dos seres eucarióticos. Na região dos aminoácidos C688 a T689, o “loop” *cis* está adequadamente posicionada para orientar os resíduos fundamentais que participam das reacções de redução: Ser684, Asp690, Lys691 e Lys692 (Istvan and col., 2001; Schachter, 2004).

Investigações efectuadas em diversos complexos enzimáticos sugerem que existe apenas uma diferença fundamental entre as interacções do substrato e as diferentes estatinas. No complexo da enzima com as estatinas parece ocorrer uma mudança conformacional na região flexível C-terminal, que permite a acomodação de grupos rígidos e hidrofóbicos dos inibidores, aumentando as interacções hidrofóbicas com a enzima e contribuindo para a elevada potência que as estatinas apresentam (Istvan and col., 2001; Demierre and col., 2005).

### **3- MECANISMO DE ACÇÃO DAS ESTATINAS**

O mecanismo de acção geral das estatinas é definido pela inibição farmacológica da reductase da HMG-CoA resultando numa diminuição moderada da concentração de colesterol celular. Esta diminuição activa consequentemente uma cascata de sinalização celular que culmina na activação de uma proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SRBP ou *Sterol regulatory element binding protein*), um factor de transcrição nuclear que aumenta a regulação da expressão do gene codificador do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* ou LDL). A expressão aumentada de receptores LDL provoca um aumento da captação das LDL plasmáticas, diminuindo consequentemente os níveis de concentração destas no plasma (Golan, 2008).

### **4- PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS**

Os benefícios clínicos das estatinas estão fortemente relacionados com a diminuição dos níveis séricos de LDL e de colesterol, conferindo-lhe uma potente acção antidislipidémica. No entanto, devido ao facto do mevalonato ser precursor, não só do colesterol mas também de isoprenóides não esteróides, a inibição da reductase da HMG-CoA poderá resultar em efeitos pleiotrópicos.

Por esta razão, do ponto de vista farmacodinâmico, as estatinas são bastante selectivas quanto à sua actuação sob a reductase da HMG-CoA e vários dos efeitos pleiotrópicos destes fármacos parecem depender de uma menor activação de algumas proteínas que interferem em várias e importantes vias de sinalização celular. Entre estas vias incluem-se as relacionadas com genes que condicionam a síntese de citocinas inflamatórias, factores de coagulação, ou relacionados com uma maior expressão de monóxido de azoto (NO). Desta forma, a redução de mevalonato e dos seus produtos determinam uma menor activação das proteínas Ras e Rho, que promovem efeitos anti-inflamatórios e efeitos na modulação da função endotelial.

De acordo com informações obtidas em investigações mais recentes, as estatinas possuem propriedades anti-inflamatórias devido à capacidade de reduzirem o número de células inflamatórias. Os mecanismos envolvidos estão relacionados com a inibição da adesão de moléculas, como as de adesão intercelular (ICAM-1), as quais estão envolvidas no recrutamento de células inflamatórias. Adicionalmente, as estatinas atenuam a expressão de E-selectinas e a adesão de leucócitos, através do aumento da produção de NO endotelial promovido pelo aumento da regulação da sintase de NO endotelial (eNOS) (Sleijfer e col., 2005; Campo e col., 2006; Dulak e col., 2005).

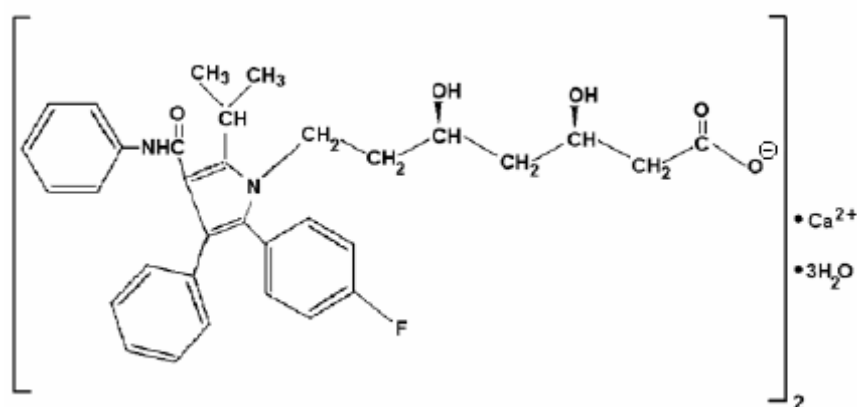
Para além destes efeitos, existem outros que se destacaram em ensaios clínicos e experimentais, dos quais se destacam: efeitos na remodelação da parede vascular, estabilização e reversão da lesão aterosclerótica, redução da área de enfarte e cardioprotecção, acções antioxidantes, modulação da angiogénese, acção anti-trombótica, prevenção e redução da doença isquémica e redução de todas as causas de mortalidade.

Mais recentemente as estatinas têm demonstrado a capacidade de potenciar a actividade anti-tumoral de algumas citocinas e agentes quimioterapêuticos numa grande variedade de modelos experimentais de indução de tumores.

Os efeitos pleiotrópicos das estatinas revelaram outras potencialidades de aplicação clínica mais alargada. Assim, a tendência actual vai no sentido de recomendar ensaios clínicos e estudos experimentais mais aprofundados sobre os efeitos adicionais das estatinas, de modo a esclarecer os seus efeitos em patologias que possam eventualmente beneficiar deles.

## 5- A ATORVASTATINA

A atorvastatina é um composto sintético que faz parte da classe das estatinas, sendo por isso um inibidor competitivo e selectivo da reductase da HMG-CoA. Esta estatina é quimicamente designada por ácido [R- (R\*, R\*)]-2-(4-fluorofenil)-β,δ- dihidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino) carbonil]-1 H- pirrolo-1- heptanóico, cálcio trihidratado. A sua fórmula empírica é  $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2 Ca$  trihidratado, apresentando um peso molecular de 1209,42. A sua fórmula estrutural está expressa na Figura 19.



**Figura 19** – Representação da fórmula estrutural da atorvastatina.

**Fonte:** Shitara e col., 2006

A atorvastatina é representada na indústria farmacêutica com o nome de Zarator<sup>®</sup> e apresenta-se sob a forma de comprimidos para administração oral nas doses de 10 e 40 mg. Tem como principais indicações terapêuticas a redução dos níveis de colesterol e de triglicéridos e a conseqüente redução do risco cardiovascular.

Esta estatina tem dois efeitos metabólicos que merecem uma especial atenção:

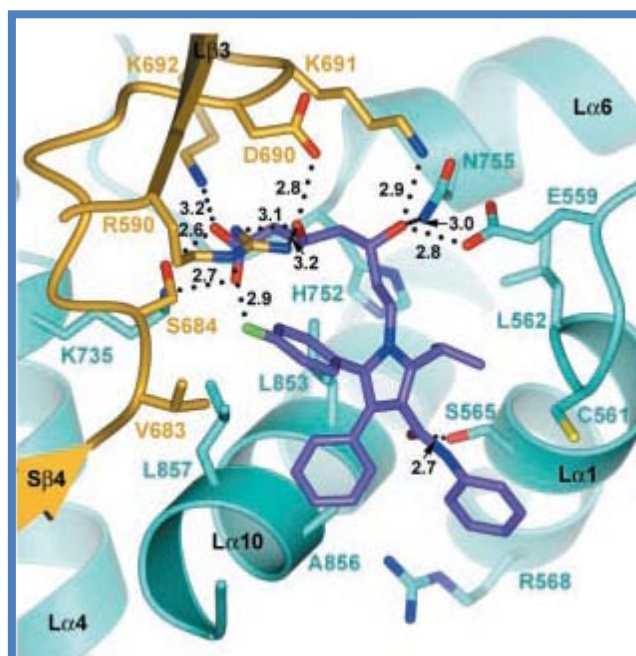
- A acção sobre os hepatócitos, podendo determinar a elevação de enzimas hepáticas;
- A acção sobre as fibras dos músculos esqueléticos, expressa eventualmente por aumento da concentração da creatina cinase total (CK total).

Por estas razões, a monitorização da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferases (AST), bem como de CK total é imprescindível.

## 5.1- Estrutura

A estrutura da atorvastatina pode ser dividida em três partes:

1. Uma parte é semelhante ao substrato da reductase da HMG-CoA, ou seja, a HMG-CoA, tornando-a um inibidor competitivo da enzima;
2. Um complexo hidrofóbico com estrutura em anel que está covalentemente ligado à estrutura análoga da HMG-CoA e está envolvida na ligação da atorvastatina à reductase;
3. E, por último, possui grupos laterais nos anéis que definem a sua solubilidade, bem como as suas propriedades farmacocinéticas ( Schachter, 2004).



**Figura 18** – Complexo da reductase da HMG-CoA com a atorvastatina.

**Fonte:** Istvan e col., 2001.

A estrutura desta estatina demonstra que esta se liga ao centro activo da reductase da HMG-CoA, impedindo a ligação do substrato à enzima.

## 5.2- Propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas

A atorvastatina é administrada sob a sua forma activa ( $\beta$ -hidroxiácido) e é rapidamente absorvida após administração, alcançando um pico de concentração no plasma ( $T_{máx}$ ) em 4

horas. A taxa de absorção da atorvastatina é afectada pela altura do dia em que é administrada; no entanto, os efeitos na diminuição lipídica são semelhantes quando administrada de manhã ou à tarde. Esta característica vai de encontro ao seu tempo de meia-vida que é longo, cerca de 14 horas (Schachter, 2004).

A tabela 2 menciona as propriedades farmacocinéticas principais da atorvastatina.

**Tabela 2** – Propriedades farmacocinéticas da atorvastatina.

	<b>Atorvastatina</b>
<b>Biodisponibilidade (%)</b>	14
<b>Solubilidade</b>	Lipofílica
<b>Efeito da alimentação na biodisponibilidade</b>	↓13%
<b>Ligação a proteínas plasmáticas (%)</b>	98
<b>Metabolitos activos</b>	√
<b>Meia-vida (h)</b>	14
<b>Metabolismo CYP450</b>	√
<b>Isoenzima</b>	3A4
<b>Excreção renal (%)</b>	<2
<b>Redução do colesterol total (%)</b>	25-45
<b>Redução de LDL (%)</b>	26-60

### ***Absorção***

A absorção da atorvastatina ronda os 30% e é rapidamente absorvida após administração oral, alcançando um pico máximo de concentração no plasma em 4 horas (Schachter, 2004).

A extensão da absorção e as concentrações plasmáticas de atorvastatina aumentam em proporção à dose administrada.

A ingestão de comida influencia a absorção da atorvastatina, diminuindo a sua biodisponibilidade. (Corsini e col., 1999)

A baixa disponibilidade sistémica é atribuída à depuração pré-sistémica na mucosa gastrointestinal e/ou ao metabolismo hepático de primeira passagem (Schachter, 2004; Corsini e col., 1999).

### ***Distribuição***

Como a maioria das estatinas, a atorvastatina tem uma grande afinidade para a ligação a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, alcançando valores percentuais de ligação iguais ou superiores a 98% (Corsini e col., 1999).

### ***Metabolismo***

A atorvastatina é predominantemente metabolizada pelo citocromo hepático P<sub>450</sub> 3A4 (CYP3A4). Os seus principais metabolitos activos são os ácidos 2-hidroxi- e 4-hidroxi-atorvastatina e são os principais responsáveis por cerca de 70% da actividade inibitória da HMG-CoA reductase (Corsini e col., 1999).

Estudos *in vitro* indicaram que esta estatina é um fraco inibidor do CYP3A4 e, portanto, não é de esperar que a atorvastatina altere significativamente a farmacocinética de outros substratos do CYP 3A4 (Schachter, 2004; Corsini e col., 1999; AIM do Zarator<sup>®</sup>, 2002).

### ***Excreção***

A atorvastatina e os seus metabolitos são eliminados principalmente na biliar, após metabolismo hepático ou extra-hepático (Schachter, 2004; Corsini e col., 1999). Entretanto, esta droga parece não sofrer recirculação entero-hepática (AIM do Zarator<sup>®</sup>, 2002).

A semi-vida de eliminação plasmática média da atorvastatina é de aproximadamente 14 horas, embora a semi-vida da actividade inibitória para a reductase da HMG-CoA seja de 20 a 30 horas, devido à contribuição dos metabolitos activos. Menos de 2% de uma dose de atorvastatina é recuperada na urina após administração oral (Schachter, 2004; AIM do Zarator<sup>®</sup>, 2002).

### ***Propriedades farmacodinâmicas***

Em modelos animais, a atorvastatina inibe a síntese de colesterol endocelular, por competição com a enzima HMG-CoA reductase, impedindo a transformação da HMG-CoA em mevalonato. Ao ocorrer a redução intracelular de colesterol, há estímulo para a formação de receptores das LDL à superfície da membrana celular. Um número superior de receptores presentes na superfície celular permite uma maior captação das LDL em circulação no plasma e o catabolismo das mesmas.

A atorvastatina reduz especialmente os níveis de LDL em doentes com hipercolesterolemia familiar (HF) homozigótica, que é uma população que raramente responde a outros fármacos hipolipemiantes (AIM do Zarator®, 2002).

## **6- AS ESTATINAS NA PREVENÇÃO DA CARCINOGENESE**

Como já foi descrito anteriormente, as estatinas actuam através da inibição da enzima moduladora da biossíntese de colesterol, resultando num efeito hipolipemiante comum, com redução da colesterolemia e do nível sérico do colesterol das LDL.

A par desta acção, as estatinas também inibem a síntese de isoprenóides da via do mevalonato como o farnesil pirofosfato e o geranylgeranyl pirofosfato, independentemente da inibição da síntese de colesterol (Silva e col., 2006; Xiau e col., 2008; Demierre e col., 2005).

Neste passo de activação (denominado isoprenilação), as porções farnesil e geranylgeranyl estão acopladas à proteína, originando proteínas farnesiladas ou geranylgeranyladas e facilitando a ligação destas à membrana para, assim, desempenharem a sua função (Graaf e col., 2004).

Várias proteínas envolvidas na sinalização celular requerem a prenilação para serem activadas, como é o caso da proteína Ras, Rho, Cdc42, lâminas nucleares, transdução rodopsina cinase, todas as proteínas G heterotriméricas remanescentes e pequenas proteínas G (Sleijfer and col., 2005; Moyad e col., 2005). Assim, se a isoprenilação destas proteínas for impedida, as proteínas farnesiladas e geranylgeranyladas acumulam-se no citosol, inibindo as funções celulares vitais.

É esta capacidade de inibir a activação de algumas proteínas acima referidas e de diminuir os níveis de colesterol, que torna as estatinas como potenciais fármacos anti-tumorais.

Esta propriedade tem sido alvo de investigação em estudos *in vivo* e *in vitro* (Xiau e col., 2008; Shachaf e col. 2007), no entanto, ainda não é possível perceber com clareza se as estatinas previnem ou não o cancro, devido a resultados discordantes. Uma possível explicação para estas conclusões conflituosas é que só em alguns tumores ou apenas estatinas específicas podem ser eficazes (Shachaf e col. 2007).

As estatinas podem ter a capacidade de inibir o crescimento tumoral através do bloqueio do ciclo celular ou indução da apoptose, aumentar a imunidade celular pela redução de alguns mecanismos de resistência, prevenir a angiogénese pela inibição da adesão e crescimento das células endoteliais ou redução das concentrações de factores pró-angiogénicos e de reduzir a capacidade metastática através da redução do número de compostos de adesão (Sleijfer and col., 2005; Moyad e col., 2005).

Têm sido identificados vários mecanismos que evidenciam o efeito anti-proliferativo das estatinas. Elas comprometem o ciclo celular na transição da fase G1-S através da diminuição da regulação de factores que promovem o ciclo celular, como é o caso de algumas cinases dependentes de ciclinas (cdk ou “cyclin-dependent kinase) ou aumentando a regulação dos níveis de inibidores do ciclo celular, p21 ou p27. O aumento dos níveis de p21 podem ocorrer através da estimulação da transcrição e/ou a partir da incapacidade de degradação por bloqueio da função do proteossoma. (Sleijfer e col., 2005; Wächterhäuser e col., 2001; Rao e col., 1999; Okumadu e col., 2003)

A resistência à apoptose é uma característica da carcinogénese e por isso, a indução da apoptose é um ponto fulcral no desenvolvimento de drogas preventivas, uma vez que contribui para a inibição do crescimento.

As estatinas podem induzir a apoptose por regulação de várias vias de sinalização, inclusive a via MAPK/ERK (*Mitogen activated protein kinase/extracellular regulated kinase pathway*) ou promovendo a baixa expressão de proteínas anti-apoptóticas (Demierre e col., 2005).

Em estudos efectuados numa linhagem de células NIH3T3, verificou-se que a proteína RHO activada regula a expressão da proteína anti-apoptótica BCL2, revertendo a apoptose induzida por uma estatina. A diminuição da regulação da BCL2 e ERK1/ERK2 provocada pela estatina foi revertida pelo GGPP, o que significa que a indução da apoptose aumenta com os níveis diminuídos da expressão de BCL2 (Wu e col., 2004; Demierre e col., 2005).

O efeito das estatinas na proliferação e na apoptose parecem ser independentes, mas a indução da apoptose contribui para a inibição do crescimento. Estes efeitos têm uma maior repercussão em células malignas do que em células normais, possivelmente devido à

expressão aumentada da reductase da HMG-CoA e devido ao facto das células tumorais necessitarem de isoprenóides derivados do mevalonato em maior proporção (Demierre e col., 2005).

Para além de estudos *in vitro*, realizaram-se estudos *in vivo* que confirmaram a inibição do crescimento tumoral induzida pelas estatinas.

Narisawa e os seus colaboradores (1996) demonstraram que a administração de uma estatina (pravastatina) inibiu a incidência de tumores induzidos quimicamente em ratos (Graaf e col., 2004).

Os resultados obtidos nestes estudos vieram confirmar que as estatinas podem inibir o crescimento tumoral primário pela indução da apoptose e inibição do crescimento.

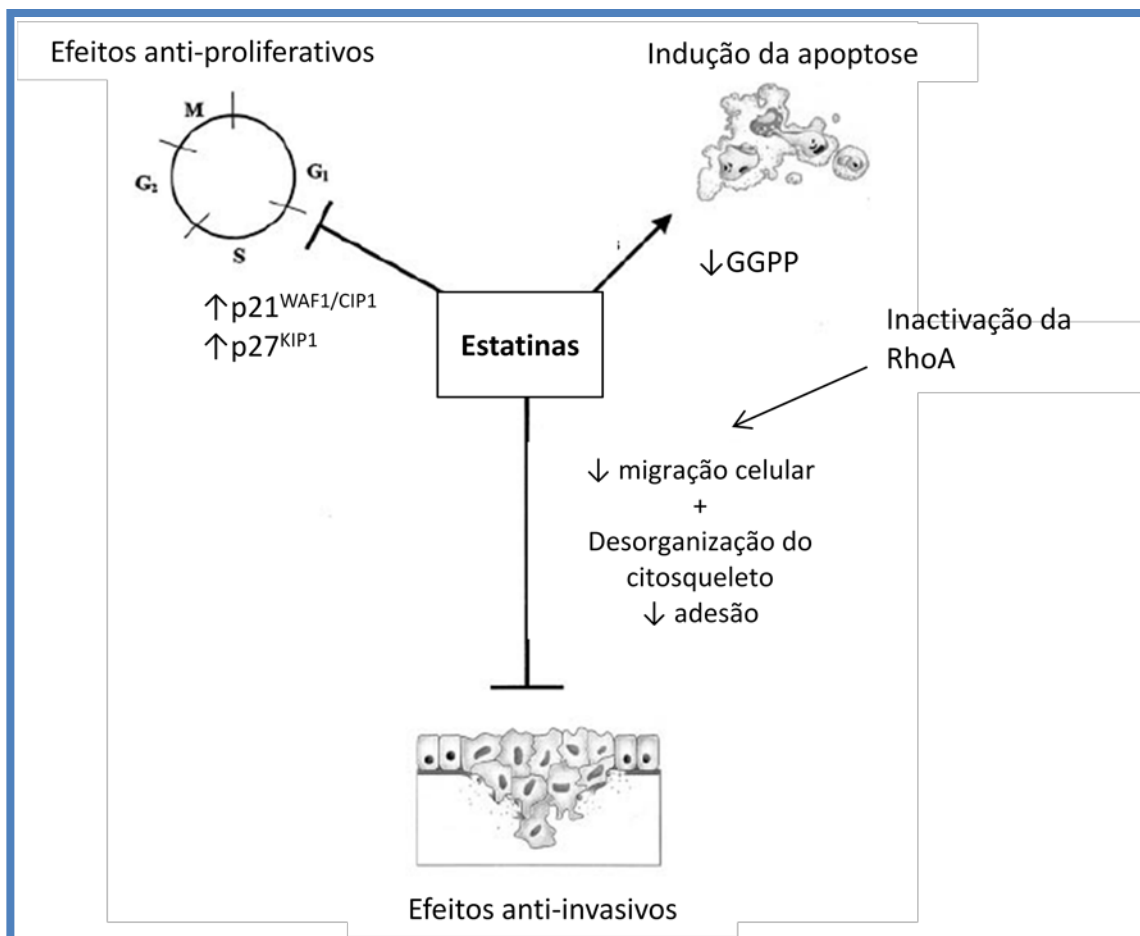
Outro efeito anti-tumoral das estatinas é mediado através da inibição da angiogénese.

Foi revelado experimentalmente que as estatinas exerciam um efeito bifásico dependente de dose. Nestes estudos, a angiogénese era activada (*in vitro e in vivo*) por concentrações baixas (equivalente a doses baixas/médias usuais na terapêutica humana) pela via de activação da NOS, uma vez que o NO promove o aumento da proliferação e migração de células endoteliais. Contrariamente, a angiogénese é reprimida por níveis elevados de estatinas. O efeito angioestático de concentrações elevadas das estatinas estaria relacionado com a diminuição da expressão do VEGF, com o aumento da apoptose endotelial e com a redução da vascularização e do crescimento tumoral (Silva e col., 2006, Weis e col., 2002; Dulak e col., 2005).

A inibição de vias de sinalização celular associadas às propriedades invasivas e metastáticas do cancro é mais uma propriedade anti-tumoral atribuída às estatinas.

Durante o processo metastático, as células desagregam-se do tumor primário, entram e saem da circulação, e começam a crescer num local secundário (Graaf e col., 2004)

Vários estudos sugerem que as estatinas diminuem o potencial metastático de células tumorais, através da inibição da migração celular, ligação à matriz extra-celular e invasão da membrana basal. Para além de reduzirem moléculas de adesão endotelial, como a E-selectina e diminuírem a expressão da metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), as estatinas têm demonstrado inibir a invasão de células tumorais induzida pelo factor de crescimento endotelial (Chan e col., 2003; Hindler e col., 2006).



**Figura 20** – Mecanismos antitumorais propostos das estatinas.  
**Fonte:** Chan e col., 2003.

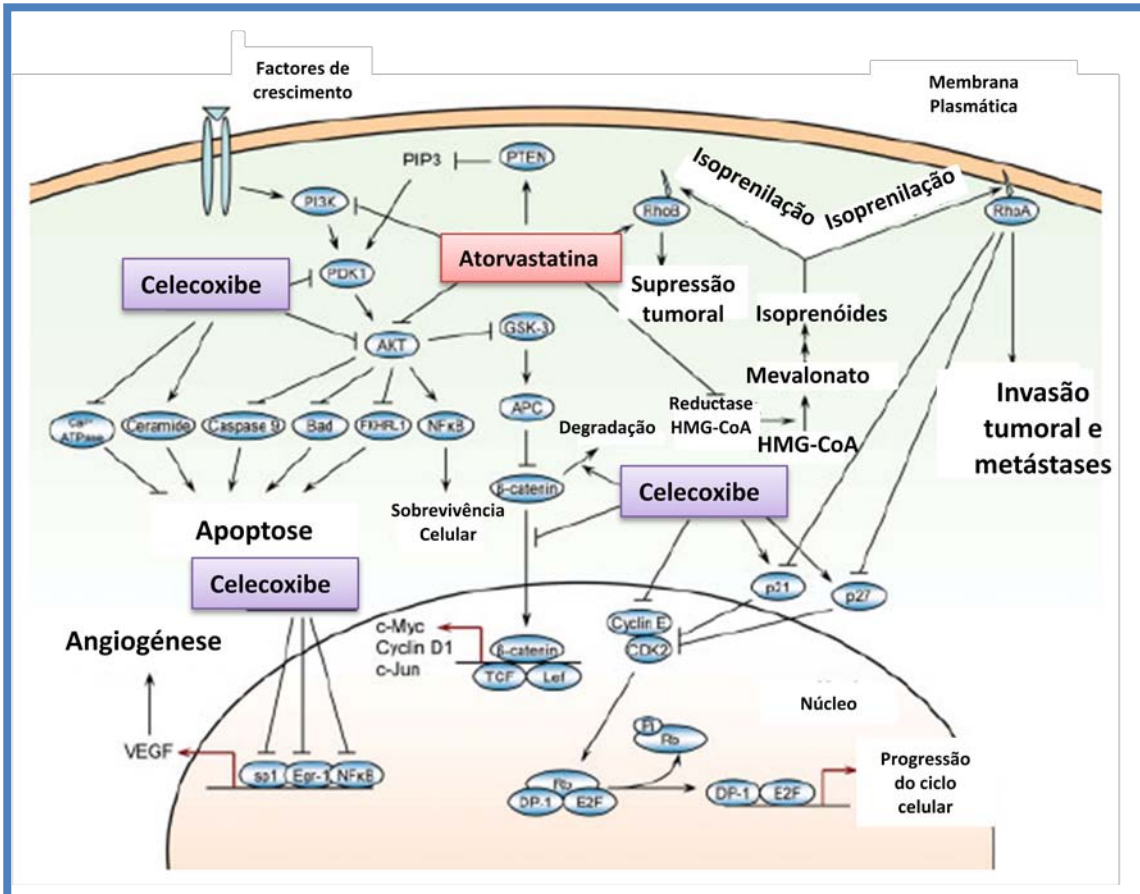
A ideia de recorrer à combinação de agentes quimiopreventivos para o tratamento de tumores tem recebido, recentemente, uma especial atenção.

Várias evidências em estudos realizados, sugerem que a combinação de agentes quimiopreventivos do cancro com diferentes mecanismos de acção pode desencadear vários tipos sinérgicos de interações, originando efeitos protectores consideravelmente mais fortes contra a carcinogénese do que se actuarem individualmente (Xiao e col., 2008; Lu e col., 2008). A eficácia aumentada pela combinação pode diminuir a dose requerida para cada um dos compostos, que, por sua vez, reduz os efeitos laterais indesejáveis, provavelmente provocados pelo uso de doses mais elevadas quando administrados de forma individual (Graaf e col., 2004; Xiao e col., 2008; Reddy e col., 2006).

Em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, as estatinas apresentavam um efeito sinérgico quando combinado com outros fármacos, nomeadamente com drogas anti-inflamatórias não esteróides (AINES).

A sinergia resultante dessa combinação promove repercussões, principalmente na inibição do crescimento e na indução da apoptose em células cancerígenas.

A Figura 21 representa os possíveis mecanismos moleculares da atorvastatina e do celecoxib como possíveis agentes quimiopreventivos.



**Figura 21** – Mecanismos moleculares da atorvastatina e celecoxib como agentes quimiopreventivos.

Fonte: Xiau e col., 2008

A atorvastatina, para além de inibir actividade da reductase da HMG-CoA, inibe outras vias de sinalização, entre elas a via Akt, desencadeando a apoptose das células tumorais (Xiau e col., 2008; Demierre e col., 2005).

Já os efeitos anti-tumorais dos AINES são atribuídos aos seus efeitos inibidores sobre as cicloxigenases.

O mau funcionamento da cicloxigenase-2 (COX-2) está associado à carcinogénese, por promover a sobrevivência celular, a angiogénese e o aparecimento de metástases (Xiau e col., 2008).

No entanto, estudos recentes sugerem que existem mecanismos independentes da COX-2 para a quimioprevenção de tumores através da acção dos AINEs. Os tratamentos com celecoxibe induzem o bloqueio do ciclo celular na fase G1 em diversas células cancerígenas, por aumento dos níveis de expressão de inibidores das Cdk e diminuição da expressão de ciclinas. Este efeito do celecoxibe, tal como a atorvastatina, pode ser mediado pela sua acção inibitória na via de sinalização Akt onde pode fosforilar e inactivar a p21 e p27. Os possíveis mecanismos que conferem ao celecoxibe a propriedade pró-apoptótica incluem a inibição da Akt, a inibição da transcrição do ~~NFB~~ e de outros produtos apoptóticos (Xiau e col., 2008; Dulak e col., 2005).

O tratamento sinérgico da combinação de celecoxibe com atorvastatina provoca o bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, sendo este efeito mais notável em combinação de doses baixas do que em situações de monoterapia de cada um destes fármacos (Xiau e col., 2008; Demierre e col., 2005).





# OBJETIVOS



---

O carcinoma da bexiga é uma neoplasia com taxas de incidência e prevalência preocupantes, e com elevada percentagem de recidiva após redução cirúrgica e início de tratamento terapêutico. A descoberta dos seus mecanismos fisiopatológicos, a nível celular e molecular, é de crucial importância, e só a partir destes se poderá, com maior eficácia, testar fármacos para prevenção.

O modelo de indução de carcinoma da bexiga por uma nitrosamina (n-Butil-N- (4-hidroxibutil) nitrosamina) - BBN- em ratos Wistar tem sido importante para o estudo dos processos envolvidos no desenvolvimento tumoral, bem como para a caracterização das lesões.

Os estudos anteriores do Grupo de Investigação de Terapêutica do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra demonstraram que este modelo é adequado para avaliar os mecanismos fisiopatológicos associados ao carcinoma da bexiga. Mais ainda, permitiram sugerir alguns fármacos com potencial efeito benéfico na prevenção do carcinoma, designadamente pela sua possível interferência em mecanismos de proliferação, stresse oxidativo e inflamação. Um dos grupos de fármacos de potencial interesse é o das estatinas que, para além das suas conhecidas propriedades anti-dislipidémicas, são-lhes atribuídas outras capacidades, conhecidas como efeitos pleiotrópicos, que podem aqui ter um papel especialmente interessante na prevenção do desenvolvimento tumoral.

Assim, o objectivo deste estudo consiste em avaliar as potencialidades das estatinas, mais especificamente da atorvastatina, no tratamento preventivo do carcinoma da bexiga induzido por um composto carcinogénico (BBN) em ratos Wistar, passando por duas fases distintas:

1. Caracterizar e validar, face aos trabalhos anteriores, o modelo de carcinoma da bexiga induzido por BBN em ratos Wistar machos.
2. Avaliar a capacidade da atorvastatina na prevenção do desenvolvimento do carcinoma da bexiga, em monoterapia (baixa e alta dose), e em associação com um inibidor selectivo da ciclooxigenase 2 (Celecoxibe).

Para concretizar os objectivos propostos foi idealizado um protocolo experimental, com os seguintes grupos em estudo:

- Controlo (Veículo): sem administração de qualquer fármaco ou de BBN, apenas sumo de laranja por via oral.
- EST 30 mg: grupo com administração, por via oral, de atorvastatina 30 mg dissolvida em sumo de laranja, ao longo de 8 semanas.
- CEL (10 mg): grupo com administração oral de celecoxibe 10 mg dissolvido em sumo de laranja, ao longo de oito semanas.
- BBN: grupo tratado com BBN (0,05%) diluído em água durante 8 semanas para indução tumoral na bexiga, período a seguir ao qual se seguem 12 semanas de estabelecimento do tumor.
- EST (3 mg) + BBN: grupo preventivo de alta dose, com administração oral de atorvastatina 30 mg em sumo de laranja e BBN (0,05% diluído em água) ao longo das 8 primeiras semanas.
- EST (3 mg) + BBN: grupo de ratos com indução tumoral pelo BBN (até à semana 8), cuja administração por via oral de atorvastatina (3 mg) é aplicada nas primeiras 8 semanas da experiência.
- EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN: grupo de ratos com indução tumoral gerada pelo BBN durante as primeiras 8 semanas, com administração oral em simultâneo de atorvastatina 3 mg e de celecoxibe (1 mg) dissolvidas em sumo de laranja.

De acordo com a literatura, foi estipulado um período experimental de 20 semanas, cujas primeiras 8 correspondem à administração do BBN para a indução de tumores, e as 12 restantes correspondem ao período de evolução das alterações esperadas.

