



Departamento de Química
Universidade da Beira Interior

Eficácia do Celecoxibe versus Aspirina na prevenção/regressão do carcinoma da bexiga – estudo em modelo experimental (Rato Wistar)

Trabalho realizado no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental (IBILI) da
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Autor: José Vitor Oliveira Sereno

Orientador: Doutor Belmiro Parada

Orientador da UBI: Professora Doutora Petronila Rocha Pereira

Coimbra / Covilhã

2009

Agradecimentos

Ao Senhor Professor Doutor Frederico Teixeira

Manifesto o meu sentido agradecimento por me ter recebido e facultado os meios necessários à realização deste trabalho. O meu muito obrigado pelas palavras de apreço aquando da minha chegada e durante toda a estadia. Quero também agradecer pelos valiosos ensinamentos e críticas prestadas ao longo deste ano, que me motivaram sempre na esperança da obtenção de melhores métodos de trabalho.

Ao Senhor Dr. Belmiro Parada

Quero expor o meu obrigado pelos valiosos conselhos e pelo enorme apoio, sem esquecer os bons momentos que determinaram ainda um maior empenho meu. Um sincero agradecimento aos momentos passados e pela confiança depositada em mim.

À Senhora Professora Doutora Petronila Rocha Pereira

O meu reconhecido tributo pela co-orientação deste projecto. Agradeço-lhe a forma como trabalha para motivar os seus alunos, sem esquecer o encaminhamento e apoio prestado.

Ao Senhor Doutor Flávio Reis

Quero expressar o mais sincero e muito especial agradecimento pelos valiosos ensinamentos prestados desde o dia em que fui recebido no Instituto de Farmacologia e Terapêutica.

À Senhora Doutora Edite Teixeira de Lemos

O meu obrigado pela incansável vontade de ensinar e ajudar na realização deste projecto e pela amizade fundada no decorrer do estágio.

À Dr.^a Patrícia Garrido

O meu sincero agradecimento pelo apoio prestado, pelas longas horas no laboratório e gabinete que tanto fundamentaram a criação de uma amizade.

Ao Mestre Nuno Piloto

Quero expressar o meu agradecimento pelo apoio prestado na realização deste trabalho e agradecer também as palavras amigas e encorajadoras.

Às Dr^{as} Liliana e Filipa

Quero deixar uma palavra de agradecimento pelo auxílio que me prestraram na realização do protocolo experimental.

À Dona Graciela

Quero agradecer a disponibilidade por estar sempre disponível para colaborar e pela ajuda prestada com tanto carinho e dedicação.

Aos demais do Instituto

Quero deixar uma palavra de apreço pela forma como me acolheram, pelas amizades construídas, pelo apoio prestado e pelos convívios sempre reconfortantes e alegres.

Ao Senhor Doutor Rui Pinto

O meu sincero agradecimento pela preciosa colaboração e disponibilidade ao longo do trabalho.

**Ao Serviço de Anatomia Patológica (Director: Dra. Fernanda Xavier) e ao
Laboratório de Hematologia (Director: Dr. Carlos Alberto Ferrer Antunes) dos
Hospitais da Universidade de Coimbra**

O meu agradecimento na importante colaboração neste trabalho.

Aos meus Pais

Quero agradecer a enorme paciência e o grande incentivo. Agradecer pelas palavras sempre encorajadoras, pela sua dedicação, pelo grandioso exemplo que transmitem ao filho em nunca desistir...

Enfim, for tudo!!!

À minha irmã

Quero agradecer pelo exemplo de vida, de sacrifício e sua força de vida que inspira quem a rodeia. Obrigado pela amizade e companheirismo.

Ao meu irmão

O meu sincero agradecimento pelo exemplo de vida e dedicação ao que faz. Obrigado pelo companheirismo e amizade.

À minha esposa, Karina

Que dizer da pessoa que nunca deixou de estar a meu lado, que nunca deixou de acreditar em mim, que sempre me apoiou?! Não foram fáceis os tempos de separação, mas de exemplo servem para os demais desafios que nos baterão à porta.