A análise do desenvolvimento tumoral, complementada com a análise de vários parâmetros relacionados com a hemodinâmica e as funções renal, hepática e cardíaca, foi realizada através da avaliação dos perfis quantitativo/qualitativo dos carcinomas da bexiga. Para além disso, foram doseados alguns marcadores com a finalidade de avaliar mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas possíveis alterações. Os parâmetros em questão são os seguintes:

#### **I – Parâmetros de caracterização geral, bioquímica e hemodinâmica**

1. Medição do peso corporal e da quantidade de BBN e água ingerida ao longo do estudo.

2. Determinação de parâmetros de avaliação da função cardíaca
  - Pressões arteriais e frequência cardíaca
  - Massas cardíaca e ventricular esquerda
  
3. Avaliação bioquímica
  - Concentração sérica de Glicose
  - Concentração sérica de CK
  
4. Avaliação bioquímica da função renal
  - Concentrações séricas de creatinina e azoto ureico
  - Massa renal
  
5. Avaliação bioquímica da função hepática
  - Actividade da transaminase glutamo-oxaloacética (TGO) e a transaminase glutamo-pirúvica (TGP)
  - Massa hepática
  
6. Avaliação do perfil lipídico
  - Colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL e colesterol-LDL
  - Índices aterogénicos
  
7. Parâmetros de trofismo
  - Medição das massas do coração, do ventrículo esquerdo, dos rins e do fígado
  - Relações destes órgãos com o peso corporal do animal
  
8. Parâmetros hemorreológicos
  - Plaquetas
  - Eritrócitos

## **II – Caracterização histomorfológica do carcinoma da bexiga**

1. Avaliação do perfil macroscópico
2. Avaliação do perfil microscópico
3. Avaliação quantitativa do tumor da bexiga

**III – Avaliação de factores tumorais, inflamatórios e de equilíbrio oxidativo**

1. Factor de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ )
2. Facto de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )
3. Proteína C reactiva (PCR)
4. Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )
5. Interleucina 6 (IL-6)
6. Peroxidação lipídica (MDA)
7. Capacidade antioxidante total (TAS)



# MATERIAL E MÉTODOS



## **1 – ANIMAIS E DIETA: PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

### **1.1 – Animais e acondicionamento**

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos (n=50) provenientes do biotério Charles-River (Barcelona, Espanha) e mantidos devidamente, de acordo com as normas legais e éticas em vigor, no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Os ratos chegaram ao laboratório com 8 semanas de idade e apresentavam massas corporais médias compreendidas entre os 397 e os 465 gramas. Ao longo do estudo, os ratos estavam acomodados em gaiolas apropriadas, 3 ou 4 por gaiola, num armário ventilado, com temperatura controlada ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade diária de 12 horas.

Os animais foram alimentados com base numa dieta sintética apropriada (SAFE A-04, Augy, França) *ad libitum*. Considerando os 7 diferentes grupos submetidos ao estudo, três beberam água destilada ao longo de 20 semanas, enquanto que os quatro grupos restantes beberam uma solução com a concentração de 0,05% de BBN diluída em água, durante as primeiras 8 semanas de tratamento, e água destilada nas 12 semanas seguintes, também *ad libitum*.

Este estudo foi realizado em concordância com as Convenções Europeias de manuseamento de animais em investigação.

### **1.2 – Grupos em estudo**

Antes de dar início ao estudo, os animais passaram por um período de adaptação ao meio (aproximadamente uma semana) e não foram sujeitos a nenhum tratamento. Posteriormente, os animais foram divididos de forma aleatória em 7 grupos diferentes e submetidos diariamente a diferentes tipos de dietas e tratamentos:

#### **I. Grupo Controlo**

Grupo constituído por 6 ratos, submetidos a uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*, sendo ainda administrado, por via oral, sumo de laranja através de cânula esofágica, durante 20 semanas.

## II. Grupo Estatina 30 mg – EST (30 mg)

Grupo de 4 ratos, aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*, sendo ainda administrados por via oral (cânula esofágica) 30 mg/Kg/dia/rato de atorvastatina (Zarator<sup>®</sup>, Pfizer) diluída em sumo de laranja, apenas durante as primeiras 8 semanas de estudo.

Este grupo tem como principal finalidade a de se poder avaliar os efeitos deste fármaco, *per se*, nos parâmetros em causa, bem como possíveis efeitos adversos, para além de servir de comparação na avaliação dos efeitos preventivos de tumores dos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN.

## III. Grupo Celecoxibe 10 mg – CEL (10 mg)

Grupo de 4 ratos aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*. Foram ainda administrados, por via oral, 10 mg/kg/dia/rato de Celecoxibe (Celebrex<sup>®</sup>, Pfizer) diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

O tratamento com Celecoxibe de forma isolada serve para avaliar os efeitos deste fármaco, por si só, ao nível dos parâmetros em questão.

## IV. Grupo BBN

Grupo de 12 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida BBN (0,05%) nas primeiras 8 semanas do tratamento e água destilada nas restantes.

A existência deste grupo no estudo teve como objectivo confirmar a capacidade do BBN em induzir tumores na bexiga, por comparação com o grupo Controlo.

## V. Grupo EST (30 mg) + BBN

Grupo de 8 ratos, aos quais foi disponibilizado, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (0,05%) nas primeiras 8 semanas e água destilada nas restantes 12. Adicionalmente, e durante as primeiras 8 semanas do estudo, foram administrados por via oral através de cânula esofágica, 30 mg/Kg/dia/rato de atorvastatina diluída em sumo de laranja.

Este grupo, sujeito a um tratamento de EST (30 mg) e BBN, foi realizado com a intenção de avaliar o potencial efeito antiproliferativo e antitumoral da atorvastatina, em carácter preventivo, quando administrada em dose elevada.

**VI. Grupo EST (3 mg) + BBN**

Grupo composto por 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução 0,05% de BBN (durante as primeiras 8 semanas do estudo) e água (nas restantes 12 semanas). Também foi administrada, por via oral através de cânula esofágica, 3 mg/kg/dia/rato de atorvastatina, diluída em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas de tratamento.

O tratamento com EST (3 mg) e BBN nos animais deste grupo tem a finalidade de avaliar os possíveis efeitos na prevenção tumoral e proliferativa por parte da atorvastatina de baixa dose sobre as potenciais alterações desencadeadas pelo BBN. Este grupo vai ajudar a aferir as reais capacidades preventivas do grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, por comparação directa entre os dois grupos.

**VII. Grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN**

Grupo constituído por 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN a 0,05% durante as primeiras 8 semanas do estudo e água nas restantes. Adicionalmente, foram ainda administradas, por via oral através de cânula esofágica, atorvastatina 3 mg/Kg/dia e celecoxibe 1 mg/Kg/dia, ambos dissolvidos em sumo de laranja durante as primeiras 8 semanas do tratamento.

Este grupo teve como principal objectivo estudar possíveis efeitos sinérgicos da atorvastatina e do celecoxibe na prevenção de tumores por parte do BBN.

Na Figura 22 estão representados esquematicamente o “desenho” e os diferentes grupos de estudo.

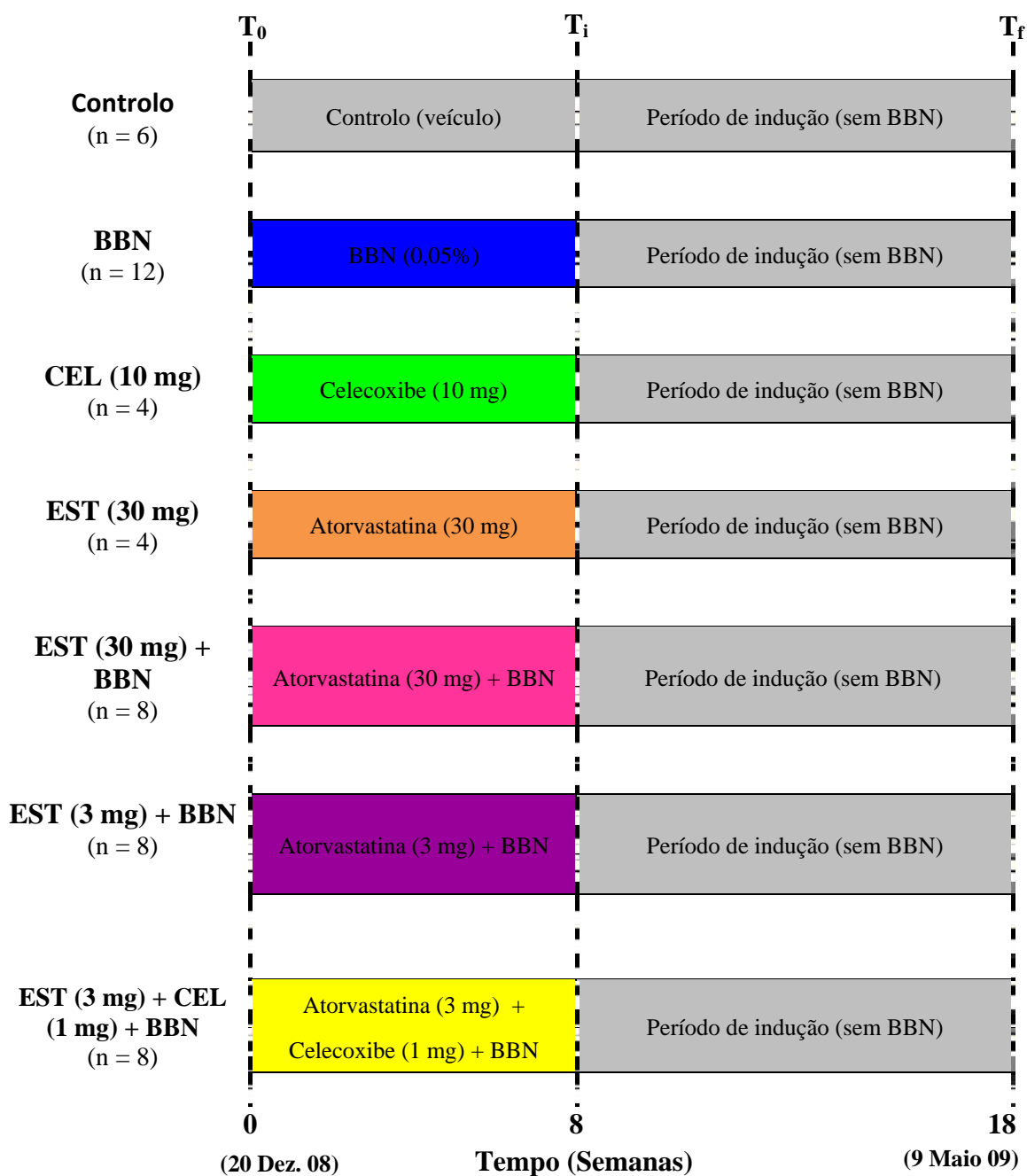


Figura 22 – “Desenho” do estudo.

As administrações dos fármacos dissolvidos em sumo de laranja foram realizadas através de uma cânula esofágica, sempre entre as 15:00 e as 16:00, de forma a minimizar o stress provocado no animal e foram executadas com o máximo cuidado para não causar ferimentos/traumatismos nos mesmos.

Um rato do grupo EST (30 mg) + BBN e dois do grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN morreram às 8 semanas de tratamento devido a um problema técnico (falha de energia na sala de experimentação animal que causou o não funcionamento do armário de acondicionamento

dos animais) e, por isso, foram excluídos dos resultados analisados. Somente os animais que sobreviveram às 20 semanas de duração do protocolo experimental foram efectivamente incluídos nos resultados.

### **1.3 – Monitorização da massa corporal**

Os animais foram pesados numa balança analítica (KERN CB 6 K1, Alemanha) à sua chegada e a partir daí, semanalmente, durante todo o período experimental. Após sacrifício dos animais, foi colhido sangue e recolhidos alguns órgãos, como o coração, os rins e o fígado, para além da bexiga.

### **1.4 – Monitorização da bebida ingerida**

Como já foi dito anteriormente, o tipo de bebida variou nos diferentes grupos em estudo, e, por isso, foi necessária a monitorização da quantidade ingerida ao longo das 20 semanas do estudo, através de biberões graduados, com controlo rigoroso dos seus volumes 3 vezes por semana.

## **2 – AVALIAÇÃO DAS PRESSÕES ARTERIAIS**

Para verificar possíveis repercussões dos fármacos e do BBN ao nível cardiovascular, avaliaram-se as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), assim como a frequência cardíaca (FC) ao longo do estudo (semanas 0, 8 e 18) em todos os grupos.

O método de avaliação das pressões arteriais foi efectuado na artéria da cauda do rato, pelo método “*tail-cuff*”. Esta metodologia é realizada através de um esfigmomanómetro (modelo LE 5001) e de uma gaiola de contenção adequada, provenientes da Leticia (Barcelona, Espanha).

Tendo em conta a “natureza hiperactiva” do animal e a forma de medição das pressões arteriais, é necessário recorrer a alguns cuidados especiais para facilitar a obtenção de medições mais correctas. Para isso, realizou-se, numa fase prévia ao estudo, uma adaptação do rato à gaiola de contenção, para minimizar o stresse do animal em condições de imobilização quase total. Para facilitar a acuidade da medição, o rato foi submetido a uma temperatura de 25 a 30°C durante 15 minutos, aproximadamente, de forma a provocar vasodilatação dos vasos periféricos.

Dado que se obtiveram, através deste método, um elevado número de medições, e tendo em conta que muitas delas resultam da hiperactividade do animal, é necessária a rejeição de alguns valores que não pertençam ao intervalo real.

### 3 – COLHEITA DE SANGUE E RECOLHA DE ÓRGÃOS

O sangue foi obtido da veia jugular dos ratos, previamente anestesiados com 2 mL/Kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ mL de cloridrato de cetamina (Ketalar®) em clopromazina a 2,5% (Lagarartil®), via intraperitoneal. A colheita de sangue foi obtida por intermédio de seringas de 5 mL, cujas agulhas foram passadas antecipadamente por heparina (B Braun Melsunger AG, Alemanha) para evitar a coagulação quase instantânea durante o processo de recolha do sangue.

Após obtenção, em média, de cerca de 10 mL de sangue de cada rato, procedeu-se à sua transferência para diferentes tubos consoante as diferentes determinações analíticas que se pretendem. Assim, uma parte do sangue foi depositada num tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer®; SST™II Advance) para a obtenção de soro e o restante foi distribuído por um tubo com um polímero de gel de K<sub>2</sub>EDTA (BD Vacutainer®; SST™II Advance) e por um tubo com heparina-lítio (Sarstedt, Monovette®) para a obtenção de plasma e de sangue total, respectivamente.

Realizada a colheita de sangue nos animais, estes foram seguidamente eutanasiados. Foi, então efectuada uma incisão mediana xifo-púbica para a exposição dos órgãos intra-abdominais e posterior recolha de alguns órgãos, como a bexiga, rins e fígado e, de seguida, realizou-se uma toracotomia para remover o coração.

Imediatamente a seguir à recolha dos órgãos, estes foram colocados em caixas de Petri que continham uma solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4, a 4°C) constituída por CaCl<sub>2</sub> (2,5 mM), D-glucose (11 mM), KCl (4,8 mM), NaCl (118 mM), NaEDTA (0,03 mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (24 mM) e ácido ascórbico (0,06 mM) para permitir a sua conservação enquanto é efectuada a limpeza dos tecidos, assim como a remoção de gorduras. De seguida, os órgãos foram pesados e divididos em várias partes para as diversas avaliações, e acondicionados numa câmara frigorífica a -80°C.

A bexiga foi sujeita a um tratamento diferente em relação aos outros órgãos recolhidos, no que respeita à sua preservação, para posterior estudo histológico. Ainda antes de ser retirada, e após colheita da urina para futura realização de exame citológico urinário, a

bexiga foi injectada com formol tamponado a 10% (assumindo a forma em balão) e fechada posteriormente, para que o formol tamponado se mantenha dentro da bexiga.

#### **4 – DETERMINAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS INDICADORES DE TROFISMO**

Para estabelecer relações que possam ser indicadoras de trofismo em alguns órgãos, registaram-se as massas do coração e do ventrículo esquerdo, para que, juntamente com as massas corporais dos animais, se obtivessem as razões massa cardíaca sobre a massa corporal, massa ventricular esquerda sobre a massa corporal e massa ventricular esquerda sobre a massa cardíaca.

Também se registaram as massas dos rins e do fígado que, com as massas corporais de cada rato, serviram para calcular as razões massa hepática/massa corporal e massa renal/massa corporal para avaliar o nível de trofismo aos níveis hepático e renal, respectivamente.

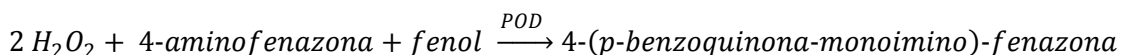
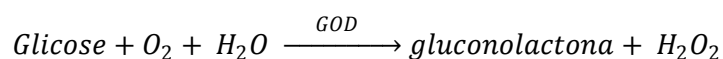
#### **5 – PERFIL BIOQUÍMICO**

A partir das amostras de sangue total, soro e plasma obtidos de cada rato, foram determinados alguns parâmetros bioquímicos para avaliar as funções renal e hepática, os perfis glicémico e lipídico.

##### **5.1 – Perfil glicémico**

As concentrações séricas de glicose foram obtidas a partir de um analisador automático (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA) padronizado para análises clínicas.

A análise glicémica no soro baseia-se num *kit* (Glu, Roche) que aplica um teste enzimático colorimétrico. Na presença de oxigénio atmosférico, a glicose é oxidada em gluconolactona por acção da glicose oxidase (GOD). O peróxido de hidrogénio resultante é oxidado e, juntamente com a 4-aminofenazona e fenol e por acção da peroxidase (POD), origina 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona:



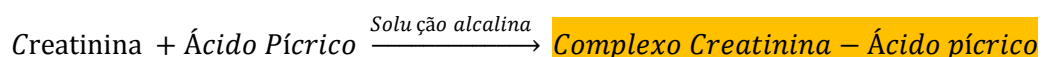
A intensidade cromática é determinada fotometricamente e é directamente proporcional à concentração de glicose. O analisador automático calcula automaticamente a concentração de glicose em cada amostra, cujos resultados são expressos em mg/dL.

## 5.2 – Avaliação da função renal

No sentido de avaliar a função renal, foram quantificados alguns parâmetros séricos, nomeadamente a creatinina, o ácido úrico e o azoto ureico. As concentrações destes parâmetros existentes no soro de todos os animais em estudo foram determinadas através de métodos e aparelhos (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA) padronizados para análises clínicas.

### 5.2.1 – Creatinina

Para a determinação da concentração sérica de creatinina foi utilizado um *kit* comercial (Crea, Roche) que se baseia num teste cinético colorimétrico. A creatinina sérica, juntamente com o ácido pícrico e em solução alcalina, forma um complexo amarelo-alaranjado:

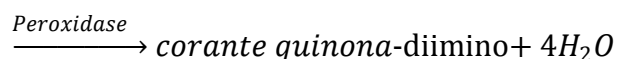
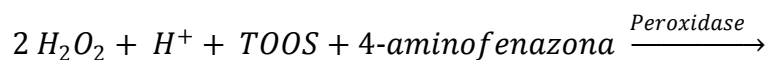
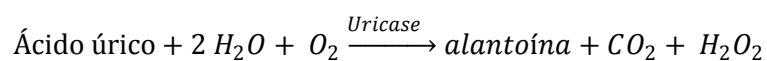


A intensidade cromática é directamente proporcional à concentração de creatinina e é determinada fotometricamente. O analisador (Hitachi 717) calcula automaticamente os valores das concentrações séricas de creatinina de cada amostra e apresenta-os em mg/dL.

### 5.2.2 – Ácido úrico

O teste utilizado para a determinação da concentração sérica de ácido úrico consiste numa análise (*kit* comercial, UA plus, Roche) e tem por base um teste enzimático colorimétrico. Neste método, o ácido úrico presente no soro é convertido em alantoína e em peróxido de hidrogénio por acção da uricase. Por sua vez, o peróxido de hidrogénio forma,

juntamente com a 4-aminofenazona e N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilnilina (TOOS) e por acção da peroxidase, um corante de quinona-diimino:



A intensidade cromática do corante formado é obtida fotometricamente, e é directamente proporcional à concentração do ácido úrico. O analisador (Hitachi 717) calcula automaticamente a concentração em ácido úrico de cada amostra, expressando o resultado em mg/dL.

### 5.2.3 – Azoto ureico

A determinação de azoto ureico no soro depende directamente da concentração de ureia. Por isso, a sua determinação baseia-se na concentração de ureia presente no soro e de um factor de conversão, segundo a fórmula:

$$\text{Azoto Ureico} = 0,47 \times \text{Ureia}$$

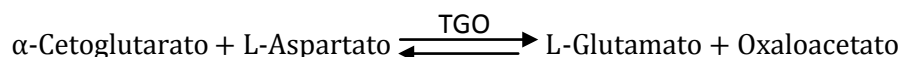
Os resultados obtidos são expressos na mesma unidade da concentração de ureia, ou seja, em mg/dL.

### 5.3 – Avaliação da função hepática

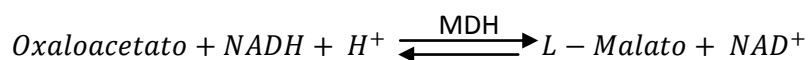
Para avaliar a função hepática, foi determinada em soro a actividade das enzimas presentes no fígado: a transaminase glutamo-oxaloacética (TGO) e a transaminase glutamo-pirúvica (TGP). A determinação das suas actividades é realizada a partir de métodos e aparelhos (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA) padronizados para análises clínicas.

### 5.3.1 - *Transaminase glutamo-oxaloacética (TGO)*

Foi determinada a actividade da TGO recorrendo a um *kit* comercial (AST, Roche), que utiliza um processo cinético enzimático e baseia-se no método de referência da *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC). A TGO catalisa a reacção de equilíbrio entre o  $\alpha$ -cetoglutarato e o L-aspartato:



O aumento de oxaloacetato é medido através de uma reacção indicadora, catalisada pela malato-desidrogenase (MDH), onde o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$ :



É possível determinar fotometricamente a velocidade com que a concentração de NADH diminui e é directamente proporcional à velocidade de formação de oxaloacetato e, em simultâneo, com a actividade da TGO. Os resultados são calculados automaticamente pelo analisador e estão expressos em UI/L.

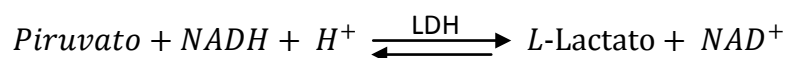
### 5.3.2 - *Transaminase glutamo-pirúvica (TGP)*

A determinação da actividade da TGP é idêntica à determinação da TGO. Neste caso, utiliza-se um *kit* comercial para esta enzima (ALT, Roche) que se baseia no método de referência da IFCC, também ele cinético enzimático.

A TGP catalisa a reacção de equilíbrio entre o  $\alpha$ -cetoglutarato e a L-alanina:



O aumento da concentração de piruvato é determinado através de uma reacção indicadora, onde o NADH é oxidado a  $\text{NAD}^+$ , catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH):



A velocidade de diminuição na concentração de NADH, mensurável fotometricamente, é directamente proporcional à velocidade de formação de piruvato e, conseqüentemente, à actividade da enzima TGP. O ensaio é realizado através de um analisador automático e os resultados expressos em UI/L.

## **5.4 – Avaliação do perfil lipídico**

### ***5.4.1 – Determinação das concentrações de colesterol total, lipoproteínas e triglicéridos***

As concentrações de colesterol total (Col. Total), colesterol HDL (col.-HDL) e colesterol LDL (col.-LDL), bem como os triglicéridos (TGs), todas presentes no soro, foram determinadas através de metodologias e aparelhos (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA) padronizados para análises clínicas.

As determinações de colesterol total e de TGs foram efectuadas recorrendo respectivamente ao *Cholesterol RTU® reagent (bioMérieux® SA)* e ao *kit TG PAP 1000 (bioMérieux® SA)*.

Ambas as metodologias são colorimétricas e fundamentam-se na aplicação sequencial de colesterol esterase, oxidase e peroxidase (no caso do colesterol total) e lipase, glicerolcinase, glicerol-3-fosfato oxidase, peroxidase e cromogénio (no caso dos TGs).

A intensidade da cor da quinoneimina – produto final formado das sequências enzimáticas – é medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 500 nm, e a sua intensidade é proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.

No caso do col.-HDL e col.-LDL, para a determinação das suas concentrações, recorreram-se a métodos directos de 2ª geração HDL-c Plus e LDL-c Plus da F. Hoffmann- La Roche Ltd., e baseiam-se na formação de um corante após a aplicação de colesterol esterase e oxidase. A intensidade deste corante, mensurável espectrofotometricamente, é directamente proporcional à quantidade de col.-HDL e col.-LDL existente na amostra.

Para além das determinações das concentrações séricas, foram também calculados alguns índices específicos que podem indicar alterações numa perspectiva dislipidémica e aterogénica como as razões col.-LDL/Col. Total, Col. Total/col.-HDL e col.-LDL/col.-HDL.

## 6 – HEMOGRAMA

Foram avaliados vários indicadores hematológicos dos animais pertencentes aos diferentes grupos de estudo, ao nível plaquetar e eritrocitário.

Dentro dos indicadores relacionados com as plaquetas, foram analisados o número de plaquetas (PLT), o plaquetócrito (PTC), o volume plaquetar médio (VPM) e o coeficiente de variação plaquetar (CVP).

Relativamente aos indicadores hematológicos relacionados com os glóbulos vermelhos, foram analisados o número de glóbulos vermelhos (GV), a concentração de hemoglobina (Hb), o hematócrito (HTC), o volume corpuscular médio (VCM) e o coeficiente de variação eritrocitária (CVE).

## 7 – EQUILÍBRIO OXIDATIVO

Como já foi referido anteriormente, além do soro foram analisados o fígado e os rins nos quatro grupos em estudo.

Para serem analisados, realizou-se um protocolo de homogeneização dos tecidos que consiste em:

- Pesar 0,2 g de tecido e colocar num tubo de polipropileno que contém 2 mL de tampão fosfato (gelado) com um pH de 7,4 (5% peso/volume).
- Adicionar 10µL de uma solução de butil hidroxitolueno (BHT) em acetonitrilo.
- Proceder à homogeneização num aparelho adequado (Heidolph digital (RZR) 2000).
- Submeter os homogeneizados a uma centrifugação a 10000 rpm, durante 10 minutos e a 4°C.
- Transferir o sobrenadante resultante para novos *ependorfs*, e sonicar durante 3 minutos.
- Centrifugar novamente a 4000 rpm, durante 15 minutos à mesma temperatura.
- Retirar o sobrenadante resultante para um *ependorf* devidamente marcado e congelar à temperatura de -80°C, para posterior quantificação.

### 7.1 – Doseamento de TBARS (*Tiobarbituric Acid Reactive substances*)

O método utilizado para quantificar a peroxidação lipídica foi o método TBARS.

Para quantificar as concentrações de MDA nas amostras de tecido e de soro foi necessária a realização, em duplicado, de uma recta de calibração. A partir de uma solução comercial de malondialdeído bis (dimetilacetal), fez-se uma solução-mãe com uma concentração de 83,5  $\mu\text{mol/L}$ . Da solução-mãe, prepararam-se as soluções-padrão com concentrações de 0,1; 0,21; 0,42; 0,83; 1,67; 2,5; 4,17; 8,3; 16,7  $\mu\text{mol/L}$  que, juntamente com o branco, se obtém uma recta de calibração.

Para analisar as amostras em si, colocaram-se em tubos de polipropileno de 10 mL de capacidade, 100  $\mu\text{L}$  de amostra, ou água destilada (se se tratar do branco) ou de solução-padrão (no caso das amostras-padrão). A cada tubo adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de antioxidante BHT dissolvido em etanol, 100  $\mu\text{L}$  de catalizador tricloreto de ferro hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) dissolvido em água destilada, 1,5 mL de solução-tampão de HCl-glicina (pH = 3,5) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). Este último reagente funciona como cromogéneo. Seguidamente, colocaram-se os tubos no escuro durante 60 minutos, a uma temperatura de 5°C. Findos os 60 minutos, retiraram-se os tubos do escuro e submeteram-se a um banho-maria, a 95-100°C durante 1 hora, e taparam-se com esferas de vidro. Posteriormente, e depois de se arrefecerem os tubos num banho de gelo, procedeu-se à extracção com 2,5 mL de uma solução de n-butanol:piridina:água (15 : 1 : 0,5) (v : v : v).

De seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos e, no final, retiraram-se 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante resultante para um poço da placa de reacção de poliestireno (COSTAR®, 96 well EIA/RIA plate). Finalmente, a placa é colocada num espectrofotómetro (BIOTEK®, Synergy HT, ligado a um computador Fujitsu-Siemens) para ser efectuada a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 532 nm.

### 7.2 – Doseamento da capacidade antioxidante total (TAS)

Para além da quantificação de MDA nos tecidos e no soro, foi ainda medida a capacidade antioxidante total (TAS), isto é, a capacidade sérica do organismo em responder à formação de radicais livres.

O doseamento da capacidade antioxidante total segue um procedimento experimental específico. Inicialmente são preparadas as soluções necessárias como o tampão acetato (pH =

3,6), HCl (40 mM), TPTZ a 10 mM,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (20 mM), Trolox (1750  $\mu\text{M}$ ) e reagente FRAP, composto por tampão acetato, TPTZ e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .

Tal como no método de quantificação do MDA, também na quantificação de TAS no soro é necessária a construção, em duplicado, de uma recta de calibração. Da solução comercial de Trolox, preparou-se uma solução-mãe com uma concentração de 1750  $\mu\text{M}$ , a partir da qual se prepararam os padrões com concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500  $\mu\text{M}$  usadas para, juntamente com o branco (composto por água destilada e reagente FRAP), se obter a recta de calibração.

Em cada poço da placa de reacção (COSTAR®, 96 well EIA/RIA plate) foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de soro, bem como de cada padrão e branco utilizados para a recta de calibração, 300  $\mu\text{L}$  de FRAP e 30  $\mu\text{L}$  de água destilada.

Por último, a placa foi incubada a 37°C e durante 15 minutos no espectrofotómetro (BIOTEK®, Synergy HT, ligado a um computador Fujitsu-Siemens), onde, no final desse tempo, foram lidas as absorvâncias em cada poço, a um comprimento de onda de 593 nm.

## **8 – ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DA BEXIGA**

Para o seu estudo histomorfológico, a bexiga passa previamente por três procedimentos diferentes, começando primeiro pelo processamento das amostras, passando pela obtenção das secções e, por último, a realização de técnicas específicas de histologia.

De seguida serão retratados os passos de cada um destes processos.

### **8.1 – Processamento das amostras para histopatologia**

Todas as amostras seguiram o seguinte protocolo:

1. Fixação em formol tamponado a 10%, até 24 horas;
2. Transferência dos tecidos para cassetes histológicas;
3. Inclusão em parafina segundo as seguintes normas:
  - i) Formol tamponado a 10% (I), durante 120 minutos;
  - ii) Formol tamponado a 10% (II), durante 120 minutos;
  - iii) Álcool etílico a 80%, durante 90 minutos;
  - iv) Álcool etílico a 96% (I), durante 90 minutos;
  - v) Álcool etílico a 96% (II), durante 90 minutos;
  - vi) Álcool etílico a 100% (I), durante 90 minutos;

- vii) Álcool etílico a 100% (II), durante 90 minutos;
- viii) Xilol (I), durante 90 segundos;
- ix) Xilol (II), durante 90 segundos;
- x) Xilol (III), durante 90 segundos;
- xi) Paraplast (I), durante 105 minutos;
- xii) Paraplast (II), durante 105 minutos;

O meio de inclusão usado – Paraplast – apresentava um ponto de fusão entre os 55 e os 57°C. A inclusão foi realizada de forma automática numa mesa de inclusão de tecidos (Shandon, Histocentre 2). Os blocos de parafina foram efectuados nessa bancada de inclusão (Anderson e Gordon, 1996).

## **8.2 – Obtenção das secções**

Os blocos de parafina (Paraplast) foram cortados num micrótopo rotativo, (tipo Minot, Leica, Modelo RM 2135) onde se aplicaram lâminas descartáveis R35 e S35 (Feather).

Cada bloco de tecido vesical foi seccionado no sentido do comprimento do órgão, obtendo-se secções seriadas de 4 µm para aplicação das diferentes técnicas. De seguida, os cortes foram colocados em banho-maria a 37°C, com o objectivo de serem estendidos e recolhidos sobre lâminas de vidro desengorduradas e previamente revestidos com substâncias adesivas:

- a. Albumina glicerinada de Mayer – adesivo utilizado nas preparações para processamento de rotina, coradas com hematoxilina-eosina.
- b. Poli-L-lisina – adesivo utilizado nas preparações para imunohistiquímica.

No final, as preparações foram colocadas numa estufa a 37°C durante cerca de 12 horas.

## **8.3 – Técnicas histológicas**

A técnica de coloração utilizada neste estudo foi a de Hematoxilina-Eosina (H&E). É de salientar que a aplicação de corante foi precedida da desparafinação com xilol, seguida de hidratação (com álcool a 100%, álcool a 96% e água, sucessivamente).

A aplicação de soluções corantes foi precedida da desparafinação com xilol, seguida de hidratação (com álcool a 100%, álcool a 96% e água, sucessivamente) dos cortes histológicos. Depois de processadas as diversas colorações, deu-se lugar ao processo inverso da hidratação (com água, álcool a 96% e álcool a 100%, sucessivamente).

### **8.3.1 – Hematoxilina-Eosina**

Este tipo de coloração tem o objectivo de avaliar as características básicas e estruturais da bexiga. Na coloração H&E, e como o próprio nome indica, a Hematoxilina de Harris é usada como solução corante nuclear (coloração azul do núcleo) e a eosina aquosa é usada como corante do citoplasma, dando-lhe uma coloração rosa (Stevens e Wilson, 1996).

Esta técnica de coloração consiste nos seguintes passos:

- I. Desparafinar em xilol, durante 10 minutos, duas vezes;
- II. Hidratar em álcoois de graduação decrescente, durante 5 minutos cada;
- III. Lavar em água corrente, durante 10 minutos;
- IV. Mergulhar em hematoxilina de Harris, durante 2 minutos;
- V. Lavar em água corrente, durante 10 minutos;
- VI. Mergulhar em eosina a 1%, durante 1 minuto;
- VII. Desidratar em álcoois de graduação decrescente, durante 5 minutos cada;
- VIII. Clarificar em xilol, duas vezes, durante 5 minutos cada;
- IX. Montar os cortes histológicos com Entellan.

Para a observação microscópica das lâminas com os cortes das bexigas, foi usado um sistema automático de análise de imagem (Nikon Eclipse 80i Fluo) com câmara digital (D x M1200 F).

Os carcinomas, que se desenvolveram em algumas bexigas dos animais do estudo, foram classificados segundo o número, tamanho e morfologia/forma.

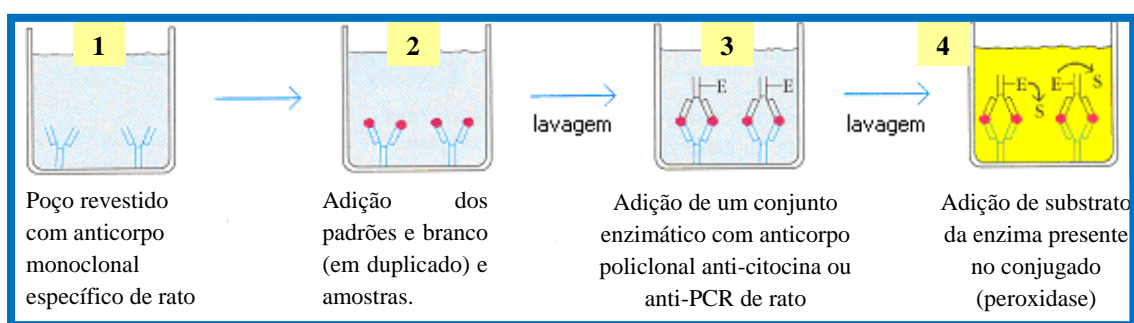
## **9 – ESTUDO DE MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO, CARCINOGENESE E INFLAMAÇÃO**

Foi realizada a avaliação de alguns marcadores de proliferação, carcinogénese e inflamação, determinando as concentrações séricas do factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), das interleucinas 1 e 6 (IL-1 $\beta$  e IL-6, respectivamente), do factor de transformação e do crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) através de métodos micro ELISA, recorrendo a *kits*

comerciais (R&D systems, Minneapolis, USA). A quantificação da proteína C reactiva (PCR) foi obtida através do método micro ELISA (Eleca Biosystems, Inc. Fullerton, California, USA).

### 9.1 – Fundamento geral do método micro ELISA em “Sandwich”

Uma vez que a técnica quantitativa micro ELISA (sigla de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é utilizada para analisar os parâmetros acima referidos, torna-se importante explicar o seu fundamento, de forma generalizada. Na Figura 23 está representada esquematicamente a referida técnica.



**Figura 23** – Representação esquemática da técnica de ELISA em “Sandwich”.

Um anticorpo monoclonal específico de rato e específico para cada um dos parâmetros a quantificar encontra-se adsorvido no fundo de cada poço da microplaca (Figura 23.1). De seguida, pipetam-se os padrões, os controlos e as amostras para cada poço (Figura 23.2). Nesta fase, o parâmetro que se quer quantificar liga-se ao anticorpo que se encontra imobilizado nos poços que constituem a placa.

Após lavagem dos poços para remover os resíduos (partes que não se ligaram ao anticorpo), adiciona-se um conjunto enzimático (conjugado de peroxidase) que contém um anticorpo policlonal anti-citocina, ou anti-TGF  $\beta$ , ou anti-PCR de rato (Figura 23.3). Depois deste passo, realiza-se nova lavagem para remover o excesso de conjugado e depois é adicionada uma solução que contém um substrato da enzima presente no conjugado (Figura 23.4).

A reacção enzimática forma um produto azul que passa a amarelo quando a solução que pára a reacção (HCl) é adicionada aos poços. A intensidade da cor medida a 450 nm de comprimento de onda num leitor de microplacas (LP400, Diagnostics Pasteur) é proporcional à quantidade do parâmetro a dosear presente nas amostras.

Os valores das citocinas e da PCR presentes nas amostras são lidos a partir de uma curva de calibração elaborada para esse efeito.

## **10– TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS**

Os resultados foram expressos sob a forma de média aritmética complementada com o intervalo de variação de valores (erro-padrão da média – e.p.m). A identificação e avaliação de diferenças entre os diferentes grupos foram avaliadas, recorrendo à análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida do teste Bonferroni através de *software* específico (GrahPad Prism 5, Software Inc.).

Os níveis de probabilidade inferiores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.



# RESULTADOS



Concluídas as 20 semanas de tratamento, procedeu-se ao sacrifício dos animais, colheita de sangue e recolha de órgãos, nomeadamente, a bexiga, os rins, o fígado e o coração, para posterior análise.

Ao longo deste capítulo, serão descritos os resultados obtidos no tempo final do estudo relativos aos parâmetros gerais e metabólicos, avaliação do trofismo renal, hepático e cardíaco e estudo histomorfológico da bexiga. Os pesos corporais dos animais e a quantidade de bebida ingerida foram registados semanalmente, ao longo da experiência, e a pressão arterial foi aferida nos tempos inicial (Semana 0), intermédio (semana 8) e final (semana 18).

Uma vez que existem 7 grupos em estudo, os resultados seguem três vertentes diferentes de análise. Uma primeira análise incide sobre a capacidade do BBN, *per se*, em induzir tumores da bexiga e resulta da comparação do grupo BBN com o grupo Controlo. Adicionalmente, compararam-se os resultados dos grupos EST (30 mg) e CEL (10 mg) relativamente ao grupo Controlo, com o objectivo de avaliar os efeitos da administração isolada de atorvastatina e de celecoxibe, respectivamente.

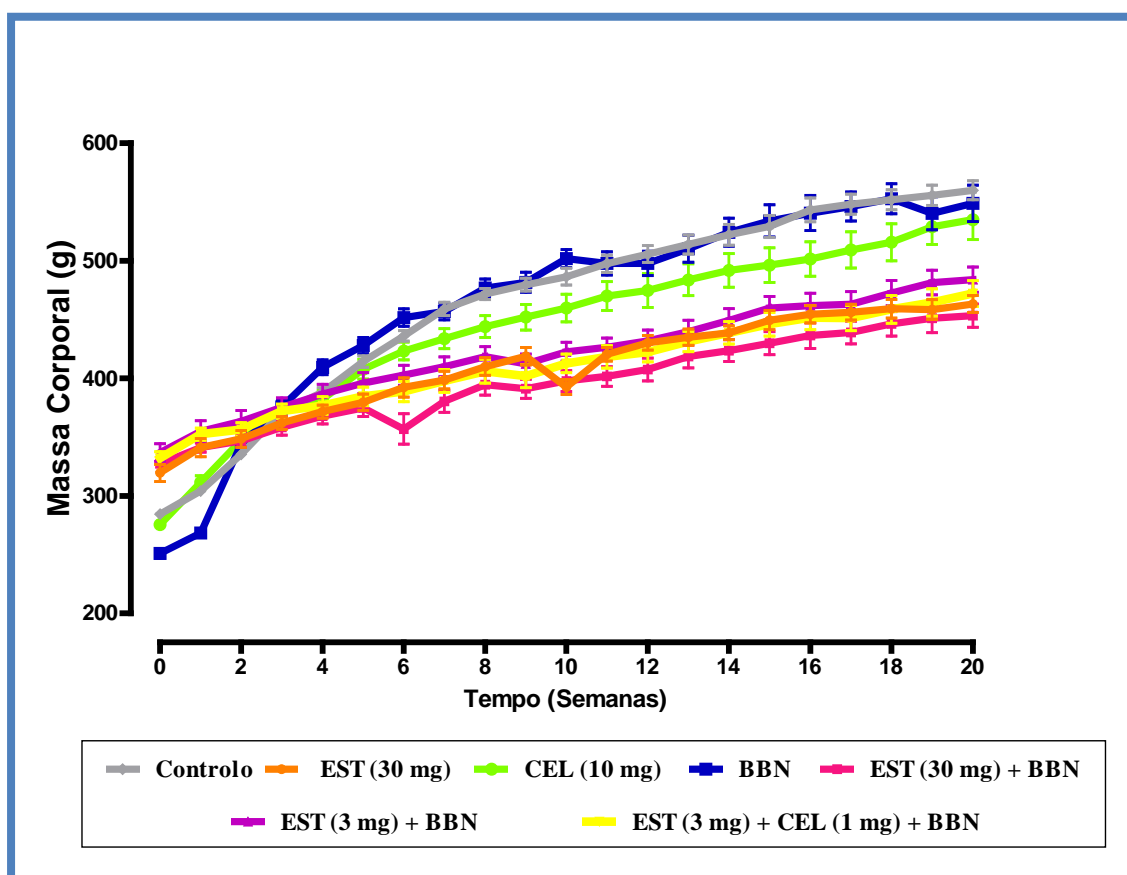
A segunda apreciação recai sobre as comparações dos grupos de dose elevada e de baixa dose do fármaco (EST – 30 mg + BBN e EST – 3 mg + BBN) com o grupo BBN e visa avaliar os possíveis efeitos da atorvastatina no tratamento preventivo do carcinoma da bexiga.

A terceira e última análise compara o grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN com o grupo de atorvastatina de baixa dose (EST – 3 mg + BBN) e com o grupo BBN para verificar se a administração conjunta de atorvastatina e de celecoxibe potencia mais o efeito preventivo do tumor da bexiga do que se forem administrados isoladamente.

## **1 – AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL E DA BEBIDA INGERIDA**

### **1.1 – Registo da massa corporal**

Os animais foram pesados semanalmente durante as 20 semanas de estudo. Na Figura 24, estão representadas as variações das massas corporais registadas ao longo do estudo.



**Figura 24** – Variação da massa corporal dos animais dos diferentes grupos em experiência, ao longo de 20 semanas.

Os resultados representam as médias (em gramas)  $\pm$  erro-padrão da média (e.p.m).

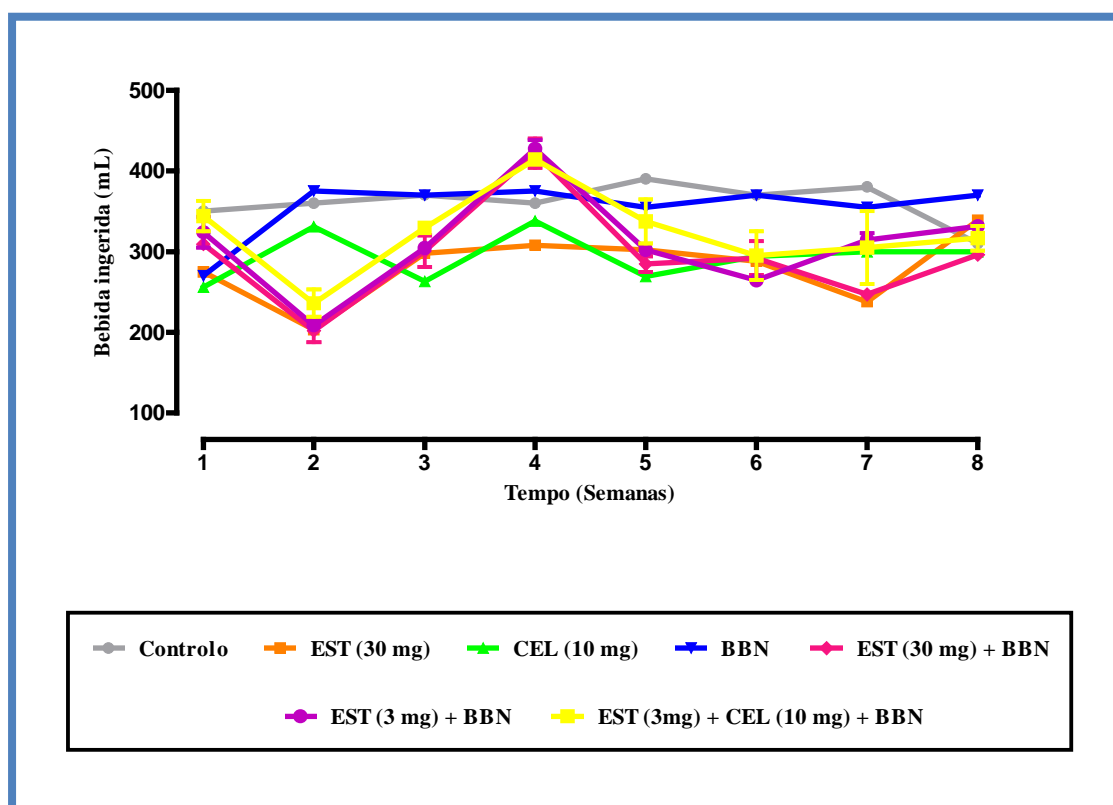
Olhando numa perspectiva global para o gráfico representativo das massas corporais dos animais, verifica-se que já no início do estudo os diversos grupos apresentavam valores distintos das massas corporais. Os grupos de animais administrados com atorvastatina iniciaram o tratamento com valores das massas corporais superiores aos dos grupos Controlo, BBN e CEL (10 mg), mas a partir da semana 3 a situação inverte-se e permanece até ao tempo final, exibindo os grupos Controlo, BBN e CEL (10 mg) valores superiores aos restantes grupos.

A evolução das massas corporais dos animais correspondentes aos grupos EST (30 mg), EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN permaneceu regular ao longo do estudo, enquanto os grupo Controlo, BBN e CEL (10 mg) assumiram um crescimento muito acentuado a partir da semana 1 e até sensivelmente à semana 8, altura a partir da qual o crescimento semanal em todos os grupos foi similar. Estas evidências denunciam a possível interferência da administração de atorvastatina (nas 8 primeiras semanas) na manutenção das massas corporais dos animais pertencentes aos grupos aos quais este fármaco foi fornecido.

## 1.2 - Monitorização da quantidade de bebida ingerida

Uma vez que os animais dos grupos Controlo, EST (30 mg) e CEL (10 mg) ingeriram apenas água durante o tratamento e os animais dos restantes grupos beberam BBN (com a concentração de 0,05% diluído em água), durante as primeiras 8 semanas de tratamento, tornou-se crucial a monitorização da quantidade de bebida ingerida. Desta forma, é possível verificar as variações dos volumes ingeridos ao longo do procedimento experimental entre os grupos que ingeriram BBN ou somente água, bem como perceber se os grupos BBN, EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN beberam quantidades de BBN suficientes para que não interfira com o desenvolvimento/prevenção dos tumores.

Na Figura 25 está representada a monitorização da quantidade de bebida ingerida (BBN em água ou apenas água) nas primeiras 8 semanas de tratamento. Os volumes médios de água ingerida a partir das 12 semanas até ao final do estudo estão representados na Figura 26.



**Figura 25** – Monitorização da quantidade de bebida ingerida durante as primeiras 8 semanas. Os grupos Controlo, EST (30 mg) e CEL (10 mg) beberam apenas água e os restantes grupos ingeriram BBN (0,05% em água). Os resultados representam as médias (em mL)  $\pm$  e.p.m da bebida ingerida por cada rato.

No gráfico acima representado é visível a discrepância na quantidade de bebida ingerida entre os ratos dos diferentes grupos.

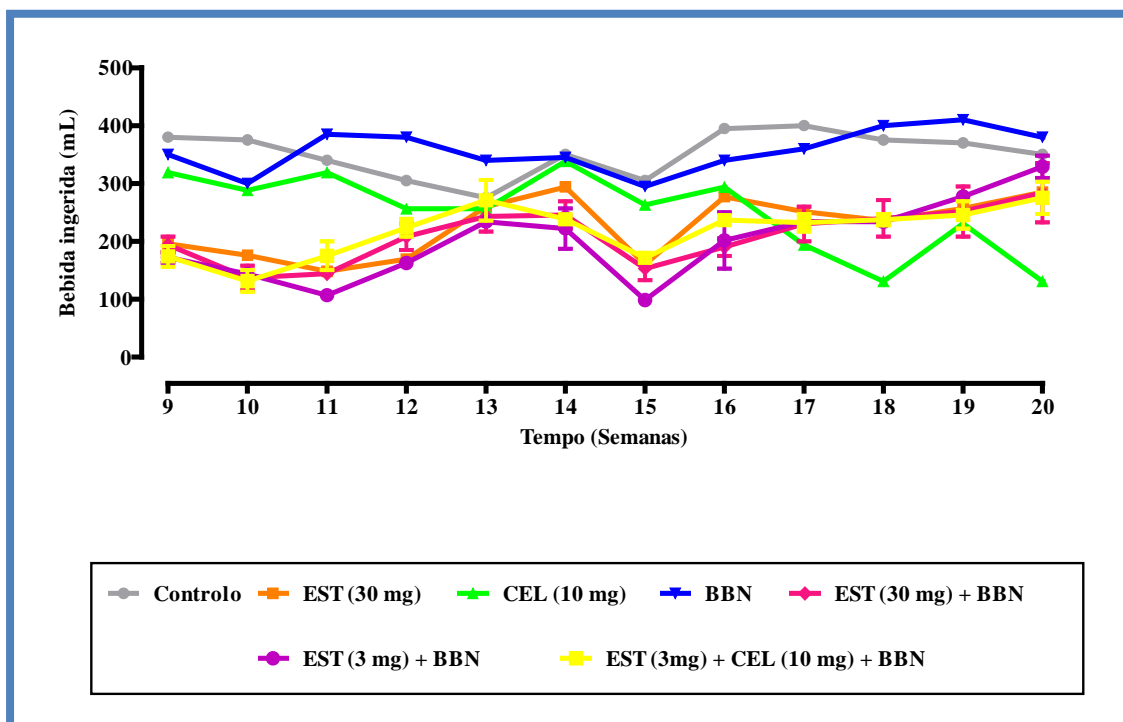
Na primeira semana do estudo, os animais dos grupos EST (30 mg), CEL (10 mg) e BBN beberam quantidades de bebida sensivelmente idênticas, no entanto inferiores em relação aos outros grupos. Os ratos do grupo Controlo e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN foram os que ingeriram quantidades superiores de bebida.

Durante a segunda semana, as quantidades de bebida ingerida pelos animais dos grupos administrados com atorvastatina sofreram uma diminuição severa, ao contrário dos restantes grupos, atingindo-se aqui os valores mais baixos de bebida ingerida durante as primeiras 8 semanas do estudo. Este facto parece poder ser explicado pela administração de atorvastatina, que numa fase inicial parece influenciar negativamente a ingestão líquida tanto de água apenas no caso do grupo EST (30 mg) como de BBN em água (nos restantes grupos). Contudo, da semana 2 à semana 4, a situação inverte-se, registando-se um aumento acentuado de bebida ingerida, sendo os valores mais elevados os dos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN.

A partir desta semana até à sexta, os ratos dos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN voltam a ingerir menores quantidades de bebida, mas não chegam a atingir os valores da semana 2. A partir daqui e até à oitava semana, os volumes ingeridos pelos ratos destes grupos tendem a aumentar, mas sem grandes variações.

Na última semana de administração de fármaco e de BBN, os volumes de bebida ingerida por parte dos animais dos grupos administrados com atorvastatina e do grupo Controlo são idênticos e um pouco inferiores aos do grupo BBN, que ingeriu maiores quantidades de bebida.

O grupo CEL (10 mg) assume grandes variações nos volumes ingeridos de água ao longo das 8 semanas, o que poderá ficar a dever-se exclusivamente à influência da administração deste fármaco. É também de realçar que o grupo BBN e o grupo Controlo apresentam um comportamento semelhante ao longo da primeira fase de tratamento (8 primeiras semanas).



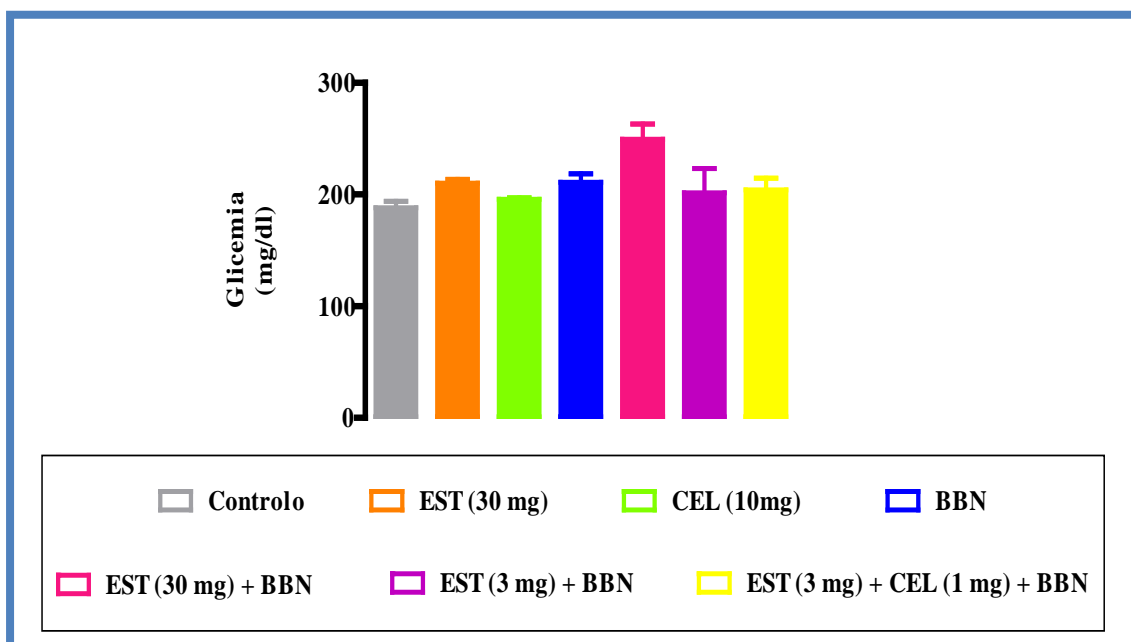
**Figura 26** – Monitorização da quantidade de água ingerida desde as 12 semanas até ao final do estudo (20 semanas). Os resultados representam as médias (em mL)  $\pm$  e.p.m da água ingerida por cada rato.

A partir da oitava semana de tratamento foi interrompida a administração de fármacos e de BBN e todos os grupos passaram a ingerir apenas água. A partir deste momento, os grupos EST (30 mg), EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN passaram a beber quantidades de água muito inferiores em relação aos outros grupos, até à semana 16, a partir da qual os volumes se aproximaram dos dos restantes grupos (Figura 26).

Relativamente ao grupo BBN e ao grupo CEL (10 mg), verificou-se que apresentam um consumo semelhante ao do grupo Controlo, apesar da quantidade de bebida ingerida pelos ratos do grupo CEL (10 mg) ter diminuído a partir da semana 16.

## 2 – GLICEMIA

Foi quantificada a glicemia de todos os animais no final do tratamento, sendo as médias das concentrações obtidas nos diferentes grupos experimentais apresentadas na Figura 27.



**Figura 27** – Concentração sérica de glicose nos 7 grupos em estudo. Os resultados são referentes às médias  $\pm$  e. p. m.

De acordo com o gráfico das concentrações de glicose, não se verificaram variações significativas deste parâmetro, embora se constate uma ligeira tendência para um aumento nos grupos EST (30 mg) e BBN em relação ao grupo Controlo e do grupo EST (30 mg) + BBN em comparação com o grupo BBN sem que qualquer daquelas diferenças tenha atingido significado estatístico (Figura 27).

### 3 – PRESSÃO ARTERIAL E FUNÇÃO CARDÍACA

#### 3.1 – Pressões arteriais e frequência cardíaca

Foram avaliadas a pressão arterial e a frequência cardíaca ao longo do estudo, com o objectivo de verificar se o BBN e a atorvastatina nutriam algum efeito a nível cardiovascular.

A Figura 28 ilustra a pressão arterial e a frequência cardíaca medidas ao longo do estudo, especificamente nos tempos inicial (Semana 0), intermédio (Semana 8) e final (Semana 18/20).

No tempo inicial do estudo (semana 0), foram escolhidos aleatoriamente ratos de cada grupo para aferir as suas pressões arteriais e frequências cardíacas. Como ao tempo de estudo referido ainda não tinha sido administrado nenhum dos fármacos, nem o BBN, as pressões arteriais e frequências cardíacas foram calculadas num grupo formado por selecção aleatória de ratos de todos os grupos, assumido como o ponto de partida para todos eles.

Analisando a pressão arterial sistólica (PAS) (Figura 28A), constata-se que os grupos CEL (10 mg) e BBN apresentam valores muito semelhantes ao longo do estudo, assim como o grupo EST (30 mg) + BBN e o grupo EST (3 mg) + BBN.

Nas três semanas escolhidas para a realização das medições, o grupo CEL (10 mg) e o grupo BBN apresentaram resultados muito superiores em relação aos grupos restantes. Da semana 0 para a semana 8, estes dois grupos viram um aumento acentuado da pressão arterial sistólica, embora no tempo final esta tenha mantido os valores obtidos na semana intermédia.

O grupo EST (30 mg) + BBN e o grupo EST (3 mg) + BBN assumem variações idênticas aos grupos CEL (10 mg) e BBN, apesar de apresentarem valores inferiores. No grupo EST (30 mg), a PAS diminui da semana inicial até à semana 8, e a partir desta e até à semana 18 aumenta bruscamente. Esta evidência pode ser explicada pelo facto de na semana 8 ter terminado a administração de atorvastatina, comprovando a sua eficácia na redução da pressão arterial e, conseqüentemente, a sua repercussão na diminuição do risco cardiovascular.

No grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN a pressão arterial sistólica aumenta ligeiramente de forma linear ao longo do estudo, atingindo, na semana 18, valores idênticos aos dos grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN. Nestes 3 grupos foi evidente o efeito negativo do BBN sobre a acção da atorvastatina e, por isso, não se verificaram diminuições das PAS.

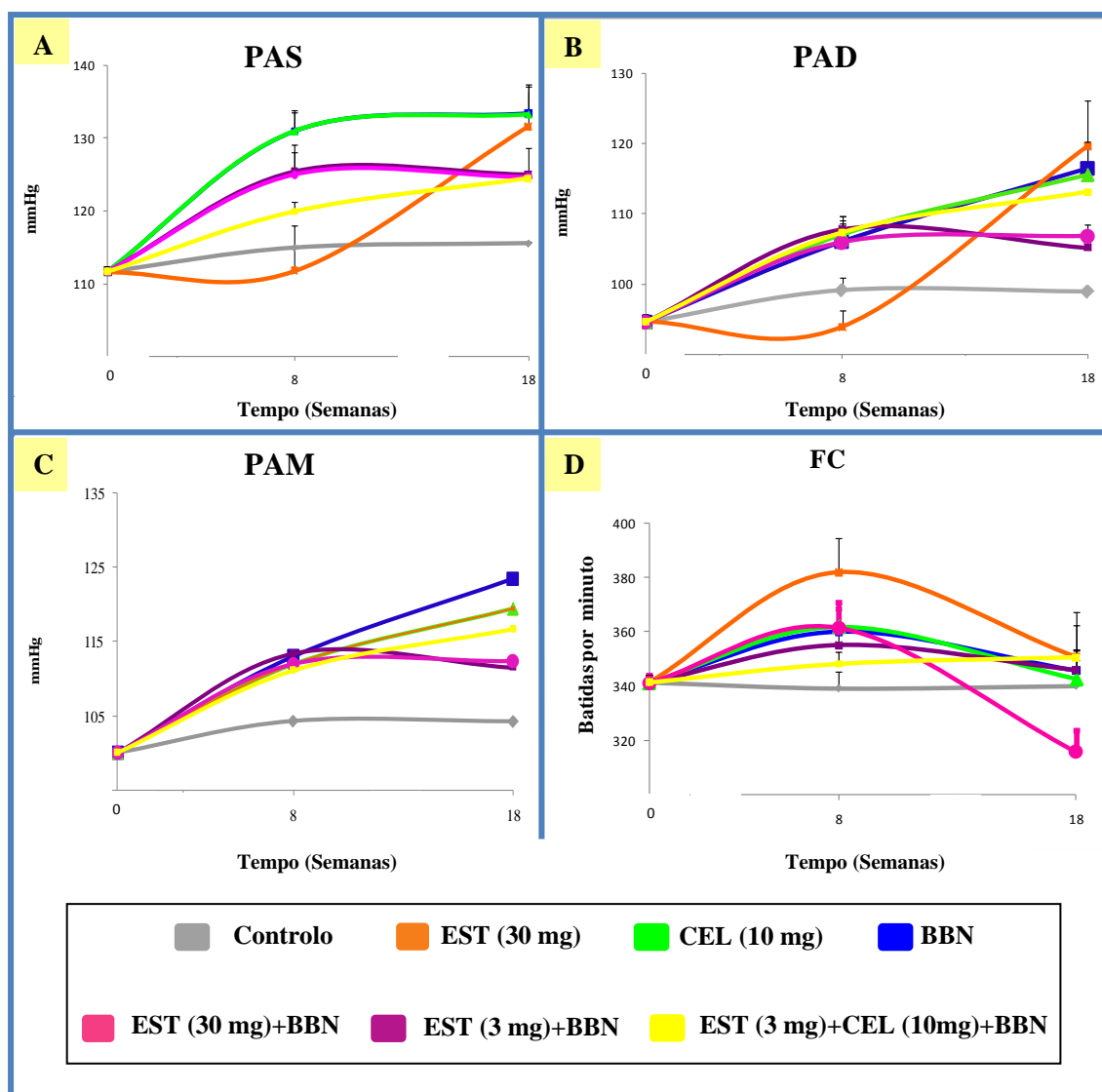
O grupo Controlo não exibiu grandes variações da PAS ao longo do estudo.

Relativamente à pressão arterial diastólica (PAD), representada na Figura 28B, o grupo Controlo e o grupo EST (30 mg) mostraram resultados idênticos aos da PAS dos mesmos.

No início do estudo e ao tempo intermédio, as pressões arteriais diastólicas nos restantes grupos comportaram-se de forma semelhante, exibindo valores ligeiramente superiores aos do grupo Controlo e do grupo EST (30 mg). Contudo, da semana 8 para a semana 18, os grupos preventivos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN passaram a exhibir valores diferentes dos grupos BBN, CEL (10 mg) e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, mantendo no tempo final os valores alcançados à oitava semana.

Na semana 18, o grupo EST (30 mg) foi o grupo que registou valores superiores em relação aos outros grupos e também sofreu um aumento mais acentuado da pressão arterial diastólica.

Os resultados correspondentes à pressão arterial média (PAM) (Figura 28C), que se obtém a partir da PAS e PAD, evoluíram de forma idêntica aos resultados da PAD em todos os grupos, com pequenas variações, especialmente nos grupos EST (30 mg) e BBN.



**Figura 28** – Valores médios das pressões arteriais sistólica (A), diastólica (B) e média (C) e da frequência cardíaca (D) nos grupos em estudo. Os resultados apresentados representam as médias  $\pm$  e. p. m.

Observando a frequência cardíaca na Figura 28D, constatou-se um aumento da semana 0 para a semana 8, atingindo aqui os valores máximos do estudo em todos os grupos, excepto no grupo Controlo e no grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN.

Do tempo intermédio para o tempo final, a frequência cardíaca diminuiu, atingindo praticamente os valores obtidos no tempo inicial em todos os grupos, menos no grupo EST (30 mg) + BBN, que sofreu uma maior redução das medições no tempo final.

O grupo Controlo não sofreu grandes variações, registando-se no grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN um aumento linear nas 3 semanas em que se efectuaram as medições.

### 3.2 – Indicadores de trofismo cardíaco

Depois da pesagem do coração, foi separado o ventrículo esquerdo para avaliar a sua massa, para que, juntamente com o coração, se calculassem as razões massa cardíaca/massa corporal, massa ventricular/massa corporal e massa ventricular/massa cardíaca a fim de analisar o trofismo cardíaco e ventricular esquerdo dos animais em todos os grupos do estudo.

**Tabela 3** – Indicadores de trofismo cardíaco.

Parâmetros indicadores de trofismo cardíaco					
Grupos	Massa cardíaca (g)	Massa ventr. esquerda (g)	M. card. / M. corporal ( $\times 10^{-3}$ )	Massa ventr. / M. corporal ( $\times 10^{-3}$ )	Massa ventr. / Massa cardíaca (g)
<b>Controlo</b>	1,319 $\pm$ 0,032	0,717 $\pm$ 0,036	2,388 $\pm$ 0,032	1,297 $\pm$ 0,075	0,537 $\pm$ 0,049
<b>EST (30 mg)</b>	1,230 $\pm$ 0,033	0,487 $\pm$ 0,025 <sup>aaa</sup>	2,658 $\pm$ 0,093	1,051 $\pm$ 0,046 <sup>aa</sup>	0,398 $\pm$ 0,028 <sup>aa</sup>
<b>CEL (10 mg)</b>	1,220 $\pm$ 0,042	0,526 $\pm$ 0,028 <sup>aaa</sup>	2,168 $\pm$ 0,071	0,981 $\pm$ 0,034 <sup>aaa</sup>	0,434 $\pm$ 0,034
<b>BBN</b>	1,441 $\pm$ 0,041	0,767 $\pm$ 0,028	2,571 $\pm$ 0,061	1,294 $\pm$ 0,060	0,533 $\pm$ 0,013
<b>EST(30mg)+BBN</b>	1,279 $\pm$ 0,057 <sup>b</sup>	0,561 $\pm$ 0,030 <sup>aaa</sup>	2,725 $\pm$ 0,094	1,201 $\pm$ 0,053	0,441 $\pm$ 0,016
<b>EST(3 mg)+BBN</b>	1,290 $\pm$ 0,035 <sup>b</sup>	0,543 $\pm$ 0,015 <sup>aaa</sup>	2,668 $\pm$ 0,058	1,134 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup>	0,419 $\pm$ 0,008 <sup>bb</sup>
<b>EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN</b>	1,202 $\pm$ 0,045 <sup>bb</sup>	0,570 $\pm$ 0,039 <sup>aaa</sup>	2,689 $\pm$ 0,15	1,265 $\pm$ 0,038	0,451 $\pm$ 0,027

Os resultados apresentados na tabela representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  são representados respectivamente por uma, duas ou três letras e são obtidos através da comparação dos diferentes grupos com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN.

Nos grupos EST (30 mg) e CEL (10 mg) verificou-se uma redução da massa cardíaca e do ventrículo esquerdo em relação ao grupo Controlo, sendo estatisticamente significativas as variações ao nível do ventrículo esquerdo (Tabela 3). Em relação ao grupo BBN a tendência foi a oposta, com valores superiores (ainda que não significativos) aos do grupo Controlo.

Nos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN verificou-se uma redução significativa da massa cardíaca relativamente ao grupo BBN ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente). Estas evidências estão de acordo com os valores das massas corporais no tempo final dos animais destes grupos, que também são inferiores em relação aos ratos dos outros grupos.

Os valores médios da massa do ventrículo esquerdo, apesar de serem estatisticamente inferiores naqueles 3 grupos vs. BBN, não são tão relevantes por si só, uma vez que dependem

da pessoa que efectua o corte do coração para obter o ventrículo esquerdo, estando, por isso, sujeitos ao erro inerente ao corte.

Analisando a razão das massas cardíaca sobre a corporal, não se verificam grandes alterações, apesar de se registar um aumento não significativo no grupo EST (30 mg) em relação ao grupo Controlo, no grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN comparativamente ao grupo preventivo de dose baixa de atorvastatina (EST (3 mg) + BBN) e de todos os grupos preventivos vs. grupo BBN. Contrariamente aos grupos restantes, o grupo CEL (10 mg) apresenta valores inferiores quando comparados com o grupo Controlo.

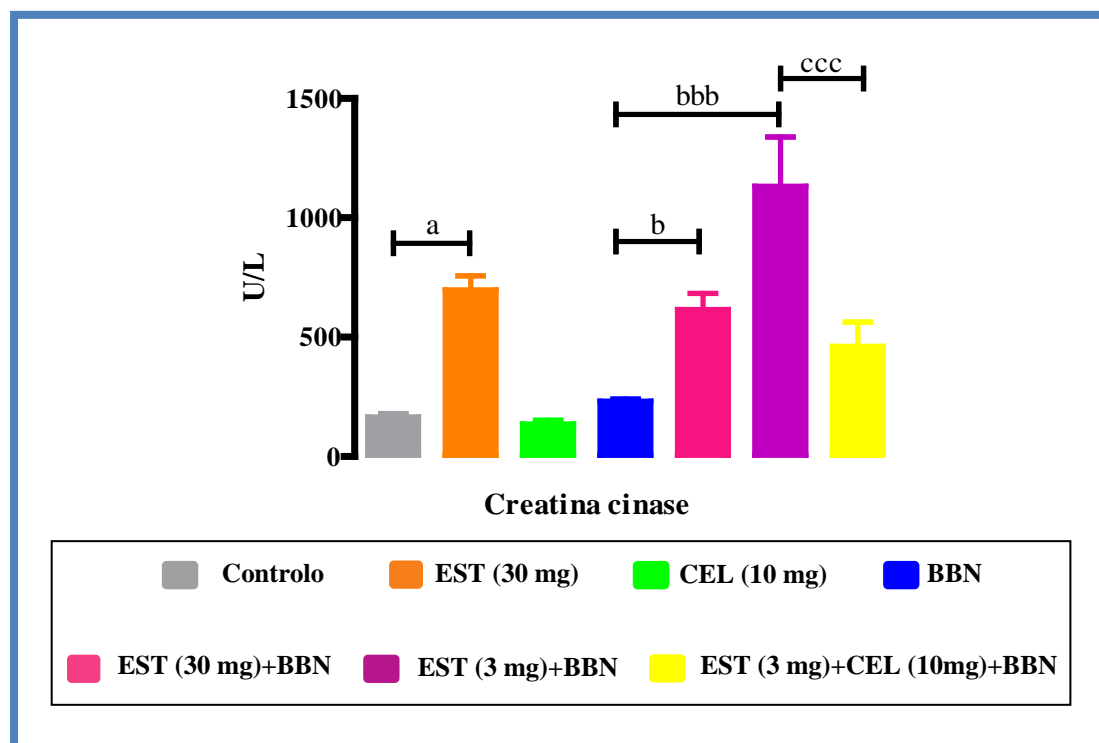
Nos restantes parâmetros de trofismo cardíaco, registam-se diminuições bastante significativas nos grupos EST (30 mg) e CEL (10 mg) em relação ao grupo Controlo ( $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente) e no grupo EST (3 mg) + BBN em comparação com o grupo BBN ( $P < 0,05$ ) na razão da massa ventricular/massa corporal e uma diminuição muito significativa nos grupos EST (30 mg) relativamente ao grupo Controlo e EST (3 mg) + BBN em relação ao grupo BBN na razão da massa ventricular/massa cardíaca.

### **3.3 – Actividade enzimática da creatina cinase (CK)**

Uma vez que a administração de estatinas pode provocar alterações nas concentrações séricas de CK, tornou-se importante o seu doseamento e cujos resultados se encontram representados na Figura 29.

Como se pode verificar nos resultados representados, no grupo CEL (10 mg) e no grupo BBN não se observaram grandes variações relativamente ao grupo Controlo, enquanto que o grupo EST (30 mg) já apresentou valores significativamente elevados ( $P < 0,05$  vs. Controlo). Os grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN assumem o mesmo comportamento em comparação com o grupo BBN ( $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ , respectivamente).

No grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN registou-se um aumento apenas tendencial da CK em relação ao grupo BBN, no entanto, verificou-se uma redução significativa ( $P < 0,001$ ) por comparação com o grupo EST (3 mg) + BBN, o que significa que a presença de celecoxibe impediu, de alguma forma, o aumento dos níveis de CK no soro dos animais deste grupo.



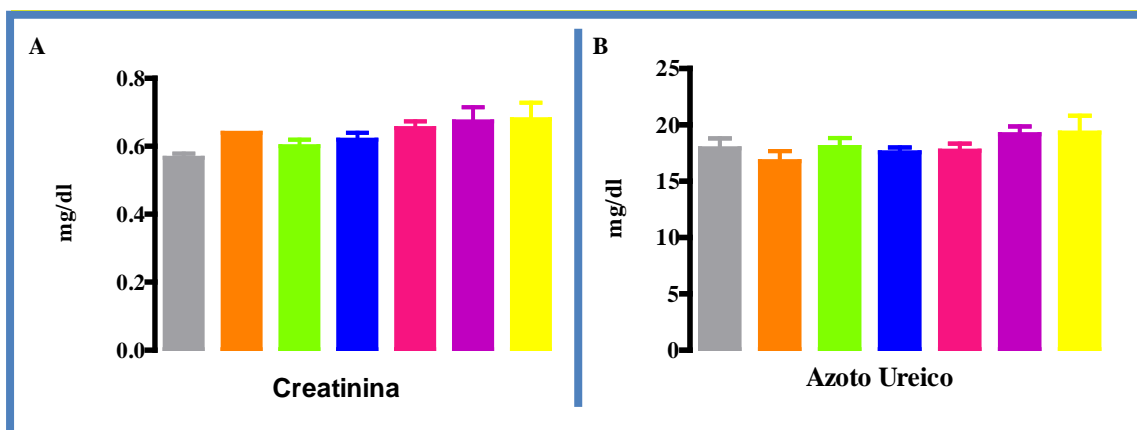
**Figura 29** – Concentração sérica de CK em todos os grupos em estudo. Os resultados apresentados representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$  e  $P < 0,001$  dos grupos em estudo, são representados por uma e três letras respectivamente, em comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3mg)+BBN.

## 4 – FUNÇÃO RENAL

A avaliação da função renal engloba estudos das alterações de alguns parâmetros bioquímicos no soro e também de alguns indicadores de trofismo dos rins.

### 4.1 – Parâmetros séricos

Com a finalidade de avaliar a existência de possíveis alterações na função renal, analisaram-se os resultados de alguns parâmetros séricos associados a esta função, tais como a creatinina e o azoto ureico, que estão expressos graficamente na Figura 30.



**Figura 30** – Resultados de alguns parâmetros séricos para avaliar a função renal: creatinina (A) e azoto ureico (B).

Estes resultados apresentados graficamente representam as médias  $\pm$  e.p.m.

Observando o gráfico relativo aos resultados de creatinina no soro (Figura 30A), constata-se que não existem grandes alterações deste parâmetro, embora se verifique um ligeiro aumento em todos os grupos do estudo: EST (30 mg), CEL (10 mg) e BBN vs. Controlo e restantes grupos vs. BBN.

Relativamente ao azoto ureico (Figura 30B), não se observam alterações em nenhum dos grupos, apesar de se verificar um aumento (ainda que não seja significativo) do grupo EST (3 mg) + BBN vs. BBN e do grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN em relação ao grupo BBN e ao grupo EST (3 mg) + BBN.

#### 4.2 – Indicadores de trofismo renal

Com o intuito de avaliar alterações da função renal, analisaram-se, além dos parâmetros séricos, indicadores de trofismo renal como a massa renal e a razão da massa renal sobre a massa corporal, como se pode verificar na Tabela 4.

Fazendo uma apreciação aos resultados, não se verificam grandes variações da massa renal em todos os grupos, apesar de haver uma redução tendencial do grupo EST (30 mg), CEL (10 mg) vs. Controlo, um aumento do grupo BBN vs. Controlo e uma redução dos restantes grupos vs. BBN.

**Tabela 4** – Parâmetros indicadores de trofismo renal.

Parâmetros indicadores de trofismo renal		
Grupos	Massa renal (g)	Massa renal / Massa Corporal ( $\times 10^{-3}$ )
Controlo	1,283 $\pm$ 0,048	2,428 $\pm$ 0,061
EST (30 mg)	1,177 $\pm$ 0,023	2,505 $\pm$ 0,071
CEL (10 mg)	1,196 $\pm$ 0,031	2,531 $\pm$ 0,136
BBN	1,323 $\pm$ 0,052	2,273 $\pm$ 0,050
EST(30mg)+BBN	1,212 $\pm$ 0,028	2,776 $\pm$ 0,048 <sup>bbb</sup>
EST(3 mg)+BBN	1,231 $\pm$ 0,055	2,545 $\pm$ 0,099
EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN	1,252 $\pm$ 0,030	2,660 $\pm$ 0,087 <sup>bb</sup>

Os valores apresentados na tabela são respectivos às médias  $\pm$  e.p.m. Os valores de significância  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  são representados respectivamente por duas ou três letras e são obtidos através da comparação dos diferentes grupos com <sup>b</sup> vs. BBN.

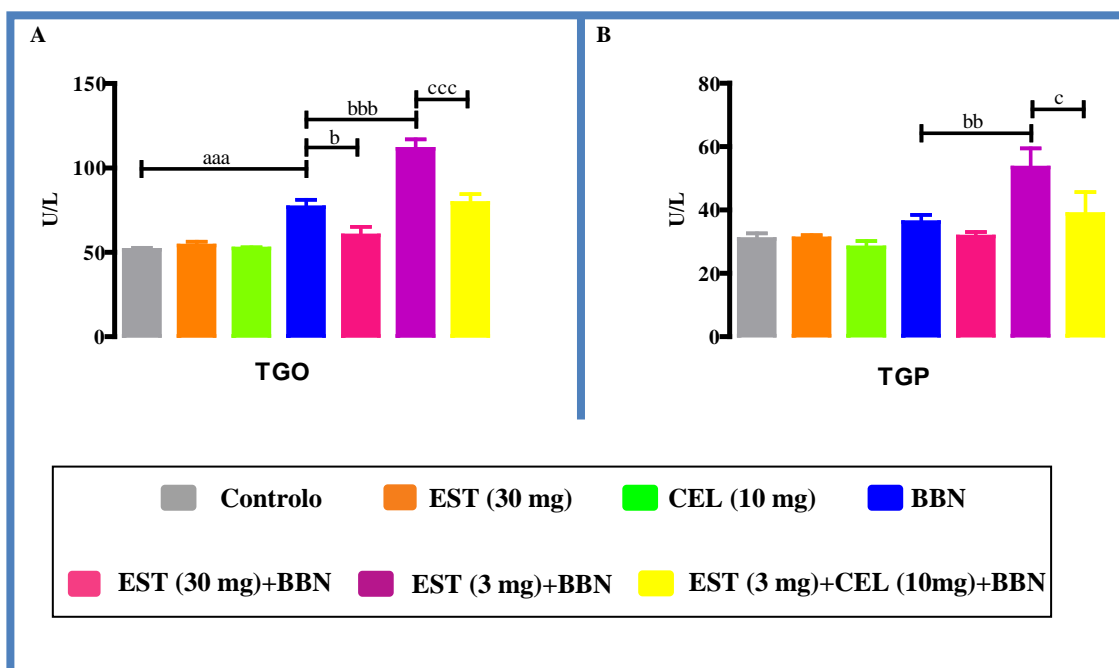
Já na análise da razão massa renal/massa corporal é possível verificar que os grupos preventivos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN apresentam um aumento acentuado estatisticamente significativo quando comparados com o grupo BBN ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ , respectivamente), que, por sua vez, parece apresentar uma atrofia renal, ainda que não significativa em termos estatísticos.

## 5 – FUNÇÃO HEPÁTICA

Para verificar prováveis alterações na função hepática, quantificaram-se alguns parâmetros séricos, como as TGP e as TGO, e avaliaram-se parâmetros indicadores de trofismo hepático.

### 5.1 – Parâmetros séricos

Na Figura 31 estão representados os valores séricos médios de duas enzimas hepáticas importantes no estudo da função hepática - a transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) e a transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).



**Figura 31** – Valores médios dos parâmetros bioquímicos séricos para apreciação da função hepática: TGO (A) e TGP (B). Os resultados representam médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  dos grupos em estudo, são representados por uma, duas e três letras, comparativamente a: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3mg)+BBN.

Em relação à TGO (Figura 31A), e fazendo uma análise geral dos resultados, verificam-se alterações significativas do ponto de vista estatístico em vários grupos. Assim, o grupo BBN apresenta um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) quando comparado com o grupo Controlo, e o mesmo acontece com o grupo EST (3 mg) + BBN, por comparação com o grupo BBN. O grupo EST (30 mg) + BBN exibe uma diminuição significativa relativamente ao grupo BBN ( $P < 0,05$ ) e o grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN apresenta uma diminuição evidente da concentração de TGO em relação ao grupo EST (3 mg) + BBN ( $P < 0,001$ ).

Quanto aos resultados da TGP (Figura 31B) e tal como na TGO, não há alterações nem no grupo EST (30 mg) nem no grupo CEL (10 mg) vs. Controlo. No grupo BBN esta enzima encontra-se um pouco aumentada, mas sem significado estatístico. Comparativamente ao grupo BBN, o grupo EST (30 mg) + BBN demonstra uma diminuição apenas tendencial ao contrário do grupo EST (3 mg) + BBN, onde é evidente um aumento muito significativo ( $P < 0,01$ ) de TGP no soro.

Finalmente, e por comparação com o grupo EST (3 mg) + BBN, observa-se uma diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) no grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN.

## 5.2 – Indicadores de trofismo hepático

Os resultados obtidos para cada grupo em relação aos parâmetros que permitem a análise do trofismo hepático estão evidenciados na tabela 5.

**Tabela 5** – Indicadores de trofismo hepático.

Parâmetros indicadores de trofismo hepático		
Grupos	Massa do fígado (g)	Massa do fígado / Massa Corporal ( $\times 10^{-3}$ )
Controlo	16,350 $\pm$ 0,743	30,120 $\pm$ 0,575
EST (30 mg)	12,770 $\pm$ 0,411 <sup>aaa</sup>	26,370 $\pm$ 0,673 <sup>a</sup>
CEL (10 mg)	13,670 $\pm$ 0,844 <sup>a</sup>	28,700 $\pm$ 0,775
BBN	18,710 $\pm$ 0,584 <sup>a</sup>	33,860 $\pm$ 0,998 <sup>aa</sup>
EST(30mg)+BBN	13,420 $\pm$ 0,348 <sup>bbb</sup>	29,630 $\pm$ 0,668 <sup>bbb</sup>
EST(3 mg)+BBN	14,880 $\pm$ 0,414 <sup>bbb</sup>	30,160 $\pm$ 0,664 <sup>bb</sup>
EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN	14,370 $\pm$ 0,527 <sup>bbb</sup>	29,730 $\pm$ 0,960 <sup>bb</sup>

Os resultados representam médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por uma, duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN.

Ao averiguar os resultados da massa hepática, observa-se uma diminuição bastante significativa ( $P < 0,001$ ) no grupo EST (30 mg) e no grupo CEL (10 mg) ( $P < 0,05$ ) face ao grupo Controlo. Ao contrário daqueles grupos, o grupo BBN apresenta um aumento muito significativo da massa hepática ( $P < 0,01$ ) (Tabela 5).

Nos restantes grupos, as massas do fígado sofreram variações bastante significativas ( $P < 0,001$ ), apresentando valores inferiores relativamente ao grupo BBN.

Na razão massa hepática sobre a massa corporal, os resultados assumem um comportamento idêntico aos resultados da massa hepática, no entanto a relevância estatística deste parâmetro nos diferentes grupos de estudo é diferente. Assim, no grupo EST (30 mg) verificou-se uma diminuição ( $P < 0,05$ ) e no grupo BBN um aumento ( $P < 0,01$ ) quando comparados com o grupo Controlo. Os grupos EST (3 mg) + BBN, EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN registaram uma redução significativa versus grupo BBN (Tabela 5).

Tendo em conta que os resultados apresentados são inferiores em todos os grupos excepto no grupo BBN e dado que a massa hepática é um indicador de trofismo hepático, estes dados sugerem alterações ao nível da função hepática provocadas pela acção dos fármacos administrados. Este facto é reforçado pelos resultados obtidos na razão das massas hepática sobre a corporal.

## **6 – PERFIL LIPÍDICO**

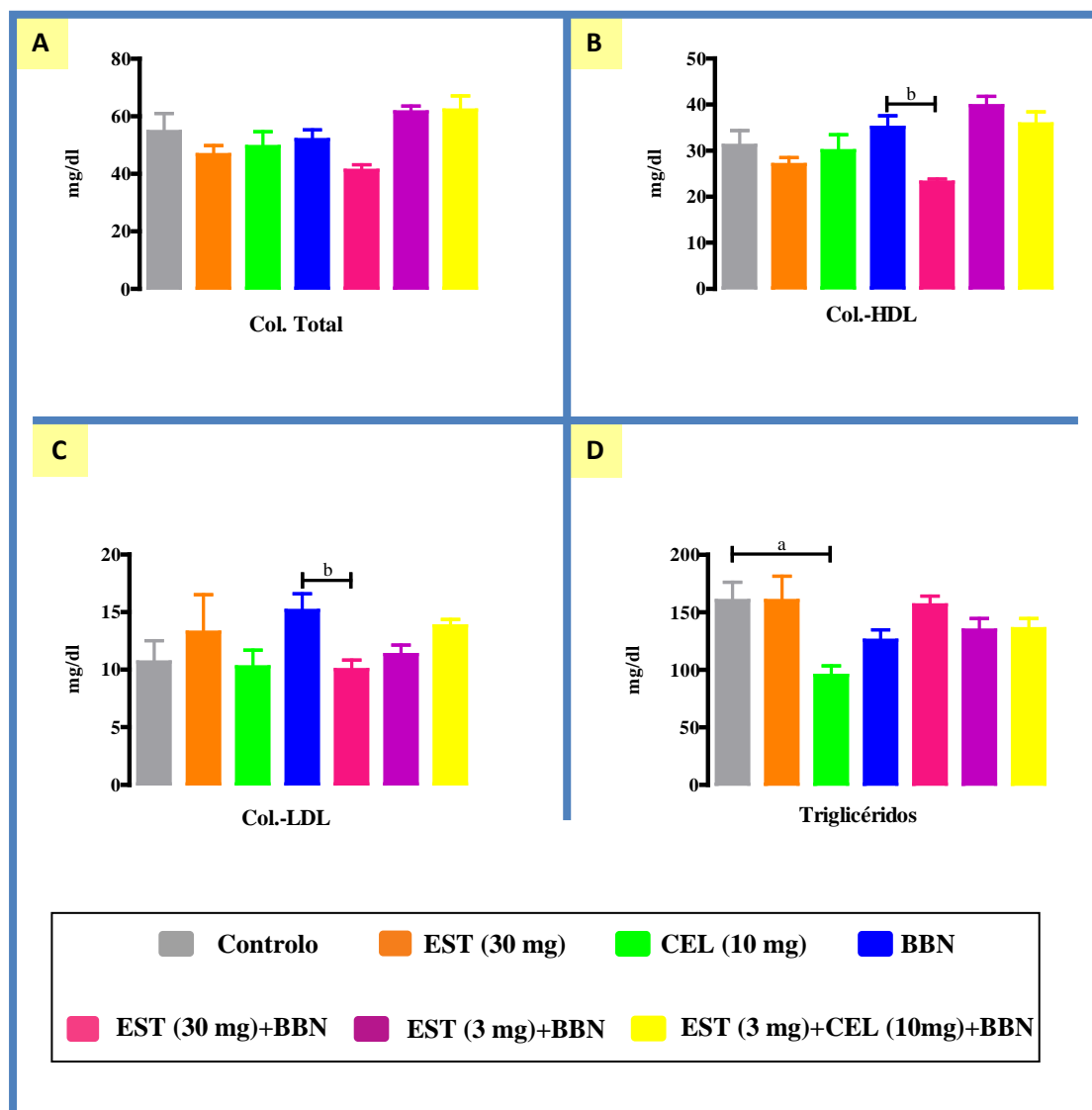
Como já foi mencionado anteriormente, a atorvastatina é uma substância química que pertence à classe das estatinas. Uma vez que as estatinas são utilizadas na regulação dos níveis de colesterol e triglicéridos no sangue, é impreterível o estudo de alguns parâmetros séricos relacionados com o perfil lipídico (Figura 32) bem como a análise de algumas razões entre os vários tipos de colesterol como indicadores de risco aterogénico (Tabela 6).

### **6.1 – Parâmetros séricos**

Não se verificam variações estatisticamente significativas de colesterol total em nenhum dos grupos, embora seja evidente uma diminuição um pouco mais notável no grupo EST (30 mg) vs. Controlo e no grupo EST (30 mg) + BBN em comparação com o grupo BBN (Figura 32A). O mesmo perfil foi encontrado para os valores de Col- HDL, embora aqui a redução no grupo EST (30 mg) + BBN fosse significativa vs. BBN (Figura 32B)

Quanto ao colesterol LDL (Figura 32C), o seu comportamento no grupo EST (30 mg) + BBN é idêntico relativamente aos parâmetros lipídicos anteriores ( $P < 0,05$ ), mas aqui os grupos EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN já apresentam maiores reduções de LDL comparativamente ao grupo BBN, ainda que não sejam significativas numa perspectiva estatística.

Os níveis de triglicéridos assumem uma tendência diferente. Como se pode verificar na Figura 32D, o grupo que apresenta uma redução estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) é o CEL (10 mg) vs. Controlo e os grupos administrados com atorvastatina, não viram alterado este parâmetro.



**Figura 32** – Gráfico representativo dos diferentes indicadores séricos para avaliação do perfil lipídico: col. Total (A), col.-HDL (B), col.-LDL (C) e triglicéridos (D).

Os resultados representam médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$  são representados por uma letra e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN.

Tendo em conta o mecanismo de acção das estatinas, seriam de esperar alterações mais significativas no perfil lipídico, principalmente nos níveis de colesterol total e de LDL. No entanto, é visível que a atorvastatina, apesar de, por si só, não reduzir as concentrações séricas dos parâmetros do perfil lipídico em ratos normais, previne o seu aumento nos grupos com BBN especialmente para a dose de 30 mg. É de salientar que os resultados apresentados referem-se ao tempo final e a atorvastatina deixou de ser administrada a partir da semana 8 do estudo e, por isso, os efeitos obtidos no final do estudo não reflectem as alterações reais provocadas por este fármaco ao longo do período de administração.

## 6.2 – Índices aterogénicos

A Tabela 6 representa os resultados obtidos das razões entre os diferentes parâmetros do perfil lipídico.

**Tabela 6 – Índices aterogénicos.**

Índices aterogénicos			
Grupos	Col. Total / Col.-HDL	Col. LDL / Col. Total	Col.-LDL / Col.-HDL
<b>Controlo</b>	1,722 ± 0,033	0,192 ± 0,022	0,356 ± 0,031
<b>EST (30 mg)</b>	1,746 ± 0,031	0,240 ± 0,034	0,419 ± 0,059
<b>CEL (10 mg)</b>	1,657 ± 0,024	0,208 ± 0,024	0,347 ± 0,044
<b>BBN</b>	1,489 ± 0,020 <sup>aaa</sup>	0,289 ± 0,017 <sup>aa</sup>	0,434 ± 0,025
<b>EST(30mg)+BBN</b>	1,727 ± 0,050 <sup>bbb</sup>	0,272 ± 0,025	0,462 ± 0,031
<b>EST(3 mg)+BBN</b>	1,657 ± 0,078 <sup>bb</sup>	0,220 ± 0,027	0,371 ± 0,058
<b>EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN</b>	1,737 ± 0,034 <sup>bbb</sup>	0,228 ± 0,024	0,397 ± 0,042

Os resultados representam as médias ± e.p.m. dos índices aterogénicos nos diferentes grupos intervenientes no estudo. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por uma, duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN.

Observando os resultados provenientes da razão do colesterol total sobre o col.- HDL, é evidente a sua redução extremamente significativa no grupo BBN vs. Controlo ( $P < 0,001$ ). Contudo, nos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN verifica-se um aumento acentuado desta razão aterogénica quando comparados com o grupo BBN ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente) (Tabela 6) .

Na avaliação dos valores da razão col.- LDL / Colesterol Total, não são visíveis grandes variações entre os diferentes grupos, à excepção do grupo BBN que apresenta um aumento significativo ( $P < 0,01$  vs. Controlo ), sendo tendencial uma redução nos grupos preventivos vs. BBN.

Na razão col.- LDL / col.- HDL, não existem mudanças estatisticamente significativas nos resultados dos diferentes grupos.

## 7 – HEMOGRAMA

Foram avaliados diversos indicadores hematológicos dos animais de cada grupo de estudo, quer a nível plaquetar quer eritrocitário, com o objectivo de avaliar as implicações deste estudo ao nível do equilíbrio hemorreológico. Os resultados relativos às plaquetas e aos glóbulos vermelhos estão descritos nas Tabelas 7 e 8 respectivamente.

### 7.1 – Indicadores plaquetares

**Tabela 7** – Indicadores hematológicos relacionados com as plaquetas.

Indicadores hematológicos plaquetares				
Grupos	PLT ( $10^3/\mu\text{L}$ )	PCT (%)	VPM (fL)	CVP (%)
<b>Controlo</b>	990,667 $\pm$ 46,207	0,571 $\pm$ 0,018	5,817 $\pm$ 0,250	16,383 $\pm$ 0,320
<b>EST (30 mg)</b>	700,250 $\pm$ 25,224 <sup>aaa</sup>	0,408 $\pm$ 0,009 <sup>aaa</sup>	5,825 $\pm$ 0,132	16,975 $\pm$ 0,592
<b>CEL (10 mg)</b>	884,750 $\pm$ 42,576	0,526 $\pm$ 0,017	5,975 $\pm$ 0,149	16,875 $\pm$ 0,225
<b>BBN</b>	1008,125 $\pm$ 46,959	0,575 $\pm$ 0,021	5,725 $\pm$ 0,113	16,138 $\pm$ 0,258
<b>EST(30mg)+BBN</b>	665,833 $\pm$ 36,805 <sup>bbb</sup>	0,373 $\pm$ 0,025 <sup>bbb</sup>	5,529 $\pm$ 0,123	16,471 $\pm$ 0,350
<b>EST(3 mg)+BBN</b>	712,333 $\pm$ 43,330 <sup>bbb</sup>	0,443 $\pm$ 0,026 <sup>bbb</sup>	6,188 $\pm$ 0,162	16,825 $\pm$ 0,251
<b>EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN</b>	584,000 $\pm$ 57,345 <sup>bbb</sup>	0,348 $\pm$ 0,020 <sup>bbcc</sup>	5,983 $\pm$ 0,252	16,850 $\pm$ 0,405

Os valores apresentados na tabela são respectivos às médias  $\pm$  e.p.m. Os valores de significância  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  são representados respectivamente por duas ou três letras e são obtidos através da comparação dos diferentes grupos com <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3mg)+BBN.

Quanto aos indicadores plaquetares, mais precisamente o número de plaquetas (PLT) e plaquetócrito (PCT), são evidentes reduções bastante significativas nos grupos administrados com atorvastatina ( $P < 0,001$ ) quer isoladamente vs. Controlo quer grupos com BBN vs. BBN isolado. Relativamente ao volume plaquetar médio (VPM) e ao coeficiente de variação plaquetar (CVP) não existe significância estatística nos resultados obtidos em nenhum dos grupos de estudo (Tabela 7).

## 7.2 – Indicadores eritrocitários

Relativamente aos parâmetros eritrocitários, são claras as alterações nos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN. Assim, em relação ao grupo EST (30 mg) + BBN, por comparação com o grupo BBN, regista uma diminuição muito significativa ( $P < 0,01$ ) no número de eritrócitos (GV), na hemoglobina (Hb) e no hematócrito (HTC) e uma pequena redução (não estatística) do volume corpuscular médio (VCM) e do coeficiente de variação eritrocitário (CVE). O grupo EST (3 mg) + BBN apresenta uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do número de glóbulos vermelhos, da hemoglobina e do hematócrito ( $P < 0,01$  para ambos) em relação ao grupo BBN. Quanto ao VCM, este grupo exibe apenas um aumento tendencial e relativamente ao CVE verifica-se uma ligeira redução comparativamente aos resultados obtidos para o grupo BBN.

**Tabela 8** – Indicadores hematológicos relacionados com os glóbulos vermelhos.

Indicadores hematológicos eritrocitários					
Grupos	GV ( $10^6/\mu\text{L}$ )	Hb (g/dL)	HTC (%)	VCM (fL)	CVE (%)
Controlo	7,578 ± 0,290	14,150 ± 0,524	40,417 ± 1,686	53,317 ± 0,773	15,017 ± 0,528
EST (30 mg)	7,170 ± 0,270	13,500 ± 0,367	37,800 ± 0,883	52,850 ± 1,087	13,675 ± 0,692
CEL (10 mg)	7,343 ± 0,082	13,280 ± 0,144	38,025 ± 0,427	51,825 ± 0,917	14,800 ± 0,430
BBN	8,073 ± 0,112	14,600 ± 0,146	42,113 ± 0,441	52,175 ± 0,469	15,438 ± 0,396
EST(30mg)+BBN	7,113 ± 0,239 <sup>bb</sup>	13,050 ± 0,295 <sup>bb</sup>	37,117 ± 0,966 <sup>bb</sup>	52,129 ± 0,924	14,700 ± 0,294
EST(3 mg)+BBN	7,214 ± 0,120 <sup>b</sup>	13,114 ± 0,192 <sup>bb</sup>	37,986 ± 0,567 <sup>bb</sup>	52,963 ± 0,710	14,088 ± 0,427
EST (3mg) +CEL(1mg)+BBN	6,610 ± 0,360 <sup>bbb</sup>	12,980 ± 0,473 <sup>bb</sup>	35,260 ± 1,389 <sup>bbb</sup>	52,967 ± 1,435	14,733 ± 0,612

Os valores apresentados na tabela são respectivos às médias ± e.p.m. Os valores de significância  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$  são representados respectivamente por duas ou três letras e são obtidos através da comparação dos diferentes grupos com <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3mg) + BBN.

No grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, é possível verificar-se uma redução significativa do número de eritrócitos e da percentagem do hematócrito ( $P < 0,001$  vs. BBN para ambos), assim como da concentração de hemoglobina ( $P < 0,01$  vs. BBN). Relativamente ao VCM e ao CVE, este grupo assume um comportamento idêntico ao grupo EST (3 mg) + BBN em comparação com o grupo BBN (Tabela 8).

## 8 – EQUILÍBRIO OXIDATIVO

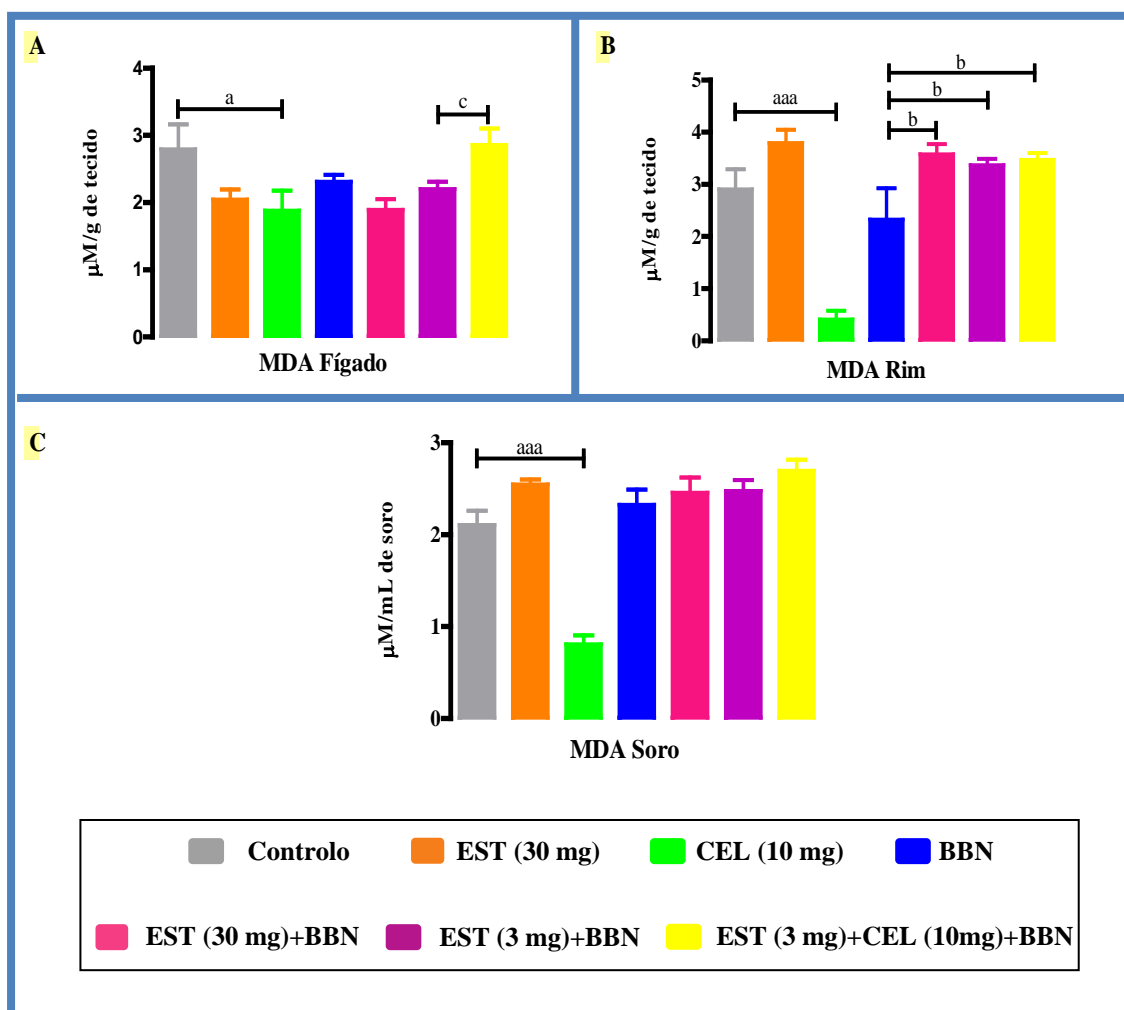
Com o intuito de avaliar o stresse oxidativo (ou estado redox) foi quantificado o MDA, um importante biomarcador do processo de peroxidação lipídica mediado por espécies reactivas de oxigénio, e medida a capacidade antioxidante total, que estima a capacidade de resposta antioxidante do organismo a um aumento de espécies reactivas.

### 8.1 – Peroxidação lipídica (MDA)

Fazendo uma análise ao gráfico representado na Figura 33A, que corresponde à quantidade de MDA formado no fígado, verifica-se que o grupo Controlo e o grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN detêm os valores mais elevados. Assim, os grupo EST (30 mg) e BBN apresentam valores inferiores, sem significado estatístico, e o grupo CEL (10 mg) exhibe uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo Controlo. No grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN há um aumento significativo vs. BBN (Figura 33A).

Relativamente ao MDA no rim, verificam-se grandes discrepâncias nos resultados obtidos nos diversos grupos do estudo. O grupo EST (30 mg) apresenta concentrações de MDA tendencialmente aumentadas quando comparado com o grupo Controlo, enquanto que o grupo BBN assume um comportamento inverso. No grupo CEL (10 mg), verifica-se uma descida severa na produção de MDA ( $P < 0,001$ ) em comparação com o grupo Controlo (Figura 33B).

No que diz respeito aos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, não existem grandes alterações nos valores da concentração de MDA entre eles, manifestando-se significativamente aumentados ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo BBN.



**Figura 33** – Representação gráfica das concentrações de MDA no fígado (A), rim (B) e soro (C). Os resultados representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por uma, duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3 mg) + BBN.

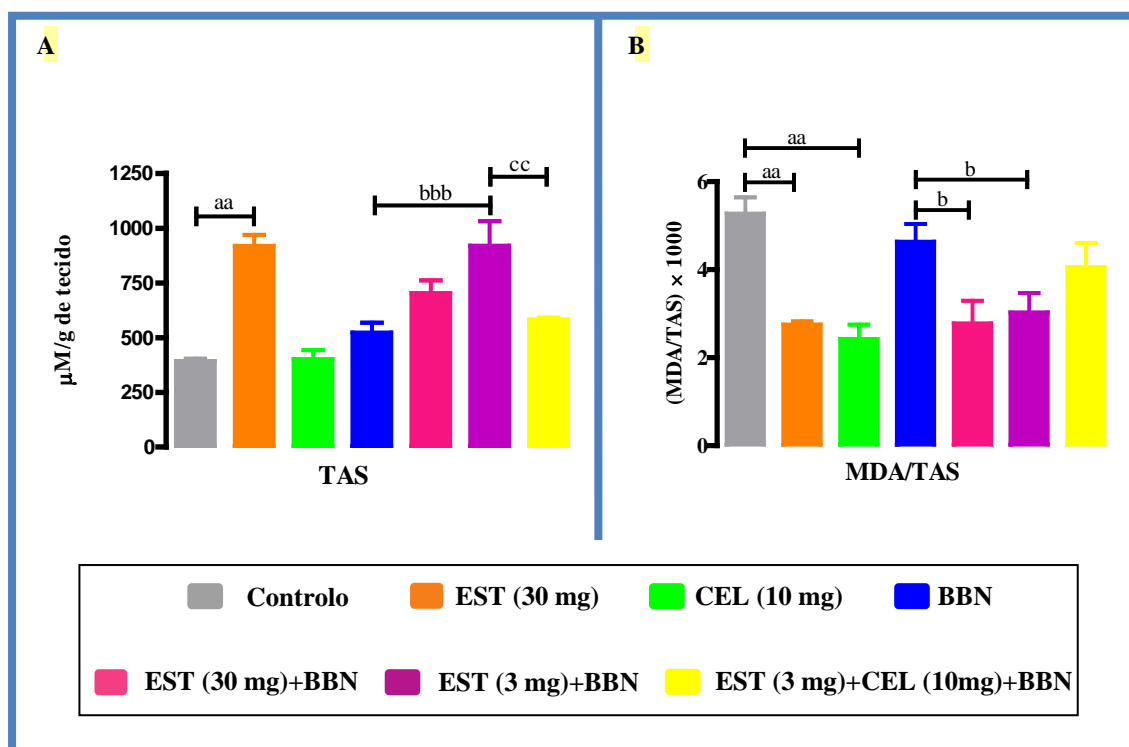
Quanto à concentração de MDA no soro, apenas se verifica uma quebra significativa deste parâmetro no grupo CEL (10 mg) ( $P < 0,001$  vs. Controlo). Todos os outros grupos demonstram apenas uma tendência para um aumento da concentração de MDA relativamente ao grupo Controlo, no caso do grupo EST (30 mg), e ao grupo BBN, para os restantes grupos (Figura 33C).

## 8.2 – Capacidade antioxidante total

Como se pode verificar na Figura 34A, os valores séricos de TAS são significativamente superiores no grupo EST (30 mg) ( $P < 0,01$  vs. Controlo) e os do grupo CEL (10 mg) mantêm-se praticamente inalterados em relação ao grupo Controlo. No grupo BBN, é visível um ligeiro

aumento de TAS, embora insignificante numa perspectiva estatística em comparação com o grupo Controlo.

Quanto aos grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN, observou-se um aumento dos valores de TAS, significativo para este último ( $P < 0,001$  vs. BBN) e tendencial para o grupo EST (30 mg) + BBN. Contrariamente a estes grupos, o grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, exibe uma redução de TAS no soro relativamente ao grupo EST (3 mg) + BBN ( $P < 0,01$ ).



**Figura 34** – Resultados da capacidade antioxidante total no soro (A) e razão MDA / TAS (B). Os resultados representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por uma, duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3 mg) + BBN.

### 8.3 - Razão MDA/TAS em soro

Em relação à razão dos dois parâmetros indicadores de equilíbrio oxidativo, MDA sobre TAS, os grupos EST (30 mg) e CEL (10 mg) apresentam valores significativamente inferiores ( $P < 0,01$  para ambos) comparativamente ao grupo Controlo. No grupo BBN não se verificam variações significantes dos valores obtidos da razão MDA/TAS, embora sejam um pouco inferiores ao grupo Controlo (Figura 34B).

Nos valores correspondentes aos grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN verificou-se uma redução significativa ( $P < 0,01$  vs. BBN para ambos). No grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN também se observou uma pequena redução em comparação com o grupo BBN,

contudo, essa redução não chega a ser estatisticamente significativa nem chega a alcançar os valores dos grupos anteriores.

## **9 – HISTOMORFOLOGIA DA BEXIGA**

A avaliação quantitativa e qualitativa de tumores é essencial para averiguar o desenvolvimento ou ausência de tumores da bexiga no modelo experimental utilizado neste estudo, assim como verificar o efeito dos fármacos administrados (atorvastatina e celecoxibe) para esse fim.

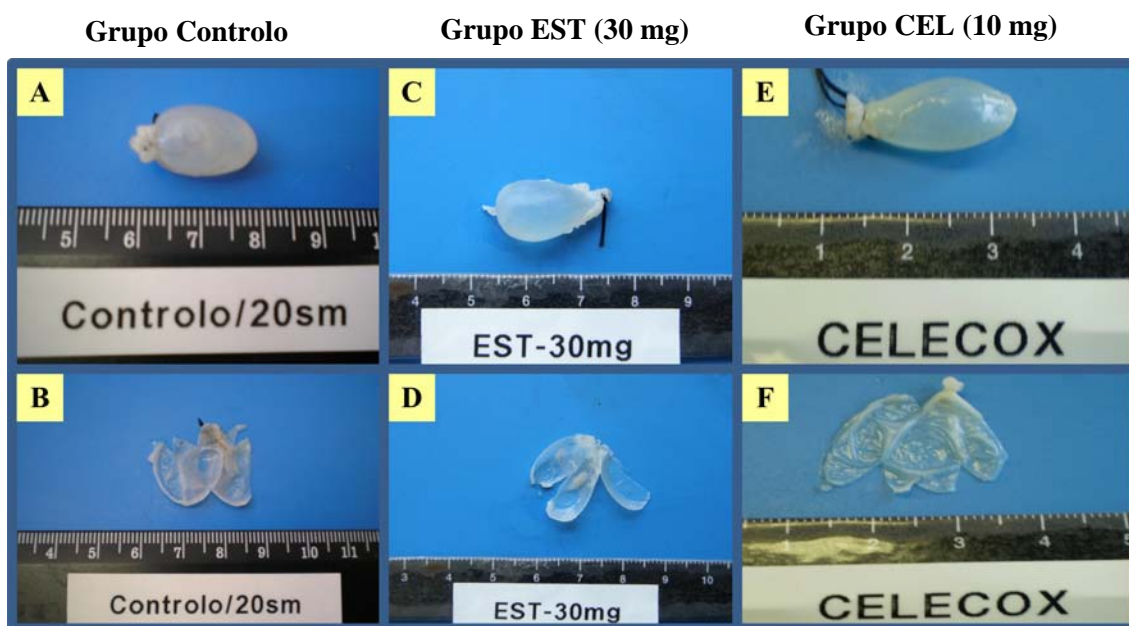
Desta forma, para avaliar quantitativamente o número de tumores e as suas dimensões, realizou-se a determinação do número de tumores por rato, número de tumores por grupo e percentagem de ratos com tumor, bem como o volume tumoral médio e o volume tumoral total recorrendo, para isso, à avaliação do perfil macroscópico. Posteriormente, procedeu-se à microscopia a fim de avaliar qualitativamente os mesmos.

### **9.1 – Avaliação do perfil macroscópico**

Nas Figuras 35, 36, 37, 38 e 39 estão representadas algumas das observações macroscópicas referentes às bexigas dos animais dos grupos em estudo.

Tendo em conta os diferentes tipos de tratamento em cada grupo em estudo, verificaram-se, como seria de esperar, características macroscópicas diferentes.

Nos grupos Controlo, EST (30 mg) e CEL (10 mg) foi visível macroscopicamente a ausência de tumores. Como se pode verificar na Figura 35A, 35C e 35E, as bexigas representantes de cada um destes grupos demonstraram um aspecto límpido e translúcido, sem indicadores evidentes de alterações macroscópicas.



**Figura 35-** Observações do perfil macroscópico da bexiga no momento da recolha (A, C e E) e após dissecação da mesma (B, D e F) para análise mais específica relativas aos grupos Controlo (A e B), EST (30 mg) (C e D) e CEL (10 mg) (E e F).

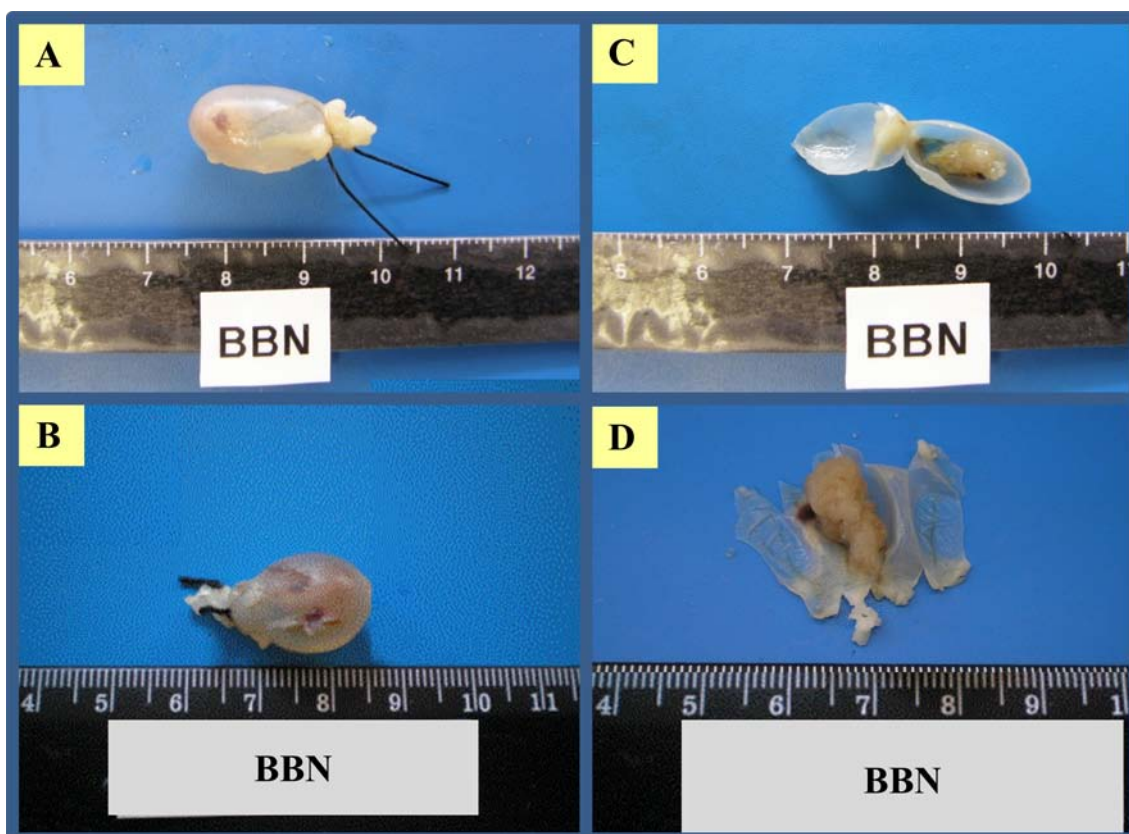
Relativamente à vascularização das bexigas, não se verificaram irregularidades nas características macroscópicas, reforçando ainda mais o aspecto normal deste órgão nos referidos grupos.

Para uma análise macroscópica mais específica, as bexigas foram dissecadas com o intuito de averiguar no seu interior a existência de possíveis massas tumorais e, mais uma vez, como era de esperar, verificou-se a ausência de qualquer tipo de alterações do ponto de vista tumoral, dado que as bexigas apresentavam um aspecto normal (Figura 35B, 35D e 35F).

As restantes bexigas dos animais dos grupos Controlo, EST (30 mg) e CEL (10 mg) demonstraram um padrão semelhante às bexigas ilustradas na Figura 35.

Em relação às observações macroscópicas das bexigas do grupo BBN, e contrariamente aos grupos anteriores, foi facilmente identificada a presença de tumores bastante desenvolvidos logo após recolha do órgão na maioria das bexigas deste grupo (Figura 36A e 36B).

Após dissecação das bexigas ilustradas na Figura 36B, foi visível a presença de tumores exuberantes que praticamente ocupavam todo o lúmen vesical (Figura 36D).

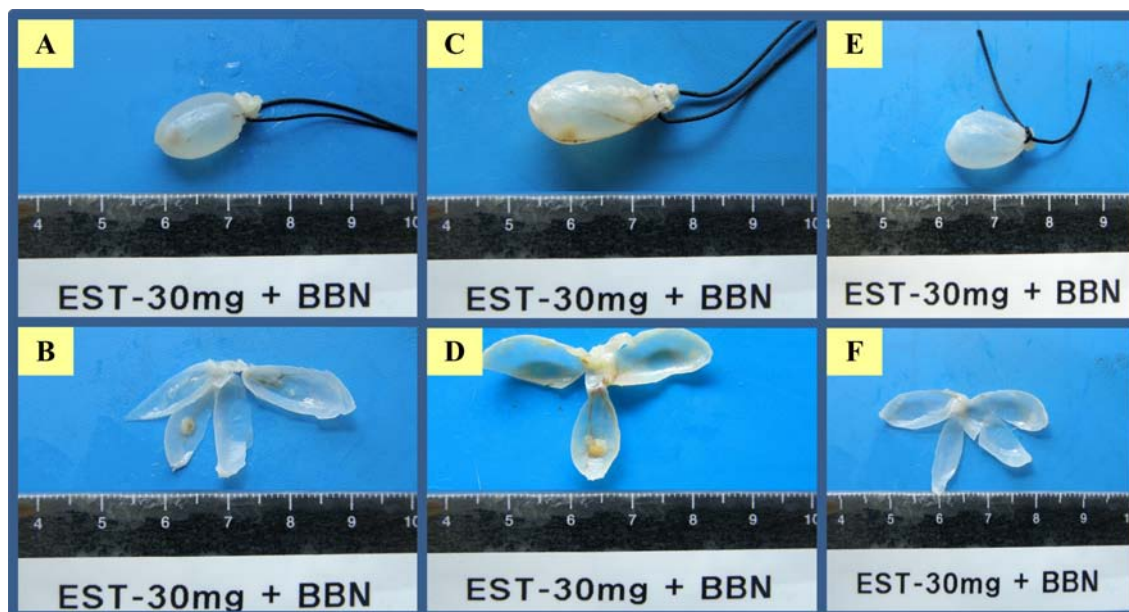


**Figura 36** – Observação do perfil macroscópico das bexigas no momento da recolha (A e B) e após dissecação das bexigas (C e D) do grupo BBN.

As Figuras 36A e 36C apresentam uma bexiga com tumores de menores dimensões, mas notoriamente desenvolvidos. É também de salientar a hipervascularização presente nas bexigas deste grupo, indicando a ocorrência de angiogénese, uma característica associada ao crescimento tumoral.

Os resultados macroscópicos obtidos neste grupo, e por comparação com o grupo Controlo, demonstram a severidade do BBN como carcinogénio, comprovando a eficácia do modelo experimental utilizado na indução tumoral.

Debruçando-nos agora sobre o grupo preventivo de alta dose EST (30 mg) + BBN, verificou-se um comportamento distinto relativamente ao observado nos grupos descritos anteriormente.



**Figura 37** – Observação do perfil macroscópico das bexigas no momento da recolha (A, C e E) e após dissecação das bexigas (B, D e F) do grupo EST (30 mg) + BBN.

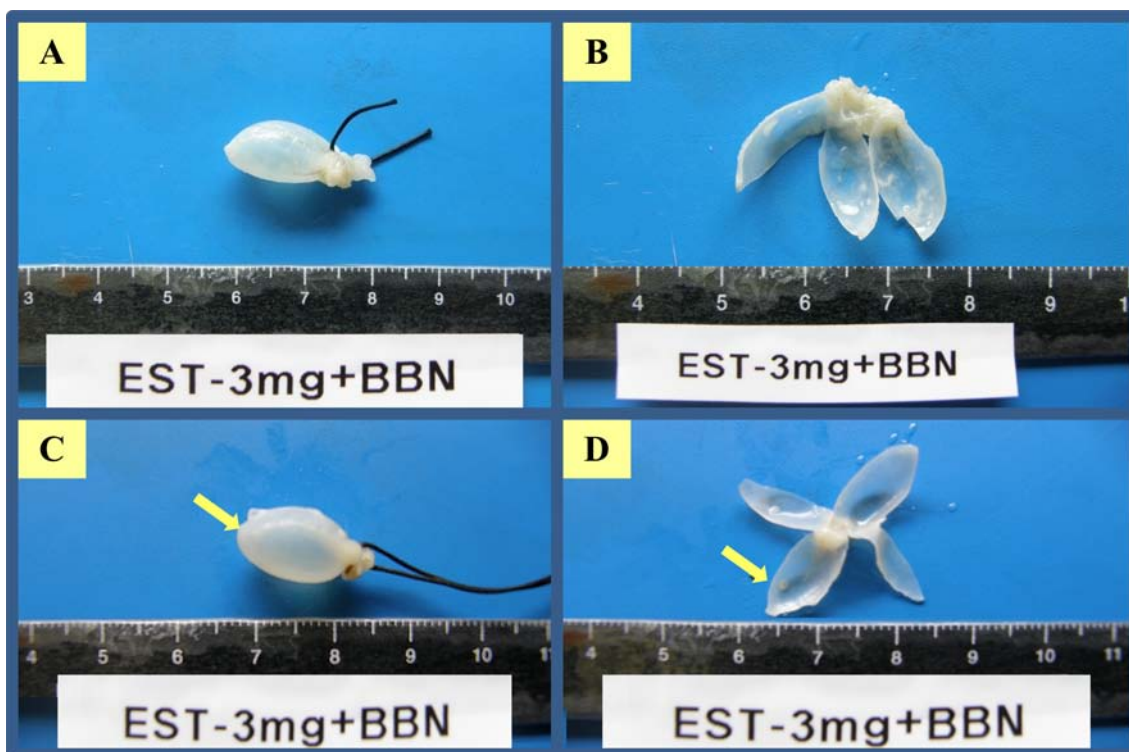
Como comprovam as imagens apresentadas na Figura 37 é possível verificar a presença de tumores em algumas bexigas. Dos 7 ratos intervenientes neste grupo, apenas 3 apresentavam tumores (2 estão representados nas Figuras 37A, 37B, 37C e 37D), com um aumento evidente da vascularização. As restantes bexigas exibiam um aspecto límpido sem a presença aparente de tumores (Figura 37E e 37F).

A análise do interior das bexigas, depois de dissecadas, revelou-se consistente com as ilações observadas no momento da recolha. Como se pode ver nas Figuras 37B e 37D é claro o aparecimento de tumores, embora inferiores aos do grupo BBN. De referir que também foi possível observar com maior lucidez a vascularização aumentada (detectada antes da dissecação). Posto isto, é possível deduzir que a atorvastatina 30 mg, apesar de não ser totalmente eficaz na prevenção de tumores na bexiga, desempenha algum efeito preventivo sobre o desenvolvimento tumoral induzido por BBN.

Relativamente ao grupo preventivo EST (3 mg) + BBN, a administração de atorvastatina de baixa dose foi claramente mais eficaz. Neste grupo, apenas um rato apresentava tumores na bexiga, que está representada na Figura 38C. No entanto, o único tumor presente neste grupo já se encontra num grau de desenvolvimento avançado, mostrando alguma agressividade. Adicionalmente, o aumento da vascularização caracteriza as bexigas deste

grupo, sugerindo a presença do fenômeno de angiogênese. Estas características foram comprovadas após dissecação (Figura 38B) dessa mesma bexiga.

No caso dos ratos que não tinham tumores, as bexigas apresentavam um aspecto translúcido no momento da sua recolha, característico de uma bexiga saudável (Figura 38A). Mais uma vez, e após dissecação das mesmas, comprovou-se a ausência de massas tumorais (Figura 38B).



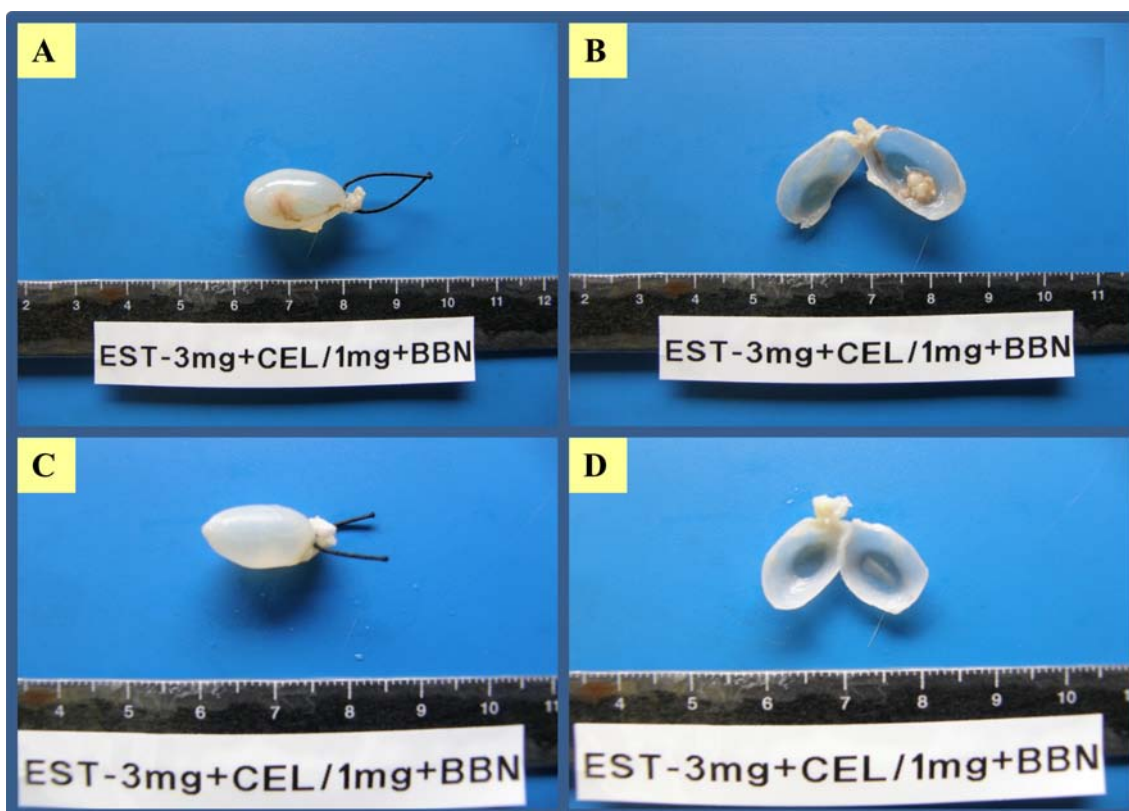
**Figura 38** – Observação do perfil macroscópico das bexigas no momento da recolha (A e C) e após dissecação das bexigas (B e D) do grupo EST (3 mg) + BBN.

Concluindo, o grupo EST (3 mg) + BBN demonstrou um comportamento significativamente menos agressivo em relação ao grupo BBN, assim como em relação ao grupo EST (30 mg) + BBN. Desta forma, e contrariamente ao que se esperava (dado que é uma dose baixa), a atorvastatina 3 mg parece ser mais eficaz na prevenção do aparecimento de tumores induzidos pelo BBN, uma vez que foi evidente o número reduzido de lesões tumorais.

Olhando agora para o grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN (Figura 39), os resultados obtidos não foram os melhores, já que era esperado um número menor de tumores.

Na Figura 39A, foi distinta a presença de massas tumorais já com algumas dimensões, sendo também evidente uma vascularização aumentada nesta bexiga representante dos 50 % de animais do grupo sinérgico que possuíam tumores. Posteriormente, foi realizada a

análise do interior das bexigas após dissecação das mesmas (Figura 39B), revelando-se consistente com as apreciações atrás referidas.



**Figura 39** – Observação do perfil macroscópico das bexigas no momento da recolha (A e C) e após dissecação das bexigas (B e D) no grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN.

Os restantes 50% de ratos apresentavam bexigas saudáveis, não se verificando a presença de quaisquer tumores (Figura 39C e 39D).

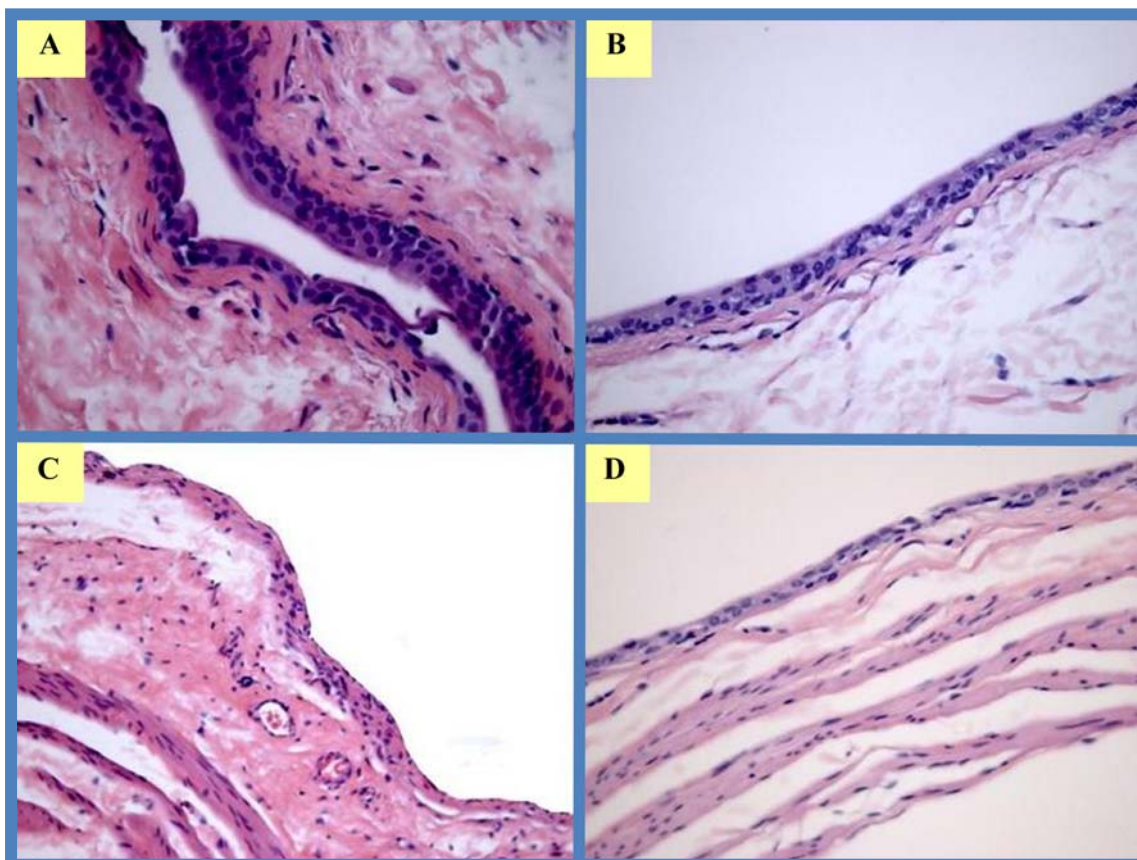
Daqui se conclui que a sinergia entre a atorvastatina 3 mg e o celecoxibe 1 mg não potenciou efeitos significativos na prevenção de tumores. No entanto, verificou-se algum efeito, ainda que mínimo, já que as dimensões dos tumores, apesar de serem desenvolvidos, não chegam a atingir o tamanho dos tumores descritos para o grupo BBN. Para além disso, metade dos animais deste grupo, não manifestaram a presença de qualquer tumor.

Depois de efectuadas as avaliações macroscópicas das bexigas, estas foram complementadas com a análise microscópica, com o intuito de reforçar ou até mesmo eliminar observações dúbias obtidas da macroscopia.

## 9.2 – Avaliação do perfil microscópico

Após dissecação das bexigas dos animais de cada grupo foram efectuados cortes longitudinais para observação microscópica. As imagens mais relevantes encontram-se ilustradas nas Figuras 40 à 45.

Na Figura 40A e na Figura 40B está representada uma bexiga do grupo Controlo e foi possível verificar a ausência de qualquer tipo de anomalia no urotélio, assim como nas restantes camadas celulares que se apresentavam normais e organizadas. Por estas razões, concluiu-se que o tratamento neste grupo de animais não desencadeou qualquer tipo de alterações na morfologia das bexigas, tal como era de esperar, uma vez que se tratava do grupo Controlo.

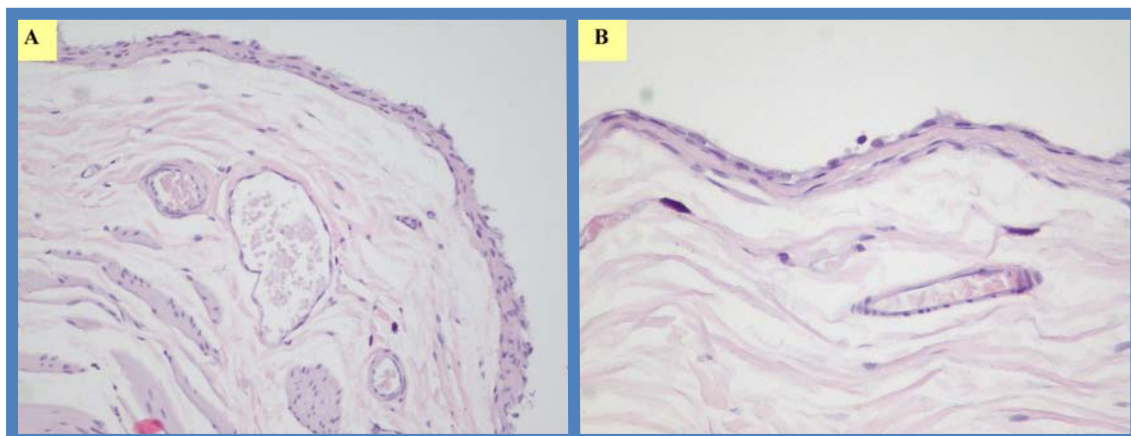


**Figura 40** – Fotografias representativas das bexigas do grupo Controlo (A e B) e do grupo Celecoxibe (C e D). Foi utilizada a técnica de coloração H&E e uma ampliação de 100x.

Relativamente ao grupo Celecoxibe, foi evidente um edema da submucosa numa das bexigas (Figura 40C), enquanto se verificou a simples atrofia do urotélio numa outra bexiga (Figura 40D). Estes dois casos foram os únicos que apresentavam algumas alterações

morfológicas, apesar de não se ter verificado nenhum tipo de tumores em todas as bexigas deste grupo.

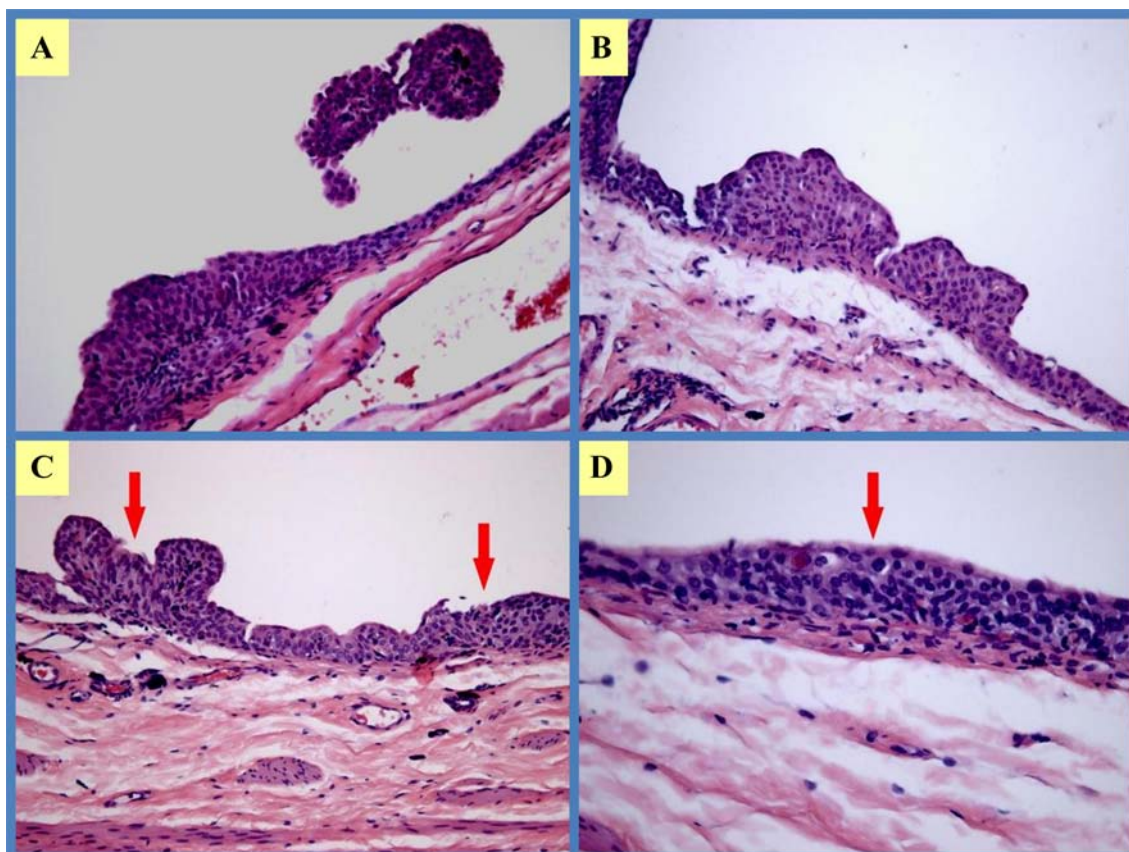
Em relação ao grupo EST (30 mg), o edema da parede em todas as camadas celulares e a atrofia do urotélio foram as características que predominaram nestas bexigas e estão representadas nas Figuras 41A e 41 B. Apesar disso, não se verificou a presença de tumores em nenhuma das bexigas deste grupo.



**Figura 41** – Observações microscópicas relativas ao grupo EST (30 mg). As imagens A e B representam os cortes de diferentes bexigas do grupo EST (30 mg), com utilização da técnica de coloração H&E e uma ampliação de 100x. A Figura B corresponde é obtida de uma ampliação de 200x.

Em comparação com o grupo Controlo, o grupo BBN mostrou alterações significativas nas diferentes camadas de células que constituem a bexiga (Figura 42). As observações obtidas da microscopia demonstraram claramente anomalias no urotélio.

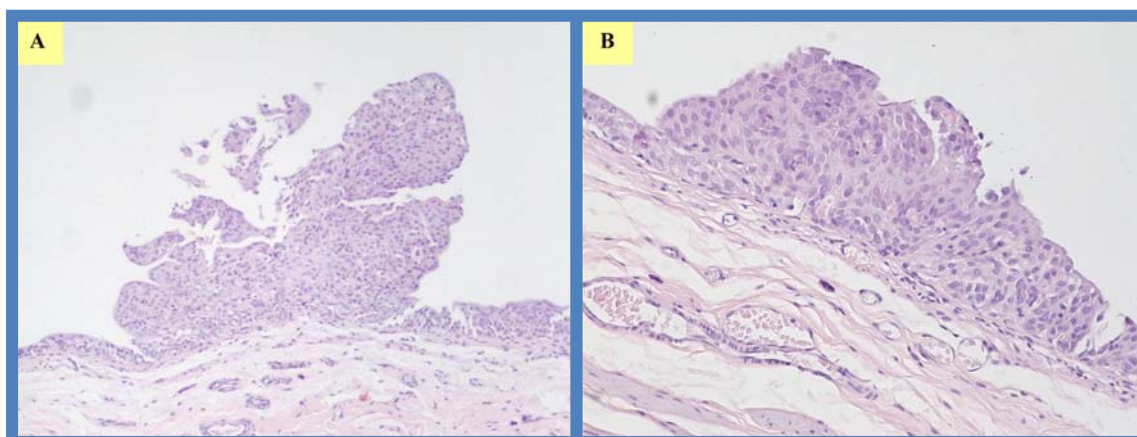
Constatou-se a existência de um pequeno carcinoma papilar bastante diferenciado (Figura 42A), ao mesmo tempo que se verificou hiperplasia das camadas uroteliais, para além de atipia (displasia severa). Na Figura 42B está expressa uma hiperplasia papilar com displasia moderada do urotélio e na Figura 42C constata-se a existência de uma hiperplasia com displasia severa do urotélio, que se encontra ampliada 200x na Figura 42D.



**Figura 42** – Observações microscópicas relativas ao grupo BBN. As imagens A, B e C representam os cortes de diferentes bexigas do grupo BBN, com utilização da técnica de coloração H&E e uma ampliação de 100x. A Figura D corresponde à bexiga da Figura C, mas com uma ampliação de 200x.

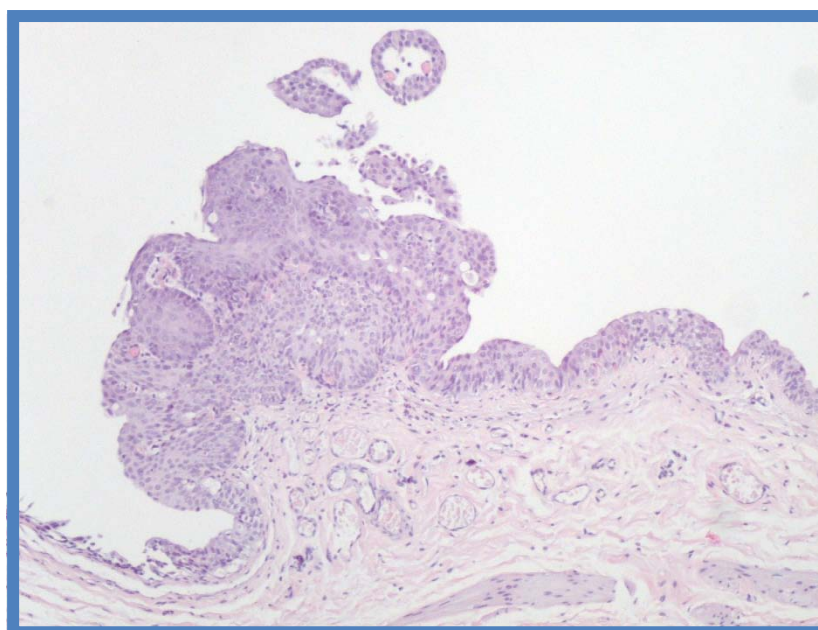
Estas observações permitem concluir que a administração de BBN ao longo das 8 semanas produziu efeitos acentuados sobre as bexigas pertencentes a este grupo, gerando o aparecimento de várias lesões pré-neoplásicas e neoplásicas severas.

A microscopia realizada nas bexigas do grupo EST (30 mg) + BBN revelou, para além da presença de edema na mucosa e na lâmina própria e de atrofia do urotélio, uma elevada metaplasia epidermóide no urotélio, embora seja difusa. Estas propriedades predominaram em todas as bexigas deste grupo (Figura 43B). Verificou-se a existência de um tumor papilar em 3 ratos, cada um com diferentes graus de estadiamento (um TaG1, um TaG2 e um T1G2) (Figura 43A). Em relação a lesões pré-neoplásicas presentes neste grupo, constatou-se a presença de hiperplasia em 3 bexigas, das quais duas delas também apresentavam tumores, e uma displasia de baixo grau. Daqui, é possível concluir que, contrariamente ao que se esperava, esta dose de atorvastatina não preveniu com total sucesso o aparecimento de tumores. No entanto, os tumores que surgem neste grupo não chegam a atingir as dimensões alcançadas no grupo BBN.



**Figura 43** – Observações microscópicas relativas ao grupo EST (30 mg) + BBN. As imagens A e B representam os cortes de diferentes bexigas do grupo EST (30 mg) + BBN, com utilização da técnica de coloração H&E e uma ampliação de 100x. A imagem A é representativa de um dos tumores papilares detectados neste grupo e na imagem B é possível verificar a hiperplasia papilar, metaplasia epidermóide e edema da parede frequentes nas bexigas em questão.

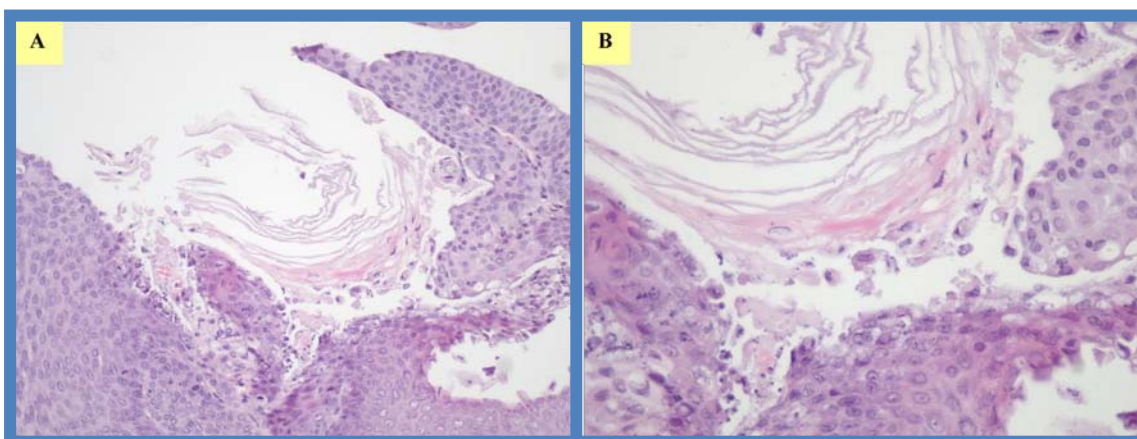
O grupo preventivo de baixa dose EST (3 mg) + BBN foi o grupo que demonstrou maior eficácia na prevenção tumoral. As bexigas dos animais deste grupo apresentaram certas características idênticas às do grupo EST (30 mg) + BBN, como a presença de edema na mucosa, metaplasia epidermóide e atrofia do urotélio. No entanto, a diferença entre estes dois grupos reside na eficácia da prevenção tumoral, uma vez que apenas se verificou a presença de dois tumores papilares invertidos num único rato (Figura 44), apresentando uma elevada eficácia nesta dosagem (apenas 12,5%, representando uma bexiga em 8 animais do grupo).



**Figura 44** – Observação microscópica de um tumor papilar invertido identificado no grupo EST (3 mg) + BBN. A imagem representa o corte da única bexiga que apresentava tumores no grupo EST (3 mg) + BBN, com utilização da técnica de coloração H&E e uma ampliação de 100x.

Relativamente a lesões pré-neoplásicas, 3 das bexigas deste grupo exibiram hiperplasia do urotélio, e uma bexiga mostrava uma displasia de alto grau. A bexiga onde se verificou a presença de tumores era a mesma que exibia a displasia de baixo grau e uma hiperplasia do urotélio. Ou seja, também a este respeito se constata um perfil claramente mais normal.

Quanto ao grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, a microscopia comprovou o que se verificou na macroscopia. Neste grupo verificou-se a presença de tumores papilares com um estado de desenvolvimento máximo, uma vez que foi identificado o fenómeno de queratinização em 2 bexigas (Figura 45A e 45B). Em relação à presença de lesões pré-neoplásicas, manifestaram-se em maior número neste grupo, sendo evidentes hiperplasias em 5 das 6 bexigas intervenientes deste grupo, 2 bexigas com displasias de alto grau e uma com displasia de baixo grau.



**Figura 45** - Observações microscópicas relativas ao grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN. A imagem A é representativa de um dos tumores papilares detectados neste grupo. A Figura B corresponde à bexiga da figura A, mas com uma ampliação de 400x.

Além da presença de lesões malignas e de lesões pré-neoplásicas neste grupo, verificou-se, mais uma vez, metaplasia epidermóide e atrofia do urotélio. Em alguns casos, a camada urotelial também apresentava alguma descamação.

### 9.3 – Avaliação quantitativa e qualitativa do tumor da bexiga

A avaliação quantitativa do carcinoma da bexiga foi realizada, através da determinação do número de tumores e do volume tumoral. A avaliação qualitativa consistiu na contabilização de lesões pré-neoplásicas e malignas. Os perfis quantitativo e qualitativo foram realizados em todos os grupos em estudo, embora na Tabela 9 só estejam representados os grupos onde foi detectada a presença de lesões. Assim, o grupo Controlo, o grupo EST (30 mg)

e o grupo CEL (10 mg), por ser nula a presença de qualquer lesão pré-neoplásica ou neoplásica (dado que não estiveram expostos ao BBN), não se encontram registados na tabela abaixo.

**Tabela 9** – Avaliação quantitativa e qualitativa dos tumores da bexiga: número de tumores, volume tumoral e lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.

<b>Macroscopia (quantitativo)</b>	<b>BBN (n=20)</b>		<b>EST (30 mg) + BBN (n=7)</b>		<b>EST (3 mg) + BBN (n=8)</b>		<b>EST(3 mg) + CEL(1 mg)+BBN (n=6)</b>	
<i>Número de tumores</i>								
% ratos com tumor	65,0% (13 in 20)		42,9% (3 em 7)		12,5% (1 em 8)		50% (3 em 6)	
Nº tumores/rato	1,2 ± 0,1 (16 in 13)		1 (3 em 3)		2 (2 em 1)		1 (3 em 3)	
<i>Volume tumoral (mm<sup>3</sup>)</i>								
Média/rato	720,0 <sup>(*)</sup> 138,5 ± 7,5 (em 13)		8,8 3,0 ± 1,7 (em 3)		4,7 4,7 (em 1)		27,6 9,2 ± 7,9 (em 3)	
Média/tumor	112,5 ± 6,4 (em 16)		3,0 ± 1,7 (em 3)		2,3 (em 2)		9,2 ± 7,9 (em 3)	
<b>Microscopia (qualitativo)</b>	<b>BBN (n=20)</b>		<b>EST (30 mg) + BBN (n=7)</b>		<b>EST (3 mg) + BBN (n=8)</b>		<b>EST(3 mg)+CEL(1 mg)+BBN (n=6)</b>	
	Grupo Tumores	Grupo Total	Grupo Tumores	Grupo Total	Grupo Tumores	Grupo Total	Grupo Tumores	Grupo Total
<i>Lesões pré-neoplásicas (%)</i>								
Hiperplasia	100 (13/13)	100 (20/20)	67 (2/3)	43 (3/7)	100 (1/1)	38 (3/8)	100 (3/3)	83 (5/6)
Displasia de alto grau	100 (13/13)	75 (15/20)	0 (0/3)	0 (0/7)	100 (1/1)	13 (1/8)	67 (2/3)	50 (3/6)
Displasia de baixo grau	0 (0/13)	25 (5/20)	33 (1/3)	14 (1/7)	0 (0/1)	25 (2/8)	33 (1/3)	17 (1/6)
<i>Lesões neoplásicas (%)</i>								
Tumor papilar	100 (13/13)	65 (13/20)	100 (3/3)	43 (3/7)	100 (1/1)	13 (1/8)	100 (3/3)	50 (3/6)
Tumor infiltrativo	15 (2/13)	10 (2/20)	0 (0/3)	0 (0/7)	0 (0/1)	0 (0/8)	0 (0/3)	0 (0/6)
Carcinoma <i>In Situ</i>	31 (4/13)	20 (4/20)	0 (0/3)	0 (0/7)	0 (0/1)	0 (0/8)	0 (0/3)	0 (0/6)

<sup>(\*)</sup> **NOTA:** o volume tumoral no grupo BBN apenas é referente a uma amostra com n= 8 dos 13 ratos que apresentavam tumores.

Fazendo uma apreciação à avaliação qualitativa na tabela 9, verifica-se que o grupo BBN foi o que apresentou as percentagens mais altas (65%) de tumores, bem como os volumes tumorais (720,0 mm<sup>3</sup>), demonstrando, assim, a eficácia deste agente químico na indução de tumores.

Quanto aos restantes grupos foram visíveis as diminuições no número de tumores, bem como a percentagem de ratos com tumor relativamente ao grupo BBN, principalmente no grupo EST (3 mg) + BBN, que foi o grupo que menos tumores apresentou (2 tumores em apenas 1 rato). No entanto, é de realçar que entre os grupos preventivos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN e o grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, este último foi o grupo que apresentou um número de tumores e volumes tumorais superiores.

Relativamente à avaliação qualitativa, todos os grupos apresentaram hiperplasias e displasias de alto grau. As displasias de baixo grau foram inferiores em relação às de alto grau, chegando mesmo a ser nula a sua presença nos animais que apresentaram tumores nos grupos BBN e EST (3 mg) + BBN.

Quanto ao tipo de lesões malignas, apenas se evidenciaram os tumores papilares em todos os grupos que apresentaram lesões neoplásicas, embora no grupo BBN se tenham também manifestado tumores infiltrativos e *in situ*.

## **10 – MARCADORES INFLAMATÓRIOS E TUMORAIS**

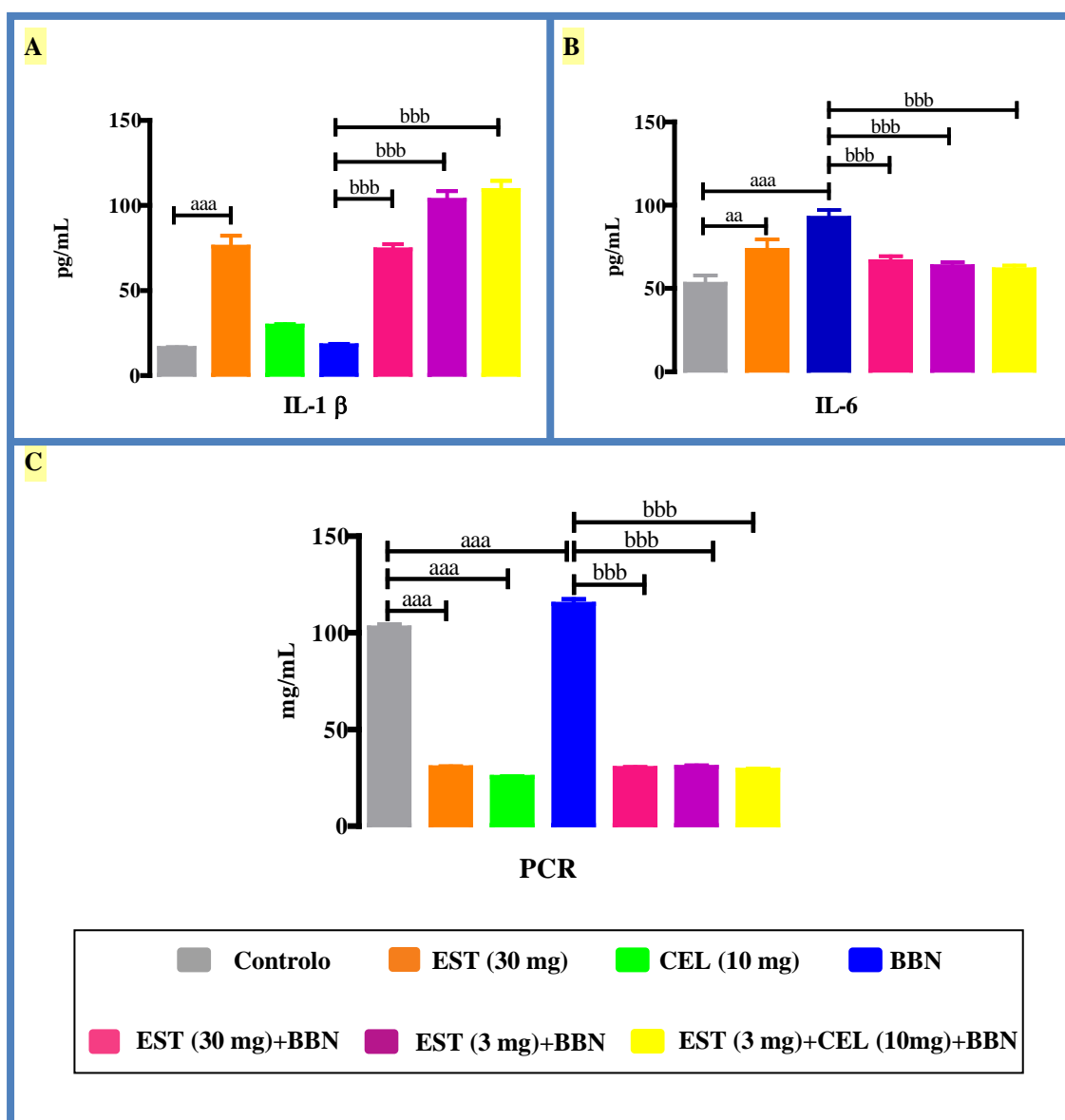
Foram determinados marcadores inflamatórios (IL-1  $\beta$ , IL-6, PCR) e tumorais (TNF-  $\alpha$  e TGF-  $\beta$ ) no soro dos ratos intervenientes no estudo, representados nas Figuras 46 e 47.

### **10.1 – Marcadores inflamatórios**

Relativamente à concentração sérica de interleucina  $\beta$  (Figura 46 A), verificou-se um aumento muito significativo ( $P < 0,001$  vs. Controlo) no soro dos ratos do grupo EST (30 mg). Nos grupos CEL (10 mg) e BBN registou-se um pequeno aumento, apenas tendencial, das concentrações séricas deste marcador inflamatório em relação ao grupo Controlo. Em comparação com o grupo BBN, os grupos preventivos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN e o grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN apresentaram valores muito superiores, com significado estatístico ( $P < 0,001$ ).

No caso da IL-6, o grupo EST (30 mg) e o grupo CEL (10 mg) exibiram um aumento significativo ( $P < 0,01$  para o grupo EST(30 mg) e  $P < 0,001$  vs. Controlo). Nos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, registou-se o oposto, apresentando

concentrações séricas de IL-6 idênticas entre si, mas significativamente inferiores do ponto de vista estatístico ( $P < 0,001$ ) quando comparados com o grupo BBN (Figura 46B).



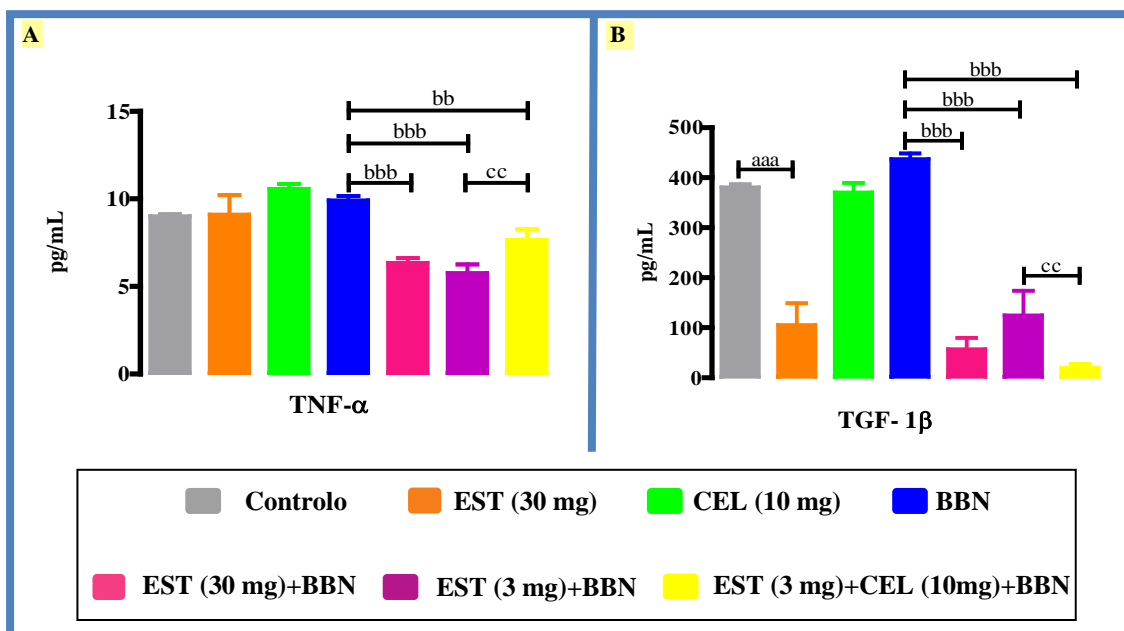
**Figura 46** – Resultados relativos aos marcadores inflamatórios IL-1  $\beta$ , IL-6 e PCR quantificados no soro. Os resultados representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, e <sup>b</sup> vs. BBN.

Analisando os resultados obtidos para as concentrações de PCR em soro, representados na Figura 46C, são visíveis grandes variações em todos os grupos. Da comparação com o grupo Controlo, o grupo BBN apresentou resultados substancialmente superiores ( $P < 0,001$ ). Contrariamente, todos os outros grupos manifestaram diminuições drásticas das concentrações de proteína C reactiva, atingindo valores médios muito semelhantes entre si (entre  $25,485 \pm 0,344$  e  $30,6294 \pm 0,659170$ ). Nesse sentido, os

resultados do grupo EST (30 mg) e do grupo CEL (1 mg) eram extremamente significativos ( $P < 0,001$ ) por comparação com o grupo Controlo. A diminuição da concentração de PCR evidenciada nos grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, à semelhança do grupo EST (30 mg) e CEL (10 mg), foi estatisticamente significativa em relação ao grupo BBN.

## 10.2 – Marcadores tumorais

Em relação às concentrações de TNF- $\alpha$  presentes em soro (Figura 47A), os valores médios do grupo EST (30 mg) são muito idênticos aos do grupo Controlo, o que significa que a atorvastatina administrada isoladamente não influencia este marcador. O grupo CEL (10 mg) apresenta uma pequena tendência para um aumento (não significativo) dos valores de TNF- $\alpha$  no soro, tal como o grupo BBN. Já nos grupos preventivos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN verificou-se uma diminuição bastante significativa *versus* grupo BBN ( $P < 0,001$  para ambos), atingindo valores muito idênticos entre si ( $6,345 \pm 0,272$  para o grupo EST – 30 mg + BBN;  $5,764 \pm 0,493$  para o grupo EST – 3 mg + BBN). À semelhança dos grupos preventivos de monoterapia, o grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN apresenta uma diminuição das concentrações deste marcador quando comparado com o grupo BBN ( $P < 0,01$ ) e o grupo EST (3 mg) + BBN ( $P < 0,01$ ).



**Figura 47** – Concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e TGF-1 $\beta$ . Os resultados representam as médias  $\pm$  e.p.m. Os diferentes valores de significância  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , são representados, respectivamente, por duas e três letras e são obtidos por comparação com: <sup>a</sup> vs. Controlo, <sup>b</sup> vs. BBN e <sup>c</sup> vs. EST (3 mg) + BBN.

---

Na Figura 47B, é notória a redução das concentrações de TGF-1 $\beta$  no grupo EST (30 mg) face ao grupo Controlo ( $P < 0,001$ ). O mesmo acontece com os grupos EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, que expressam valores muito reduzidos vs. BBN ( $P < 0,001$ ). Estes resultados sugerem o provável efeito da atorvastatina que claramente reduz os níveis de TGF-1 $\beta$  no soro dos animais pertencentes a estes grupos. De notar também que o grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN foi o que exibiu os valores de TGF-1 $\beta$  mais baixos em relação aos outros grupos, reproduzindo resultados estatisticamente significativos em comparação com o grupo BBN ( $P < 0,001$ ) e o grupo EST (3 mg) + BBN ( $P < 0,01$ ).

O grupo carcinogénio (BBN) mostrou um ligeiro aumento das concentrações de TGF-1 $\beta$ , não chegando a alcançar significâncias estatísticas em relação ao grupo Controlo.

Por comparação com o grupo Controlo, é possível verificar que no soro dos animais do grupo CEL (10 mg) as concentrações de TGF-1 $\beta$  mantiveram-se praticamente inalteradas.





# DISCUSSÃO



O tumor da bexiga revela uma incidência acentuada nos países ocidentais, ocupando o quarto lugar na classificativa de neoplasias mais frequentes no sexo masculino e o oitavo no sexo feminino, tendo o seu pico de incidência por volta dos 55 anos de idade.

Esta neoplasia continua a ser uma preocupação para a comunidade médica e científica, devido à sua malignidade, e às percentagens de mortalidade, incidência e prevalência serem bastante elevadas (Grasso, 2008; Ferlay e col., 2007). Adicionalmente, as taxas de recidiva são elevadas, o que explica o facto de a prevalência ultrapassar a incidência primária (Sylvester e col., 2006; Pisani e col., 2002).

Quando o tumor da bexiga é diagnosticado numa fase tardia ou quando é tratado de forma inadequada, o seu prognóstico é mau, para além de ter um elevado custo socioeconómico desde o diagnóstico até à morte (Grasso, 2008; Kirkali e col., 2005; Sangar e col., 2005). Apesar dos tratamentos actualmente disponíveis e dos esquemas de vigilância com cistoscopia e citologia urinária periódicos, são numerosas as recidivas e as progressões tumorais, que requerem frequentemente terapêuticas agressivas e mutilantes, com cistectomia radical, ocasionalmente radioterapia e quimioterapia, gerando elevadas taxas de mortalidade.

Os índices de mortalidade, ainda que elevados, têm vindo a diminuir nos últimos anos devido a uma detecção mais precoce e às melhorias na sobrevivência, no entanto ainda não é o suficiente para causar impacto na morbilidade e mortalidade globais (Evans e col., 2007).

Por estas razões, continua difícil o controlo do tumor da bexiga, devido principalmente à eficácia limitada das técnicas cirúrgicas e das terapêuticas farmacológicas actualmente aplicadas, em especial no controlo das recidivas e da progressão tumoral (Evans e col., 2007).

Todas estas limitações poderão ser minimizadas através da implementação de estratégias de prevenção primária e secundária e deverão envolver a eliminação de factores de risco já conhecidos, como o tabaco e factores ocupacionais (Colombel e col., 2005; Grasso, 2008), apesar dos mecanismos que contribuem para o aparecimento e progressão do tumor da bexiga permanecerem pouco elucidados. Estudos anteriores demonstraram as propriedades quimiopreventivas de vários agentes, entre eles os polifenóis do chá verde, vitaminas e AINES (Lu e col., 2008; Xiau e col., 2008) e complementados com estudos realizados pelo grupo de investigação do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra que avaliaram os efeitos de um inibidor da COX-2 (Celecoxibe) num modelo animal de indução do carcinoma da bexiga (Serenio e col., 2009).

Os modelos animais mais adequados para a indução da carcinogénese da bexiga deverão ser semelhantes ao tumor da bexiga nos humanos, tendo em conta as suas

propriedades histológicas e bioquímicas, bem como as características genéticas e moleculares (Xiau e col., 1999). Os ratos desenvolvem tumores de uma forma relativamente fácil e rápida em resposta a carcinogénios químicos, sendo a estrutura e função do seu tracto urinário inferior muito semelhante ao dos humanos (Oyasu, 1995; Oliveira 2005).

A administração de BBN em ratos para a indução de tumores na bexiga tem sido o modelo mais utilizado para estudar a sua fisiopatologia, bem como os efeitos terapêuticos de fármacos, devido às semelhanças histológicas com o carcinoma de células transicionais nos humanos (Fukushima e col., 1976; Sauter e col., 2004). Para além disso, o potencial carcinogénico do BBN está confinado apenas a este órgão (Oliveira e col., 2005). Neste modelo animal são predominantes os tumores uroteliais e a transformação maligna é um processo contínuo que inclui alterações displásicas e proliferativas no epitélio, bem como lesões pré-neoplásicas e malignas (Montironi e col., 2003; Grasso, 2008). Por estas razões, este modelo tem sido usado para caracterizar o processo de desenvolvimento do cancro da bexiga e avaliar a eficácia de potenciais agentes preventivos.

O modelo aplicado no presente estudo demonstrou uma percentagem de incidência tumoral que coincide com resultados obtidos em outros estudos. Hattori e col. (2006) administraram BBN (0,05%) durante 8 semanas a 21 ratos e, após 20 semanas, tal como aconteceu no nosso estudo, obtiveram uma percentagem de tumores (70%) muito semelhante à obtida neste estudo no grupo BBN (65%) (Hattori e col., 2006). Ainda noutra estudo, Gofrit e col. (2006), administraram BBN *ad libitum* durante 8 semanas, mas com um período de proliferação tumoral maior, pois prolongaram o tratamento até às 35 semanas (Gofrit e col., 2006). No entanto, os resultados por eles obtidos após as 35 semanas foram idênticos aos que nós obtivemos em apenas 20 semanas. Estas evidências sugerem que 8 semanas de tratamento com BBN e 12 semanas adicionais para o desenvolvimento tumoral são suficientes para obter uma boa incidência tumoral e lesões malignas. O nosso estudo mostrou uma média relevante do volume tumoral por rato e por tumor ( $138.5 \pm 7.5$  e  $112.5 \pm 6.4$  respectivamente), bem como hiperplasias, displasias de alto grau e tumores papilares em todos os animais do grupo BBN que manifestaram a presença de tumores (13 ratos). Além de tumores papilares, dois dos ratos apresentavam ainda tumores infiltrativos e quatro exibiam carcinomas *in situ*. Os resultados por nós obtidos no grupo BBN relativos à incidência de hiperplasias corroboram os de outros estudos. Bidinotto e col. (2006), utilizaram BBN na mesma concentração (0,05%) durante 18 semanas e, tal como aconteceu nos animais do nosso estudo, todos os ratos manifestaram uma incidência total de hiperplasias (100%). Assim, os dados obtidos em

relação à indução de BBN, permitiram-nos concluir que este modelo é válido e adequado para avaliar a eficácia de drogas preventivas do tumor da bexiga.

Para além das propriedades genéticas já caracterizadas (Wu, 2005), os mecanismos celulares e moleculares podem envolver fenómenos relacionados com a inflamação, proliferação e stresse oxidativo que continuam por desvendar. Assim, para além dos estudos histomorfológicos, foram avaliados alguns marcadores inflamatórios, de proliferação tumoral e de stresse oxidativo, com a finalidade de averiguar a influência de alguns mecanismos subjacentes ao desenvolvimento tumoral. Os resultados obtidos referentes ao stresse oxidativo no grupo BBN, e por comparação com o grupo Controlo, demonstraram que a produção de espécies reactivas de oxigénio não contribuiu de forma decisiva para o desenvolvimento tumoral, uma vez que não se verificaram grandes alterações das concentrações de MDA no soro, rim e fígado. Adicionalmente, foi avaliada a razão MDA/TAS a fim de avaliar o equilíbrio entre as concentrações de espécies oxidantes e antioxidantes e, mais uma vez, verificou-se que o grupo BBN apenas sofreu uma pequena redução, não significativa, deste parâmetro em relação ao grupo Controlo. As ROS, por serem demasiado reactivas, podem causar danos nas células sendo, por isso, consideradas potencialmente tóxicas e carcinogénicas (Nordberg e col., 2001). Apesar de não ter sido evidente a sua repercussão no desenvolvimento de tumores, não implica que seja excluída essa hipótese. Serão necessários estudos mais aprofundados do envolvimento do stresse oxidativo no desenvolvimento de tumores, através da avaliação de marcadores diferentes de mais espécies reactivas e antioxidantes, a fim de obter conclusões mais credíveis em relação à afirmação anterior.

A avaliação da influência dos parâmetros inflamatórios foi realizada pela quantificação dos níveis séricos da IL-1 $\beta$ , da IL-6 e da PCR. O aumento significativo das concentrações de IL-6 e de PCR visíveis no grupo BBN em relação ao grupo Controlo demonstraram claramente a ocorrência de fenómenos inflamatórios desencadeados pelo BBN. A proteína C reactiva é uma proteína sérica que aumenta rapidamente em resposta a fenómenos inflamatórios (Marnell e col., 2005). Este marcador inflamatório é produzido por estimulação da IL-6 e é responsável pela activação de uma cascata de sinalização do complemento que regula a inflamação. Estas evidências sugerem que, se os níveis de PCR se encontram aumentados devido à estimulação de IL-6, então o BBN teve influência sobre a IL-6, confirmando, assim, o efeito pró-inflamatório do carcinogénio, ou seja, no modelo experimental com BBN, um aumento de PCR corresponde inevitavelmente a níveis elevados de IL-6 e de outras citocinas, como IL-1 $\beta$ , na qual se verificou um ligeiro aumento (17,95  $\pm$  0,80 vs. 16,28  $\pm$  0,49 do grupo Controlo). Daqui se conclui que os

resultados obtidos relativamente aos parâmetros inflamatórios estão de acordo com o obtido em outros estudos (Hefler e col., 2008; Erlinger e col., 2005; Hattori e col., 2006), sugerindo o envolvimento de mecanismos inflamatórios no desenvolvimento/progressão tumoral.

Relativamente aos marcadores de proliferação tumoral, os resultados demonstraram um aumento, embora tendencial, dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  ( $9,91 \pm 0,25$  contra os  $9,00 \pm 0,12$  do grupo Controlo) e de TGF- $1\beta$  ( $437,27 \pm 11,4004$  vs.  $380,93 \pm 5,77$  do grupo Controlo). Estes dados, apesar de não serem significativos em termos estatísticos, a contribuição do BBN enquanto promotor de proliferação e crescimento celular para o desenvolvimento tumoral.

Em relação aos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos, este modelo animal apresentou algumas alterações relevantes, particularmente nos indicadores de trofismo cardíaco e pressão arterial, na função hepática, no perfil lipídico e no hemograma, que seguidamente se relatam.

Ao avaliar a pressão arterial e os indicadores de trofismo cardíaco no grupo BBN, verificou-se que o carcinogénio provocou alterações nestes parâmetros. As pressões arteriais sistólica, diastólica e média no grupo BBN registada no tempo intermédio e no tempo final foram superiores às do grupo Controlo. Quanto aos parâmetros indicadores de trofismo, o grupo BBN apenas viu alterada a massa cardíaca, que se manifestou com um ligeiro aumento (apenas tendencial) da massa cardíaca ( $1,441 \pm 0,041$  vs.  $1,319 \pm 0,032$  no grupo Controlo).

Ao nível hepático, foram evidentes alterações na actividade das enzimas TGO e TGP, bem como da massa do fígado e da razão entre a massa hepática e a massa corporal. No grupo BBN, a actividade da TGO mostrou-se significativamente aumentada em relação ao grupo Controlo ( $76,78 \pm 4,40$  no grupo BBN vs.  $51,57 \pm 1,09$  do grupo Controlo). Também na actividade da TGP se verificou um aumento, apesar de tendencial, em comparação com o grupo Controlo. Este aumento registado da actividade das enzimas hepáticas, de certa forma foi corroborada com o aumento significativo dos parâmetros indicadores de trofismo hepático, que poderá ser explicado pela metabolização do BBN no fígado. Os nossos dados são reforçados com outros estudos que obtiveram resultados idênticos relativamente à função hepática (Okazaki e col., 2003; Ariel e col., 2004).

Relativamente ao perfil lipídico, o grupo BBN, apesar de não ter sofrido alterações significativas ao nível do colesterol total, col.-HDL, col.-LDL e triglicéridos, apresenta variações bastante significativas dos índices aterogénicos, com uma diminuição na razão col.Total/col.-HDL e um aumento na razão col.-LDL/col. Total em comparação com o grupo Controlo.

Relativamente ao hemograma, o grupo BBN não manifesta alterações significativas tanto nos indicadores plaquetares como nos indicadores eritrocitários. Os dados obtidos são

um pouco controversos, uma vez que existem outros estudos que relatam grandes variações ao nível dos indicadores eritrocitários (Kirkali e col., 2005; Oliveira e col., 2006; Hattori e col., 2006). Assim, será importante a realização de novos estudos para detectar o verdadeiro efeito do BBN nas alterações relativas ao hemograma.

Os resultados por nós obtidos em relação às concentrações séricas de creatinina e de azoto ureico, bem no que concerne aos indicadores de trofismo renal, demonstram que o BBN parece não ter influência sobre a função renal, já que foram em muito idênticos aos resultados obtidos no grupo Controlo.

Assim, com os resultados obtidos a fim de caracterizar e validar o modelo de carcinoma da bexiga induzido por BBN em ratos Wistar, e juntamente com dados de outros investigadores, é possível afirmar que o modelo experimental escolhido é válido e adequado. Adicionalmente, podemos concluir que a dose de administração e o tempo de exposição ao BBN, bem como o período de desenvolvimento tumoral, foram apropriados para concretizar, com uma elevada percentagem de sucesso, o primeiro objectivo proposto, dado que houve proliferação tumoral em 65% dos ratos, para além do aparecimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em todos os animais do grupo BBN.

Feita a caracterização e validação do modelo experimental, fomos avaliar a eficácia da atorvastatina, em monoterapia (de baixa e alta dose) e em associação com um inibidor selectivo da COX-2 (celecoxibe), como medida preventiva do desenvolvimento do carcinoma da bexiga, que corresponde à segunda fase dos objectivos deste estudo.

As estatinas são inibidores da reductase da HMG-CoA e, por isso, são potentes supressores da biossíntese de colesterol. Mais importante ainda, sabe-se que a função das estatinas vai além da redução dos níveis de colesterol no sangue, uma vez que se tem vindo a verificar os seus efeitos noutras actividades biológicas, comprovando, assim, os seus efeitos pleiotrópicos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados nos últimos anos demonstraram que as estatinas têm propriedades anti-inflamatórias (Shönbeck e col., 2004), Forrester e col., (2007); Greenwood e col., 2007), são reguladoras da angiogénese (Weis e col., 2002), do crescimento e diferenciação celular (Demierre e col., 2005; Sassano e col., 2008), e têm actividade antioxidante (Rikitake e col., 2001; Silva e col., 2006; Girona e col., 1999), entre outras características.

Mais recentemente as estatinas têm demonstrado a capacidade de potenciar a actividade anti-neoplásica numa grande variedade de modelos experimentais de indução de

tumores. A actividade anti-tumoral das estatinas poderá resultar da sua acção sobre o ciclo celular, na indução da supressão do crescimento ou na indução da apoptose de células malignas (Chan e col., 2003). Poynter e col. (2005) demonstraram que as estatinas reduzem em 50% a incidência do cancro no cólon (Sassano e col., 2008). Adicionalmente, reduzem a incidência de cancro pancreático (Khurana e col., 2007), de cancro da próstata (Sivaprasad e col., 2006), de leucemia (Sassano e col., 2007), entre outros carcinomas.

Tendo em conta os comprovados efeitos pleiotrópicos que as estatinas apresentam, nomeadamente em tumores que se desenvolveram por mecanismos inflamatórios, de proliferação e stresse oxidativo, decidiu-se averiguar a eficácia de uma estatina na quimioprevenção do tumor da bexiga. A atorvastatina foi a estatina eleita dado que, para além de ser das estatinas mais prescritas na generalidade, poderá apresentar mais efeitos benéficos no tumor da bexiga, uma vez que também apresenta maior capacidade para produzir efeitos pleiotrópicos.

No nosso estudo, elaborou-se um protocolo preventivo num modelo experimental de indução de carcinomas da bexiga atrás caracterizado e validado. Desta forma, a indução tumoral desencadeada pelo BBN foi acompanhada pela administração simultânea de atorvastatina de alta dose (30 mg) num grupo e de baixa dose (3 mg) noutro, a fim de examinar os efeitos preventivos das diferentes doses no desenvolvimento de neoplasias.

Estudos realizados anteriormente sugeriram que a combinação de doses baixas de agentes quimiopreventivos com diferentes mecanismos de acção poderia produzir interacções sinérgicas, resultando em efeitos protectores contra a carcinogénese mais fortes do que se fossem administrados individualmente e em doses mais altas (Xiao e col., 2008). A eficácia melhorada pela combinação de fármacos pode também diminuir a dose requerida de cada um deles e, por sua vez, reduzir os efeitos secundários indesejáveis, possivelmente provocados pelas altas doses dos fármacos, quando aplicados individualmente. Em vários estudos *in vitro*, confirmados em modelos animais, foram evidentes os efeitos das estatinas em combinação com os AINES (Jalving e col., 2005). Swamy e a sua equipa de investigação (2006) avaliaram o efeito da atorvastatina e do celecoxibe no desenvolvimento de pólipos adenomatosos intestinais e observaram que a combinação destes dois fármacos suprimiu totalmente os pólipos adenomatosos no cólon e em 86% no intestino delgado, mais do que na monoterapia de cada um deles (Swamy e col., 2006).

Reddy e col. (2006) estudaram a eficácia da atorvastatina e do celecoxibe, em monoterapia (alta dose) e em combinação de ambos com doses baixas no desenvolvimento tumoral no cólon. A combinação de doses baixas de atorvastatina e de celecoxibe diminuíram

a incidência (71%) e a multiplicidade (90%) de adenocarcinomas, sendo a combinação das duas drogas mais eficaz do que no tratamento individual com doses elevadas de atorvastatina (redução de 34% na incidência e 37% para a multiplicidade) ou de celecoxibe (redução de 61% na incidência e 76% na multiplicidade). Do mesmo modo, foram estudados os efeitos destes fármacos em ratinhos com imunodeficiência combinada severa injectados com células tumorais PC-3. No grupo administrado com doses elevadas de atorvastatina, bem como no grupo tratado, igualmente, com doses altas de celecoxibe, não se verificaram efeitos significativos nos tumores alojados na próstata. Em contraste, a administração combinada de baixa dose de atorvastatina e de celecoxibe atrasou significativamente a formação de tumores, chegando mesmo a verificar-se a ausência de tumores em alguns dos ratinhos (Zheng e col., 2007).

Dado o sucesso dos resultados obtidos em estudos de outros tumores relativamente à sinergia entre a atorvastatina e o celecoxibe, seria interessante avaliar o efeito da associação destes dois fármacos na prevenção do tumor da bexiga. Como tal, foi criado um grupo de ratos ao qual, em simultâneo com a administração de BBN, foi administrada a combinação de atorvastatina e de celecoxibe, ambos de baixa dose (3 mg e 1 mg, respectivamente).

De forma a avaliar os efeitos, por si só, dos dois fármacos (atorvastatina e do celecoxibe), nos diferentes parâmetros em estudo, formaram-se dois grupos de ratos aos quais apenas foram administrados os fármacos, isoladamente, que servem de grupos controlo para os fármacos.

Na expectativa de obter resultados positivos, e que fossem ao encontro de estudos já efectuados em outros carcinomas, fomos verificar se a segunda fase do nosso objectivo (prevenção farmacológica do desenvolvimento tumoral) foi cumprido ou não.

Relativamente às observações obtidas da microscopia, nos grupos administrados apenas com atorvastatina 30 mg (grupo EST – 30 mg) e com celecoxibe 10 mg (CEL – 10 mg), não se verificou a presença de tumores, tal como no grupo Controlo. No entanto, após visualização microscópica, as bexigas do grupo EST (30 mg) apresentavam edema da parede e atrofia do urotélio. Estes dados sugerem que a atorvastatina poderá interferir de alguma forma na morfologia do urotélio quando administrada a uma dose de 30 mg.

Em relação aos restantes grupos – grupos em monoterapia de atorvastatina (30 mg e 3 mg) e grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN – os resultados obtidos em cada um deles foram surpreendentemente diferentes, como seguidamente se descreve.

Os resultados obtidos no grupo preventivo EST (30 mg) + BBN não foram os mais significativos no que diz respeito ao efeito da atorvastatina na prevenção de tumores vesicais.

Ao contrário do que se esperava, este grupo não desempenhou um papel totalmente positivo na prevenção tumoral, já que 42,9% dos ratos apresentavam tumores e todos com diferentes graus de estadiamento (um TaG1, um TaG2 e um T1G2). No entanto, o volume tumoral total deste grupo ( $8,8 \text{ mm}^3$ ) foi inferior em relação ao grupo BBN ( $720,0 \text{ mm}^3$ ). Uma vez que neste grupo se usou uma dose de atorvastatina mais elevada, seria de esperar que fosse mais efectivo na prevenção de tumores, tal como a literatura sugere (Graaf e col., 2004; Kamat e col., 2005; Hindler e col., 2006). Ainda que não tenha ocorrido um resultado totalmente positivo, foram visíveis as dimensões reduzidas dos tumores e, relativamente a lesões pré-neoplásicas, não se verificou a existência de displasias de alto grau, permitindo-nos concluir que, apesar de não prevenir com eficácia o aparecimento de tumores, a atorvastatina 30 mg atrasou o seu desenvolvimento.

Os resultados obtidos no grupo EST (3 mg) + BBN foram, inesperadamente, os melhores. Dos 8 animais deste grupo apenas um desenvolveu dois tumores na bexiga e, mesmo assim, estes eram bastante reduzidos, já que o volume tumoral total neste grupo foi de  $4,7 \text{ mm}^3$  versus os  $720 \text{ mm}^3$  no grupo BBN. A nível de lesões pré-neoplásicas, este grupo exibiu apenas três hiperplasias das quais uma se manifestou no único rato com tumor, assim como a única displasia de alto grau detectada. Quanto a displasias de baixo grau apenas se verificaram em dois ratos do grupo. Estes dados sugerem que a atorvastatina de baixa dose (3 mg) preveniu de forma eficaz o desenvolvimento de tumores, para além de ser efectiva no aparecimento de lesões pré-neoplásicas.

Os resultados obtidos no grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN relativos ao aparecimento de tumores e de lesões pré-neoplásicas, permitem-nos afirmar que este grupo manifestou um comportamento diferente ao descrito em outros estudos que revelam bons resultados na combinação de atorvastatina e de celecoxibe (Zheng e col., 2007, Swamy e col., 2006; Reddy e col. 2006). A incidência tumoral neste grupo de ratos (50%) demonstrou uma menor eficácia preventiva no desenvolvimento de tumores na bexiga do que os fármacos usados isoladamente. Além da incidência superior, constatou-se que o volume tumoral total referente a este grupo ( $9,2 \pm 7,9$ ) foi superior aos calculados para os outros grupos, demonstrando aqui, uma vez mais, que os fármacos em conjunto não foram tão eficazes na prevenção da proliferação tumoral.

A análise microscópica das bexigas revelou a existência de uma elevada percentagem de lesões pré-neoplásicas. Foram detectadas hiperplasias em 5 ratos num conjunto de 6, e displasias de alto grau em 50% das bexigas avaliadas. Em relação a displasias de baixo grau, a única que foi identificada desenvolveu-se numa das bexigas que tinha tumor. Relativamente a

lesões neoplásicas, verificou-se o aparecimento de 3 tumores, todos papilares. As evidências retiradas das observações microscópicas permitem concluir que o tratamento conjunto, apesar de menos eficaz, preveniu o desenvolvimento de tumores *in situ* (observados no grupo BBN), demonstrando assim, e ainda que mínima, alguma eficácia a este nível.

A constatação de que a atorvastatina em baixa dose (3 mg) promoveu melhores resultados na prevenção tumoral relativamente à atorvastatina de alta dose (30 mg) e à sua associação com celecoxibe 1 mg, tornou-se importante averiguar os resultados relacionados com a inflamação, proliferação celular e stresse oxidativo.

Em relação aos marcadores inflamatórios, as concentrações de PCR e de IL-6 existentes no soro foram as esperadas nos grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN, exibindo valores significativamente reduzidos, ficando aqui comprovado o papel anti-inflamatório deste fármaco em doses diferentes, corroborando estudos anteriores em outros carcinomas (Ridcker e col., 2005; Chan e col., 2004, Albert e col., 2001; Xiau e col., 2008; Arnaud e col., 2005). Contrariamente às concentrações de PCR, os níveis de IL-1 $\beta$  nos grupos EST (30 mg), EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN foram bastante superiores em comparação com o grupo BBN e o grupo Controlo, evidência que poderá ser explicada pelo facto deste marcador ser um mediador da inflamação (Wicklund e col., 2002; Vidal-Vanaclocha, 2009), que opera por vias distintas, podendo o seu crescimento ser visto como consequência de uma resposta anti-inflamatória à agressão. Este dado deverá ser confirmado em trabalhos futuros.

Quanto aos marcadores tumorais, constatou-se que ambas as doses de atorvastatina preveniram o aumento dos níveis de TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  em relação ao grupo BBN, demonstrando, assim, o seu carácter anti-proliferativo e anti-tumoral, tal como havia sido comprovado em outros estudos (Cipollone e col., 2003; Naidu e col., 2003; Wan e col., 2003; Zhang e col., 2007). De salientar que a atorvastatina de alta dose preveniu mais eficazmente o aumento de TGF-  $\beta$ .

Sendo a peroxidação lipídica um dos indicadores de stresse oxidativo, tornou-se importante a sua avaliação, através da determinação de um dos seus produtos – o MDA – enquanto que a capacidade antioxidante total (TAS) nos permite adquirir uma noção do estado das defesas antioxidantes. Assim, o cálculo da razão MDA/TAS fornece resultados mais claros em relação ao equilíbrio oxidativo.

Relativamente às concentrações de MDA no fígado dos animais de todos os grupos administrados com atorvastatina e os do grupo CEL (10 mg), verificou-se que são inferiores às do grupo BBN, ficando aqui demonstrado o papel antioxidante da atorvastatina neste órgão.

No entanto, o efeito antioxidante da atorvastatina não se verificou nos rins, dado que os níveis de MDA neste órgão nos grupos EST (30 mg), EST (30 mg) + BBN, EST (3 mg) + BBN e EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN são superiores ao grupo BBN e ao grupo Controlo. Quanto à concentração de MDA no soro, verificou-se um ligeiro aumento do MDA nos grupos EST (30 mg), EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN. No entanto, a atorvastatina desencadeou efeitos benéficos contra o stresse oxidativo, dado que, pela avaliação da razão MDA/TAS, constata-se que estes grupos exibiram valores significativamente inferiores em comparação com os dos grupos Controlo e BBN. Este dado sugere que a atorvastatina promoveu um aumento da capacidade antioxidante para compensar o aumento das espécies reactivas derivadas do metabolismo do carcinogénio, desempenhando, assim, a sua função antioxidante. Estes resultados são consistentes com outros obtidos em estudos anteriores, que demonstraram um efeito antioxidante da atorvastatina (Singh e col., 2008; Tsimikas e col., 2004; Rikitake e col., 2001; Girona e col., 1999; Wagner e col., 2000; Wassmann e col., 2001).

Analisados os parâmetros relacionados com os mecanismos inflamatórios, de proliferação celular e de stresse oxidativo, continua por elucidar o facto do grupo administrado com atorvastatina de baixa dose ter reproduzido melhores resultados na prevenção tumoral relativamente ao grupo EST (30 mg) + BBN. Uma possível explicação deste facto poderia ser a hipotética toxicidade da atorvastatina em alta dose (30 mg) impeditiva de um efeito benéfico na prevenção de tumores. Para tal, foram analisados parâmetros bioquímicos, a fim de verificar se a dose de atorvastatina 30 mg já seria uma dose demasiado elevada ou não.

Relativamente aos parâmetros da função renal analisados (creatinina e azoto ureico), não se verificaram quaisquer alterações significativas nos grupos administrados com atorvastatina. Estes resultados são consistentes com outros estudos efectuados que demonstraram que as estatinas podem proteger o rim através da redução dos níveis lipídicos ou através dos efeitos anti-inflamatórios e vasculares independentes dos lípidos (Singh e col., 2008; Athiros e col., 2004; Agarwal, 2007). Fried e col. (2001), demonstraram numa meta-análise que o uso de estatinas se associou a um efeito protector na protecção da disfunção renal (Fried e col., 2001). Outro estudo com a atorvastatina avaliou a progressão da doença renal. Após um ano, o tratamento com atorvastatina foi associado com redução na proteinúria e estabilização da função renal (Bianchi e col., 2003). Ainda noutro estudo, que envolveu doentes diabéticos em programa de hemodiálise comparou a utilização de atorvastatina 20 mg com placebo durante 4 anos, não se tendo verificado diferenças significativas entre os grupos durante este período (Warner e col., 2005).

Dados obtidos em estudos anteriores comprovaram que os principais efeitos secundários da atorvastatina eram gerar hepatotoxicidade e miotoxicidade (Maron e col., 2000; Chan e col., 2003; Farmer e col., 2000; Waters, 2005; Tolman, 2002; Clarke e col., 2006; Sleijfer e col., 2005; Sniderman, 2004). Segundo estes autores, a administração de atorvastatina provocava um aumento da actividade (dependente da dose de administração de atorvastatina) das enzimas hepáticas (TGO e TGP), bem como da creatina cinase (CK).

Por estas razões, foram importantes as avaliações das actividades destas enzimas no presente estudo. Relativamente à TGO, verificaram-se alterações controversas entre o grupo EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN. Enquanto se registou uma diminuição significativa ( $P < 0,05$  vs. BBN) no grupo EST (30 mg) + BBN, no grupo administrado com atorvastatina de baixa dose verificou-se um aumento bastante significativo ( $P < 0,001$  vs. BBN). A actividade da TGP no grupo EST (3 mg) + BBN manifestou-se de forma significativamente aumentada ( $P < 0,001$  vs. BBN), ficando aqui evidenciada a toxicidade causada pela dose de 3 mg de atorvastatina. No entanto, o trofismo hepático nestes grupos é contraditório, uma vez que as massas do fígado e a razão da massa hepática/massa corporal foram reduzidas.

Os resultados obtidos no que concerne à actividade da creatina cinase no presente estudo assumem um comportamento idêntico ao descrito na literatura, sendo notável o aumento da actividade desta enzima no soro dos animais administrados com atorvastatina em ambas as doses. Uma vez mais, e contrariamente ao esperado, é a dose mais baixa que promove um aumento mais expressivo.

Dado o carácter antilipidémico da atorvastatina, seriam de esperar variações mais significativas no perfil lipídico, especialmente nas concentrações séricas de colesterol e de col.-LDL. Contudo, os resultados obtidos são referentes ao tempo final e a atorvastatina deixou de ser administrada a partir da semana 8 do estudo e, por isso, os dados obtidos no final do estudo não reflectem as alterações causadas por este fármaco. Ainda assim, foi possível verificar que atorvastatina em alta dose conseguiu prevenir por mais tempo o aumento dos parâmetros do perfil lipídico nos ratos que ingeriram BBN.

Em suma, os dados referentes às avaliações das funções renal e hepática, do perfil lipídico e da actividade da creatina cinase desmentem a possível toxicidade da atorvastatina de 30 mg como causa de um menor efeito na prevenção do tumor *versus* dose baixa de atorvastatina. Mais ainda, as evidências demonstram que a atorvastatina 3 mg já poderá ser uma dose elevada. Assim, para uma melhor interpretação dos efeitos preventivos deste fármaco no tumor da bexiga, serão necessários estudos posteriores, onde sejam optimizadas as doses de administração de atorvastatina, preferencialmente uma dose inferior a 3 mg e

outra que esteja entre as doses utilizadas neste estudo (3 mg e 30 mg) ou utilizar as mesmas doses, mas apenas 2 ou 3 vezes por semana.

Além dos mecanismos aqui estudados, existem outros pelos quais as estatinas podem desempenhar as suas funções anti-tumorais. Mecanismos esses que estão relacionados com a inibição da proliferação e da angiogénese e indução de apoptose e cujos efeitos foram estudados anteriormente numa grande diversidade de tumores (Katano e col., 2004; Otsuki e col., 2004; Shibata e col., 2004; Chan e col., 2003; Li e col., 2003; van de Donk e col., 2002; Furst e col., 2002; Wong e col., 2002; Denoyelle e col., 2001; Feleszko e col., 2000; Shachaf e col., 2007; Gbelcová e col., 2008; Hindler e col., 2006; Campo e col., 2007; Lu e col., 2008; Sleijfer e col., 2005). Assim, torna-se importante a realização de novos estudos no futuro para complementarem o agora realizado, especialmente de carácter celular e molecular, com o objectivo de compreender os mecanismos intracelulares implicados nos efeitos benéficos por parte da atorvastatina na prevenção tumoral e, mais ainda, explicar o comportamento mais eficaz na dose mais baixa.

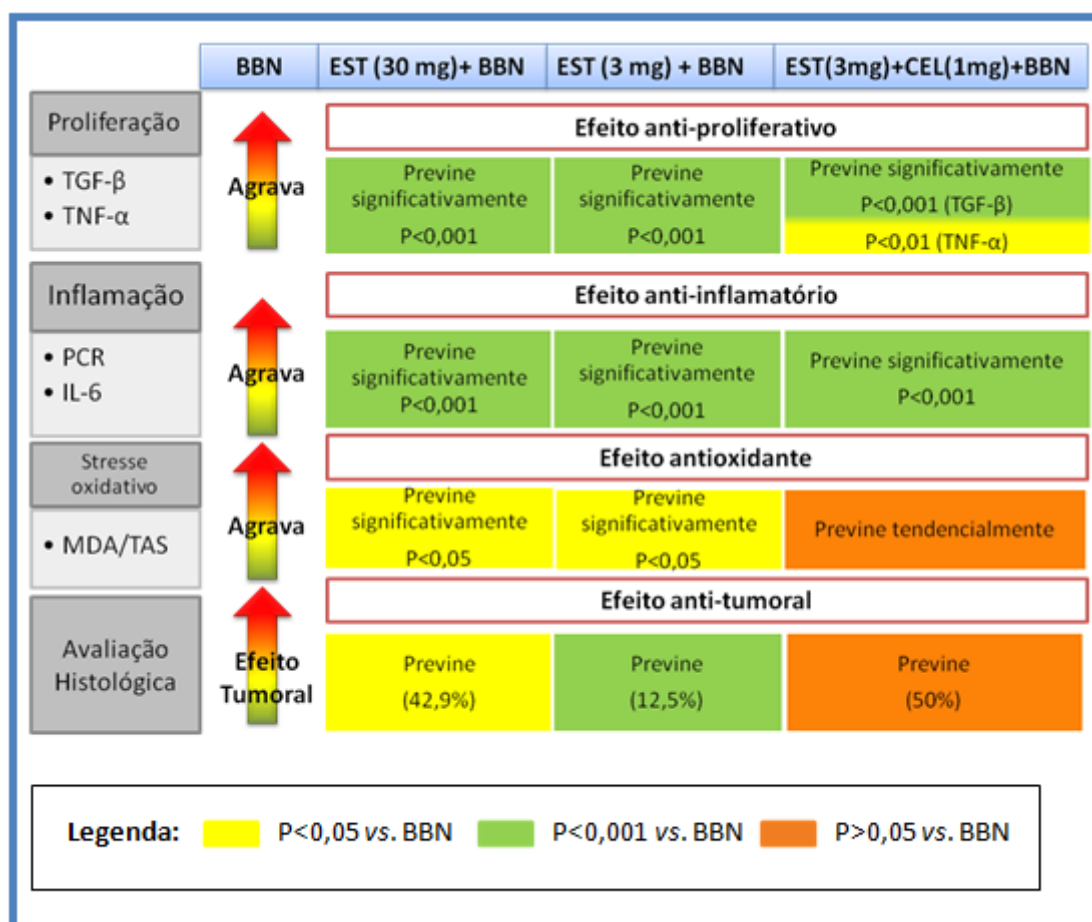
Tendo em conta os efeitos pleiotrópicos da atorvastatina e a propriedade anti-inflamatória do celecoxibe, bem como os bons resultados obtidos da associação entre eles na prevenção de outros tumores, seria de esperar um efeito positivo na prevenção de tumores na bexiga. No entanto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a terapia sinérgica com a atorvastatina e celecoxibe parece não ser melhor do que os efeitos em monoterapia. Em todos os parâmetros avaliados se obtiveram melhores resultados no grupo EST (3 mg) + BBN do que no grupo EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN. As contribuições da atorvastatina e do celecoxibe em monoterapia são mais efectivas do que a sua soma, possivelmente devido a mecanismos que se sobrepõem negativamente.

Na Figura 48 estão representados de forma resumida as principais alterações benéficas registadas em todos os grupos em estudo comparativamente com o grupo BBN.

Os resultados do nosso estudo revelaram a existência de efeitos inflamatórios, proliferativos e oxidativos associados ao crescimento tumoral induzido por BBN, que validam este modelo como um bom instrumento para avaliação deste carcinoma.

Por outro lado, o grupo EST (3 mg) + BBN revelou a já descrita capacidade anti-proliferativa, antioxidante e anti-inflamatória deste fármaco, comprovada com o sucesso na prevenção de tumores. Contudo, a dose de 3 mg/Kg/dia de atorvastatina mostrou alguma toxicidade, o que significa que esta dosagem poderá já ser elevada e, por isso, serão necessários mais estudos, na tentativa de encontrar uma dose menos tóxica, inferior a 3 mg/Kg/dia, mas que tenha acção anti-tumoral idêntica ou memo superior.

Adicionalmente, os resultados do grupo EST (30 mg) + BBN demonstram que esta dose é menos efectiva que a dose mais baixa na prevenção tumoral. No entanto, continuam salientes o papel anti-inflamatório, anti-proliferativo e anti-tumoral do fármaco.



**Figura 48** – Diagrama das principais alterações proliferativas, inflamatórias, oxidativas e histológicas registadas para os diferentes grupos em estudo.

Em relação ao grupo sinérgico EST (3 mg) + CEL (1 mg) + BBN, verificou-se que estes dois fármacos parecem ser mais eficazes na terapêutica preventiva do carcinoma vesical quando administrados em monoterapia do que em combinação. A sua menor eficácia poderá ser explicada pelo facto de serem menos evidentes as acções anti-proliferativas e anti-inflamatórias em relação ao grupo EST (30 mg) + BBN e de apenas se verificarem efeitos tendencialmente antioxidantes ou possivelmente existem mecanismos que, em vez de potenciarem os efeitos benéficos dos dois fármacos na prevenção do desenvolvimento tumoral, tornam-nos menos eficazes.



A decorative graphic consisting of two intersecting gray bars. A vertical bar is on the right side, and a horizontal bar is on the bottom side. They intersect at a dark gray rectangular box containing the text 'CONCLUSÕES' in white, serif, uppercase letters.

# CONCLUSÕES



---

As conclusões principais são fundamentadas com base nos resultados obtidos nas duas fases que constituíram este trabalho:

1. Caracterização e validação do modelo de indução do tumor da bexiga em rato.
2. Avaliação da eficácia da atorvastatina (em monoterapia ou em associação com um inibidor selectivo de COX-2) na presença do desenvolvimento tumoral, através de parâmetros histomorfológicos e bioquímicos.

Relativamente à caracterização e validação do modelo, conclui-se que:

- i. O modelo experimental aplicado, desde a escolha do BBN como agente carcinogénio (com a concentração de 0,05%), ao tempo de exposição (8 semanas de ingestão com 12 semanas adicionais para a indução tumoral), foi adequado para a indução de carcinoma da bexiga, com 65% dos ratos a apresentar tumores, 1,2 tumores por rato e um volume tumoral médio de 720 mm<sup>3</sup>.
- ii. A avaliação qualitativa das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas mostrou a presença de hiperplasias, displasias de alto e baixo grau, tumores papilares e infiltrativos, e ainda carcinomas *in situ*.
- iii. Os resultados referentes aos marcadores tumorais e inflamatórios complementam os estudos histomorfológicos, verificando-se um aumento, apesar de tendencial, de TGF- $\beta$  e de TNF- $\alpha$ . Relativamente aos marcadores inflamatórios, registou-se um aumento significativo da IL-6 e de PCR.

Perante os resultados obtidos, conclui-se que a inflamação e a proliferação celular são os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de tumores na bexiga.

Em relação à eficácia do fármaco, concluímos que:

- iv. Ambas as doses de atorvastatina (3 mg e 30 mg) reduzem o desenvolvimento tumoral, mas a dose que se mostrou mais eficaz foi a de 3 mg, uma vez que no grupo EST (3 mg) + BBN a percentagem de tumores registada foi apenas de 12,5%, equivalente a um único rato, contra os 65% do grupo BBN. Esse rato

apresentava 2 tumores com um volume tumoral total de 4,7 mm<sup>3</sup> (vs. 720 mm<sup>3</sup> do grupo BBN).

A associação da atorvastatina ao celecoxibe não potenciou o efeito benéfico que cada um dos fármacos demonstra isoladamente, uma vez que se verificou em 50 % dos ratos a presença de 3 tumores e um volume tumoral total de 27,6 mm<sup>3</sup>.

- v. A avaliação histomorfológica das lesões neoplásicas e pré-neoplásicas no grupo EST (3 mg) + BBN confirma os dados anteriores, uma vez que apenas foram detectadas, além dos 2 tumores papilares, 2 displasias de baixo grau, 3 hiperplasias, das quais uma delas se manifestou no rato com tumor, bem como a única displasia de alto grau identificada. Com efeito, o tipo de lesões encontradas são notoriamente mais moderadas que no grupo BBN, especialmente para o grupo EST (3 mg) + BBN.
  
- vi. Além dos estudos histomorfológicos, os parâmetros bioquímicos relacionados com a inflamação, proliferação e stresse oxidativo salientam o efeito preventivo da atorvastatina. Relativamente aos marcadores tumorais nos grupos administrados com atorvastatina, os valores de TGF- $\beta$  foram os mais concordantes com a acção do fármaco na prevenção neoplásica, apresentando-se significativamente reduzidos nestes grupos. Em relação aos marcadores inflamatórios, a redução acentuada dos níveis de PCR comprova o papel anti-inflamatório desempenhado pela atorvastatina. Os dados relativos ao equilíbrio oxidativo mostram uma redução significativa da razão MDA/TAS nos grupos EST (30 mg) + BBN e EST (3 mg) + BBN, demonstrando o papel antioxidante deste fármaco. Estas evidências demonstram que parecem estar envolvidos mecanismos anti-proliferativos, antioxidantes e anti-inflamatórios na redução do crescimento tumoral por parte da atorvastatina.

Em suma, as estatinas, em particular a atorvastatina, é um fármaco com potencial para a terapêutica preventiva do carcinoma da bexiga, se os resultados benéficos agora obtidos, bem como as dúvidas levantadas, forem cabalmente confirmados em fases posteriores do trabalho.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- **Agarwal R.** Effect of statins on renal function. *Mayo Clin Proc*, 2007; 82(11):1381-1390.
- **Albert MA,** Danielson E, Rifai N, Ridker PM, PRINCE Investigators. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA*, 2001; 286(1):64-70.
- **Algaba F,** Trias I. *Morfobiología de las neoplasias superficiales de la vejiga urinaria*. In Vicent J, Chechile G, Salvador J. *Tumores vesicales superficiales*. Edita Acción Médica, SA. Madrid, 2000.
- **Ariel I,** Ayesh S, et al. Gene expression in the bladder carcinoma rat model. *Molecular carcinogenesis*, 2004; 41:69-76.
- **Armitage J.** The safety in clinical practice. *Lancet*, 2007; 370:1781-1790
- **Arnaud C,** Burger Fabienne, Steffens S, et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: New evidences for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25:1231-1236.
- **Athyros VG,** Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, et al. The effect of statins versus untreated dyslipidaemia on renal function in patients with coronary heart disease. *J Clin Path*, 2004; 57(7):728-734.
- **Benfati M,** Magagnotti C, Bonat M, Fanelli R, Airoidi L. Pharmacokinetic profile and metabolism of N-nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amine in rats. *Cancer Research*, 1988; 48: 3666-3669
- **Bianchi S,** Bigazzi R, Caiazza A, Campese VM. A controlled, prospective study of the effects of atorvastatin on proteinuria and progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 2003; 41:565-570.
- **Bidinotto LT,** Spinardi-Barbisan ALT, Rocha NS, Salvadori DMF, Barbisan LF: Effects of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on DNA damage and development of urothelial tumours in a mouse bladder carcinogenesis model. *Environ Mol Mutagen*, 2006; 47:624-30
- **Billerey C,** Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent mutations in papillary non-invasive bladder

- (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1955-1999
- **Bostwick DG**, Mikuz G. Urothelial papillary (exophytic) neoplasms. *Virchows Arch* 2002; 441: 109-116
  - **Buhaescu I**, Izzedine H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem*, 2007; 40: 575-584.
  - **Campo VL**, Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Química Nova*, 2007; 30(2):425-430.
  - **Chan KKW**, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Can Res*, 2003; 9:10-19.
  - **Chan KY**, Boucher ES, Gandhi PJ, Silva MA. HMG-CoA reductase inhibitors for lowering elevated levels of C-reactive protein. *Am J Health Syst Pharm*, 2004; 61(16):1676-1681.
  - **Cipollone F**, Fazia M, Iezzi A et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans.
  - **Clarke AT**, Mills PR. Atorvastatin associated liver disease. *Digestive and Liver Disease*, 2006; 38:772-777.
  - **Colombel M**, Soloway M, et al. Epidemiology, Staging, Grading, and risk stratification of bladder cancer. *Eur Urol*; 2008; 7:618-626.
  - **Corsini A**, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999; 84: 413-428.
  - **Costa LV**, Wroclawski ML, Machado MT, Pompeo AL, Wroclawski ER. Factores de risco não ocupacionais para o cancro da bexiga. *Einstein*. 2008; 6(4): 507-510.
  - **Crallan RA**, Georgopoulos NT, Sothgate J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2005; 27 (3): 374-381.
  - **Dalton TP**, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999; 39:67-101.
  - **Demierre MF**, Higgins PDR, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nature*, 2005; 5: 930-942.
  - **Denoyelle C**, Vasse M, Korner M, et al. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the

- signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*, 2001; 22:1139-1148.
- **Dulak J**, Józkwicz. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005; 5(8): 579-594.
  - **Duque JL**, Loughlin KR. An overview of the treatment of superficial bladder cancer. Intravesical chemotherapy. *Urol Clin North Am*. 2000; 27: 125-135
  - **Dutta SC**, Smith JA, Shappell SB, Coffey CS, Changt SS, Cookson MS. Clinical understaging of high risk nonmuscle invasive urothelial carcinoma treated with radical cystectomy. *J Urol*. 2001; 166, 490-493
  - **Eaton JW**, Qian M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32(9):833-840.
  - **Epstein JI**, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Bladder Consensus conference Committee. Am J Surg Pathol*. 1998. 22(12):1435-1448.
  - **Erlinger TP**, Platz EA, Rifai N, et al. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA*, 2004; 291(5):585-590
  - **Evans C**, Debruyne F, Payne H, Solsona E, Teillac P, Tubaro A. Bladder cancer: management and future directions. *Eur Urol Suppl* 2007; 6:365-73.
  - **Fadi-Elmula I**, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chrom Cancer*. 2000; 29: 256-265
  - **Federico A**, Morgillo F, Tuccillo C, et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 121:2381-2386
  - **Feleszko W**, Mlynarczuk I, Balkowiec-Iskra EZ, et al. Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clin Cancer Res*, 2000; 6:2044-2052.
  - **Ferlay J**, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18 (3): 581-92

- **Ferlay J**, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase, Nr. 5, version 2.0. IARC Press. Lyon.
- **Finkel T**, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
- **Forrester JS**, Libby P. The inflammation hypothesis and its potential relevance to statin therapy. *Am J Cardiol*, 2007; 99:732-738.
- **Fried LF**, Orchard TJ, Kasiske BL. Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int*, 2001; 59:260-269.
- **Fukushima S**, Hirose M, et al. Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-n-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 1976; 67: 81-90.
- **Furst J**, Haller T, Chwatal S, et al. Simvastatin inhibits malignant transformation following expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, 2002; 12:19-30.
- **Gbelcová H**, Leníček M, Zelenka J, Knejzlik Z, et al. Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2008; 122:1214-1221
- **Gilligan TD**, Steele GS, Zietman AL, Kantoff, PW. Bladder câncer. In Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast Jr., R. C., Gansler, T. S., Holland, J.F. & Frei, E., *Cancer Medicine*. Sixth edition, 2003. B. C. Decker Inc. Hamilton.
- **Girona J**, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol*, 1999; 83: 846-851.
- **Gofrit ON**, Birman T, Ayesh S, Ohana P, Hochberg A: Chemically induced bladder cancer - A sonographic and morphologic description. *Urology*, 2006; 68:231-35.
- **Graaf MR**, Beiderbeck AB, Egberts AC, Richel DJ, Guchelaar HJ. The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol*, 2004; 22:2388-2394.
- **Graff MR**, Richel DJ, van Noorden CJF, Guchelaar Henk-Jan. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treatment reviews*, 2004; 30: 609-641.
- **Grasso M**. Bladder cancer: a major public health issue. *Eur Urol Suppl* 2008; 7: 510-515

- **Greenwood J**, Mason JC. Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol*, 2007; 28:88-98.
- **Hamelin BA**, Turgeon J. Hydrophilicity/ lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMGCoA reductase inhibitors. *TIPS* 1998; 19: 26-37.
- **Hattori K**, Iida K, Joraku A, Tsukamoto S, Akaza H, Oyasu R: Chemopreventive effects of cyclooxygenase-2 inhibitor and epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor on rat urinary bladder carcinogenesis. *BJU Int*, 2006; 97:640–3.
- **Hefler LA**, Concin N, et al. Serum C-reactive protein as independent prognostic variable in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(3): 710-714.
- **Herr HW**. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15- year outcome. *J Urol*. 2000; 163: 60-62
- **Hindler K**, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. The role of statins in cancer therapy. *The Oncologist*, 2006; 11:306-315.
- **Horton JD**. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*, 2002; 30(Pt 6):1091-1095
- **Istvan E**, et al. Structural Mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 2001; 292: 1160-1164
- **Istvan E**. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3- dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*, 2003; 4: 3-8.
- **Jalving M**, Koornstra JJ, De Jong S, De Vries EG, Kleibeuker JH. Review article: the potential of combinational regimen with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005; 21:321-339.
- **Jankovic S**, Radosavljevic V. Risk factors for bladder cancer. *Tumori*, 2007; 93(1): 4-12
- **Johansson SL**, Cohen SM. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol*, 1997; 13: 291-298.
- **Jones TD**, Cheng L. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential: evolving terminology and concepts. *J Urol*. 2006; 175 (6): 1995-2003.
- **Jung I**, Messing E. Molecular Mechanisms and Pathways in Bladder cancer development and

- progression. *Cancer Control*. 2000; 7(4): 325-334.
- **Junqueira LC**, Carneiro J. *Histologia Básica*. Décima edição, 2004. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
  - **Kamat AM**, Nelkin GM. Atorvastatin: a potential chemopreventive agent in bladder cancer. *Urology*, 2005; 1209-1212.
  - **Kanayama H**. Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest*. 2001; 48:31-43
  - **Kanayama, H**. (2001). Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest*, 2001; 48: 31-43.
  - **Katano H**, Pesnicak L, Cohen JI. Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr vírus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101:4960-4965.
  - **Khurana V**, Sheth A, Caldito G, Barkin JS. Statins reduce the risk of pancreatic cancer in humans: a case-control study of half a million veterans. *Pancreas*, 2007; 34:260-265.
  - **Kirkali Z**, Chan Theresa, Manoharan M, Algaba F, Busch C, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging, grading and diagnosis. *Urology*, 2005; 66 (6A): 4-34. (Kirkali, 2005)
  - **Knowles MA**. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 27 (3): 361- 373.
  - **Knowles MA**. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 2005; 25(3): 361-373
  - **Kufe DW**, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine*. 2003, Sixth edition. B. C. Decker Inc. Hamilton.
  - **Lascombe I**, Clairotte A, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(9): 2780-2787.
  - **Law M**, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol*, 2006; 97 (8A):52C-60C.
  - **Lee R**, Droller, MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am*, 2000; 27, 1-13.
  - Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, et al. Prevention of bladder cancer: a review. *Eur Urol* 2006; 49:226-34.
  - **Li HY**, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Cholesterol-modulating agents kill acute

- myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood*, 2003; 101:3628-3634
- **Lindgren D**, Liedberg F, Andersson A, Chebil G, Gudjonsson S, Borg A, Mansson W, Fioretos T, Hoglund M. Molecular characterization of early bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*. 2006; 25(18): 2685-2696.
  - **Lokeshwar**, VB; Selzer MG. Urinary bladder tumor markers. *J Urol Onc*. 2006; 24: 528-537.
  - **Lu G**, Xiau H, et al. Synergistic inhibition of lung tumorigenesis by a combination of green tea polyphenols and atorvastatin. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (15): 4981-4988.
  - **MacLennan GT**, Kirkali Z, Cheng L; Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *European Urology* 2007; 51: 889-898
  - **Marnell L**, Mold C, Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammations. *Clin Immun*, 2005; 117:104-111.
  - **McKenney JK**, Amin MB, Young RH. Urothelial (Transitional Cell Papilloma of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 26 cases. *Mod Pathol* 2003; 16(7): 623-629.
  - **Meagher EA**, Fitzgerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28(12):1745-1750.
  - Mhaweche-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(6): 1205-1216
  - **Miyamoto H**, Yang Zhiming, Chen Yei-Tsung, Ishiguro H, Uemura Hiroji, et al. Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. *J Natl Cancer Inst*, 2007; 99: 558-568.
  - **Miyao N**, Tsai YC, Lerner SP, Olumi AF, Spruck CH, Gonzalez-Zulueta M, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA. Role of chromosome 9 in human bladder cancer. Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res*. 1993; 53: 4066-4070.
  - **Montironi R**, Mazzucchelli R, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L. Morphological diagnosis of urothelial neoplasms. *J. Clin. Pathol*. 2008; 61: 3-10
  - **Montironi R**, Mazzucchelli R. Preneoplastic Lesions and

- Conditions of the urinary bladder. EAU Update Series 2003; 1:53-63.
- **Moyad MA**, Merrick GS. Statins and cholesterol lowering after a cancer diagnosis: Why not?. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2005; 23: 49-55
  - **Naidu BV**, Woolley SM, Farivar AS et al, Simvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003; 126:482-489.
  - **Nordberg J**, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med, 2001; 31(11): 1287-1312.
  - **Obermann EC**, Junker K, Stoehr R, Dietmaier W, Zaak D, Schubert J, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. J Pathol. 2003; 199: 50- 57
  - **Okazaki K**, Umemura T, et al. Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzylisothiocyanate and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats after initiation. Cancer Sci, 2003; 94(11):948-952.
  - **Okumadu C**, Dutta A. p21-dependent inhibition of colon cancer cell growth by mevastatin is independent of inhibition of G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases. J Biol Chem, 2003; 278: 43586-43594
  - **Oliveira PA**, Colaço A, de la Cruz LF, Lopes C. Experimental bladder carcinogenesis- Rodent models. Exp Oncol, 2006; 28 (1): 2-11
  - **Oliveira PA**, Palmeira C, Lourenço L, Lopes C. Evaluation of DNA content in preneoplastic changes of mouse urinary bladder induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. J Exp Clin Cancer Res, 2005; 24:207-214.
  - **Ornitz DM**, Itoh N. Fibroblast growth factors. Genome Biol. 2001; REVIEWS 3005.1- 3005.12
  - **Osawa S**, Terashima Y, Kimura G, Akimoto M. Antitumor effects of the angiogenesis inhibitor AGM-1470 on rat urinary bladder tumours induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. BJU International, 1999; 83: 123-128.
  - **Otsuki T**, Sakaguchi H, Hatayama T, et al. Effects of an HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, on human myeloma cells. Oncol Rep, 2004; 11:1053-1058.

- **Oyasu R.** Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33: 747-55
- **Pasin E,** Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Path FRC, Stein JP. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Reviews in Urology* 2008; 10 (1): 31-43
- **Pfizer Ireland Pharm.** AIM do Zarator®. Dublin, Ireland, 2002; pp. 1-21.
- **Pisani P,** Bray F, Parkin DM. Estimates of world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult prevalence. *Int J Cancer* 2002; 97:72-81.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B, et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004; 49(3): 179-186.
- **Poynter JN,** Gruber SB, Higgins PD, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2005; 352:2184-2192.
- **Golan, D,** Tashjian AHJ, Armstrong EJ, Armstrong AW. Principles of Pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy. Second Edition, 2007; Lippincott Williams & Wilkins. pp. 432-434.
- **Rao S,** Porter DC, Chen X, et al. Lovastatin-mediated G<sub>1</sub> arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 7797-7802.
- **Reddy BS,** Wang CX, Kong AN, Khor TO, Zheng X, Steele VE, Kopelovich L, Rao CV. Prevention of azoxymethane-induced colon cancer by combination of low doses of atorvastatin, aspirin, and celecoxib in F344 rats. *Cancer Res*, 2006; 66:4542-4546.
- **Redman BG,** Kawachi M, Hurwitz M. (2005). Urothelial and kidney cancer. In Pazdur, R., Coia, L. R., Hoskins, W. J. & Wagman, L. D., Cancer management- a multidisciplinary approach. Ninth edition. CMP Healthcare Media. New York.
- **Richie JP,** Bono A, Denis L J, Jewett MAS, et al. Tumor, nodes, metastasis (TNM) classification of bladder cancer. *Urologic Oncology*, 1998; 4: 90-93.
- **Ridker PM,** Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH et al. Pravastatin or atorvastatin evaluation and infection-therapy – Thrombolysis in myocardial infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22)

- investigators – C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*, 2005; 352:20-28.
- **Ries LAG**, Eisner MP, Kosary CL., et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000, Bethesda, MD; National Cancer Institute, 2003.
  - **Rikitake Y**, Kawashima S, Takeshita S, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 2001; 154:87-96.
  - **Sakai I**, Miyake H, Harada K, Hara I, Inoue TA, Fujisawa M. Analysis of factors predicting intravesical recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder without concomitant carcinoma *in situ*. *Int J Urol*. 2006; 13: 1389-1392
  - **Sangar VK**, Ragavan N, Matanheleia SS, Watson MW, Blades RA. The economic consequences of prostate and bladder cancer in UK. *BJU Int* 2005; 95:59-63.
  - **Santos L**, Amaro T, et al. Alterações Moleculares do Carcinoma Papilar e Transicional da Bexiga. *Uro*, 2001; 6(1): 11-16.
  - **Sassano A**, Katsoulidis E, Antico G, et al. Suppressive effects of statins on acute promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res*, 2007; 67:4524-4532.
  - **Sassano A**, Platanius LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Letters*, 2008; 260:11-19.
  - **Sauter G**, Algaba F, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I (eds) WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, 2004: 29-34.
  - **Schachter M**. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statin: an update. *Fund & Clin Pharmacol*, 2004; 117-125.
  - **Schönbeck U**, Libby P. Inflammation, immunity and HMG-CoA inhibitors: statins as anti-inflammatory agents?. *Circulation*, 2004; 109:18-26.
  - **Serdar A**, Turhan C, et al. The prognostic importance of e-cadherin and p53 gene expression in transitional bladder carcinoma patients. *Int Urol Nephrol*, 2005; 37(3):485-492.

- **Sereno J**, Parada B, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition promotes efficient chemoprevention on bladder cancer in a rat model.
- **Shachaf CM**, Perez OD, Youssef S, Fan AC, Elchuri S, et al. Inhibition of HMGcoA reductase by atorvastatin prevents and reverses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood*, 2007; 110:2674-2684.
- **Shariat SF**, Tokunaga H, Zhou J, Ayala GE, Benedict WF, Lerner SP. p53, p21, pRb and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 1014-1024
- **Shibata MA**, Ito Y, Morimoto J, Otsuki Y. Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. *Carcinogenesis*, 2004;25:1887-1898.
- **Silva JM**, Saldanha C. Efeitos hipolipemiantes e pleiotrópicos das estatinas. *SPHM*, 2006; 21(2):16-26.
- **Singh V**, Deedwania P. Expanding roles for atorvastatin. *Drugs of Today*, 2008; 44(6):455-471.
- **Sivaprasad U**, Abbas T, Dutta A. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2006; 5:2310-2316.
- **Sleijfer S**, van der Gaast A, et al. The potential of statins as part of anti-cancer treatment. *Eur J Cancer*, 2005; 41:516-522.
- **Sniderman AD**. Is there value in liver function test and creatine phosphokinase monitoring with statin use? *Am J Cardiol*, 2004; 94(9A):30F-34F.
- **Spiess PE**, Czerniak B. Dual-track pathway in bladder carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130: 844-852.
- **Stoehr R**, Zietz S, Burger M, Filbeck T, Denzinger S, Obermann EC, Hammerschmied C, Wieland WF, Knuechel R, Hartmann A. Deletions of chromosomes 9 and 8p in histologically normal urothelium of patients with bladder cancer. *Eur Urol*. 2005; 47: 58-63.
- **Swamy MV**, Patlolla JM, Steele VE, Kopelovich L, Reddy BS, Rao CV. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by low doses of atorvastatin and celecoxib given individually and in combination to APCM in mice. *Cancer Res*, 2006; 66:7370-7377.

- **Sylvester RJ**, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49: 466-477
- **Lerner SP**, Schoenberg MP, Sternberg CN. Textbook of bladder cancer. First Edition, 2006; Taylor and Francis; pp. 230.
- **Tolman KG**. The liver and lovastatin. *Am J Cardiol*, 2002; 89:1374-1380.
- **Tsimikas S**, Witztum JL, Miller ER, Sasiela WJ, Szarek M, Olsson AG, Schwartz GG. Myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (MIRACL) study investigators. High-dose atorvastatine reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial. *Circulation*, 2004; 110:1406-1412,
- **Van de Donk NW**, Kamphuis MM, Lokhorst HM, Bloem AC. The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia*, 2002; 16:1362-1371.
- **Van Tilborg AAG**; Bangma CH; Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *Int J Urol*. 2009; 16: 23-30
- **Vidal-Vanaclocha F**, Inflammation in the molecular pathogenesis of cancer and atherosclerosis. *Reum Clin*, 2009; 5(1):40-43.
- **Vihinen P**, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2002; 99: 157-166
- **Wächterhäuser A**, Akoglu B, Stein J. HMG-CoA reductase inhibitor mevastatin enhances the growth inhibitory effect of butyrate in the colorectal carcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 1061-1067.
- **Wagner AH**, Köhler T, Rüchschloss U, et al. Improvement of nitric oxidedependent vasodilation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Atherosclerosis Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:61-69.
- **Wan MX**, Schramm R, Klintman D et al. A statin-based inhibitor of lymphocyte function antigen-1 protects against ischemia/reperfusion- induced

- leukocyte adhesion in the colon. *Br J Pharmacol*, 2003; 140:395-401.
- **Warner C**, et al. Atorvastatine in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*, 2005; 353:238-248.
  - **Wassmann S**, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlbory K, Linz W, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension*, 2001; 37:1450-1457.
  - **Waters D**. Safety of high-dose of atorvastatin therapy. *Am J Cardiol*, 2005; 96(5A):69F-75F.
  - **Weber LW**, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol*, 2004; 10(21):3081-3087
  - **Weis M**, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effect on angiogenesis. *Circulation*, 2002; 105: 739-745
  - **Wiklund O**, Mattsson-Hulton L, Hurt-Camejo E, Oscarsson J. Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *J Int Med*, 2002; 251(4):338-347.
  - **Wong WW**, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*, 2002; 16:508-519.
  - **Wu J**, Wong WWL, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf-MEK-ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2004; 64: 6461-6468.
  - **Wu XR**. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*, 2005; 5: 713-725.
  - **Xiao H**, Yang CS. Combination regimen with statins and NSAIDs: A promising strategy for cancer chemoprevention. *Int J Cancer* 2008; 123: 983-990.
  - **Xiao Z**, McCallum TJ, et al. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. *Br J Cancer* 1999; 81:638-646
  - **Young B**, Heath, J.W. (2000). *Wheater's Functional Histology – A Text and Colour Atlas*. Fourth edition. Churchill Livingstone. Edinburgh.
  - **Zeegers MP**, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of

- characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000; 66:4-34.
- **Zhang W**, Liu M, WU Y, Zhu Pengcheng, et al. Protective effects of atorvastatin on chronic allograft nephropathy in rats. *J Surg Res*, 2007; 143:428-436.
  - **Zhang ZT**, Pak J, Huang HY, Shapiro E, Sun TT, Pellicer A, Wu XR. Role of H-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene*. 2001; 20: 1973-1980
  - **Zheng X**, Cui XX, Avila GE, Huang MT, Liu Y, Patel J, Kong AN, Paulino R, Shih WJ, Lin Y, Rabson AB, Reddy BS, et al. Atorvastatin and celecoxib inhibit prostate PC-3 tumors in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:5480-5487.



# ABREVIATURAS



- 
- 4-ABP – 4-*aminobiphenyl*, 4-aminobifenil
- AAF – 2-acetilaminofluoreno
- AINES – drogas anti-inflamatórias não esteróides
- AJCC - *American Joint Committee on Cancer*
- ALT – “*alanine aminotransferase*”, alanina aminotransferase
- ANOVA – “*analysis of variance*”, análise de variâncias
- AST – “*aspartate aminotransferase*”, aspartato aminotransferase
- BBN – N-butil-N- (4-hidroxibutil) nitrosamina
- BCL2 – “*B-cell leukemia/lymphoma 2*”
- BHT - butil hidroxitolueno
- Ca<sup>2+</sup>-ATPase – canal de cálcio dependente de ATP
- CAT – catalase
- CCT – carcinoma das células transicionais
- Cdk – “*cyclin-dependent kinase*”, cinases dependentes de ciclinas
- CEL - celecoxibe
- CIS – Carcinoma *in situ*
- CK – “*creatine kinase*”, creatina cinase
- Col. Total – colesterol total
- Col.-HDL - colesterol-HDL
- Col.-LDL – colesterol-LDL
- COX-2 - ciclooxigenase-2
- CVE – coeficiente de variação eritrocitária
- CVP – coeficiente de variação plaquetar
- CYP450 – “*cytochrome P450*”, citocromo P450
- DNA – *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- E-cad – E- caderina
- EIA – “*enzyme immunoassay*”, ensaio imunoenzimático
- ELISA – “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”
- eNOS – “*endothelial nitric oxide synthase*”, sintase de NO endotelial (eNOS)
- EST – estatina
- FC – frequência cardíaca
- FGFR3 – *fibroblast growth factor receptor 3*, receptor 3 do factor de crescimento do fibroblasto.
- FPP – farnesil pirofosfato

GGPP – geranylgeranyl pirofosfato  
GOD – glicose oxidase  
GPx – “*glutathione peroxidase*”, glutathione peroxidase.  
GV – glóbulos vermelhos  
H&E - Hematoxilina-Eosina  
Hb – Hemoglobina  
HF – hipercolesterolemia familiar  
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A  
HTC – hematócrito  
ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule-1, molécula de adesão intercelular 1  
IL - interleucina  
INE – Instituto Nacional de Estatística  
LDL – “*Low density lipoprotein*”, lipoproteínas de baixa densidade  
MAPK/ERK – “*Mitogen activated protein kinase/extracellular regulated kinase pathway*”  
MDA – malondialdeído  
MDH – malato desidrogenase  
MMP – *matrix metalloproteinases*, metaloproteínases da matriz  
N-cad – N-caderina  
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reduzida)  
NF-KB – *nuclear factor-KB*, factor nuclear-KB  
NMP-22 – “*Nuclear matrix protein-22*”, proteína 22 da matriz nuclear  
NO – monóxido de azoto  
NUPBPM – neoplasia urotelial de baixo potencial maligno  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PAD – pressão arterial diastólica  
PAM – pressão arterial média  
PAS – pressão arterial sistólica  
PCR – “*C-reactive protein*”, proteína C reactiva  
PLT – plaquetas  
POD – peroxidase  
PTC – plaquetócrito  
Rb – retinoblastoma  
RIA – “*radioimmunoassay*”  
RM – ressonância magnética

- RNS – “*reactive nitrogen species*”, espécies reativas de azoto
- ROS – “*reactive oxygen species*”, espécies reativas de oxigénio
- RTK – *receptor tyrosine kinases*, receptor das tirosina cinases
- RT-PCR – “*Real time-polymerase chain reaction*”
- RTU – ressecção transuretal
- SOD – “*Superoxide dismutase*”, superóxido dismutase
- SREBP – “*sterol regulatory element binding protein*”, proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróides
- TAC – tomografia axial computadorizada
- TAS – “*total antioxidant status*”, capacidade antioxidante total
- TBA – “*tiobarbituric acid*”, ácido tiobarbitúrico
- TBARs – “*Tiobarbituric Acid Reactive substances*”
- TGF- $\beta$  – “*Tumor growth factor  $\beta$* ”, factor de crescimento tumoral  $\beta$
- TGO – transaminase glutamo-oxaloacética
- TGP – transaminase glutamo-pirúvica
- TGs – triglicéridos
- TNF- $\alpha$  - “*Tumor necrosis factor  $\alpha$* ”, factor de necrose tumoral  $\alpha$
- TNM – Tumor, nódulos, metástases
- TOOS - N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-metilanilina
- TSP1 – *thrombospondin-1*, trombospondina 1
- UBC – “*urinary bladder cancer*”
- UV – raios ultra-violeta
- VCM – volume corpuscular médio
- VEGF – *Vascular endothelial growth factor*, factor de crescimento do endotélio vascular
- VPM – volume plaquetar médio