Obrigado pela coragem demonstrada e pela força que transmite.

Metodologias, Tecnologias e Técnicas Experimentais aprendidas e aplicadas durante o estágio científico de licenciatura realizado na Unidade Terapêutica Experimental do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

- ☺ Familiarização, manipulação e tratamento do modelo experimental.

- ☺ Administração de fármacos aos animais (ratos Wistar).

- ☺ Medição de pressões arteriais na cauda dos animais pelo método da manga insuflável.

- ☺ Colheita de sangue e recolha de tecidos e procedimento analítico laboratorial.

- ☺ Determinação de indicadores de perfil lipídico, bioquímico e hemograma.

- ☺ Estudos histomorfológicos da bexiga.

- ☺ Quantificação de peroxidação lipídica (MDA sérico pelo método de TBARs) por espectrofotometria.

- ☺ Determinação da concentração de catecolaminas e de serotonina no plasma e plaquetas. Extração por alumina/ácido perclórico e quantificação por HPLC-ED.

- ☺ Familiarização e manipulação do método de coloração de tecidos pelo método de Hematoxilina-Eosina de tecidos.

Índice

Resumo	11
Abstract.....	14
A – INTRODUÇÃO.....	17
1. Fisiopatologia do Cancro da Bexiga.....	18
1.1. Características anatomo-histológicas da via urinária normal	19
1.2. Epidemiologia do cancro da bexiga	22
1.3. Características morfológicas e histopatológicas do carcinoma urotelial.....	25
1.4. Mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga: componente genética	29
1.5. Outros mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga.....	34
1.6. Modelo animal de indução de carcinoma da bexiga por N-Butil-N-(4- hidroxibutil)nitrosamina (BBN)	38
1.6. Modelo animal de indução de carcinoma da bexiga por N-Butil-N-(4- hidroxibutil)nitrosamina (BBN)	39
2 - Inibidores selectivos das COXs:	41
Acção anti-carcinogénica	41
2.1. As Isoenzimas Ciclooxygenases	43
2.2. Os inibidores da COX-1	45
2.3. Inibidores selectivos da COX-2 (Coxibes).....	49
2.4. Estudos de potencial efeito anti-tumoral dos Coxibes	53
B – OBJECTIVOS	57
C – MATERIAL E MÉTODOS	62
1. Animais e dieta: protocolo do estudo	63
1.1. Animais e acondicionamento.....	63
1.2. Monitorização do peso corporal	67
1.3. Monitorização da bebida ingerida	67
2. Avaliação das pressões arteriais	67
3. Colheita de sangue e recolha de órgãos.....	69
4. Determinação de alguns indicadores de trofismo.....	71
5. Perfil bioquímico	71
6. Hemograma	73
7. Estudo histomorfológico da bexiga	73
7.1. Processamento das amostras para histopatologia.....	73

7.2. Obtenção das secções	74
7.3. Técnicas histológicas: H&E	74
8. Estudo de marcadores de proliferação, carcinogénese e inflamação.....	75
8.1. Fundamento geral do método micro ELISA em “sandwich”	76
9. Equilíbrio oxidativo.....	76
9.1. Preparação das amostras	76
9.2. Doseamento do TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances).....	77
9.3. Doseamento da capacidade antioxidante total (Total Antioxidante Status - TAS)	78
9.4. Doseamento da nitrotirosina (3-NT).....	78
10. Tratamento estatístico dos resultados	79
D – RESULTADOS	80
1- Avaliação do peso corporal e da dieta.....	81
1.1. Monitorização do peso corporal	81
1.2. Monitorização da quantidade de bebida ingerida.....	83
2. <i>Metabolismo dos hidratos de carbono</i>	85
3. <i>Pressão arterial e trofismo cardíaco</i>	86
3.1. Pressões arteriais e frequência cardíaca.....	86
3.2. Indicadores de trofismo cardíaco.....	88
4. <i>Função renal</i>	89
4.1. Parâmetros séricos	89
4.2. Indicadores de trofismo renal	91
5. <i>Função hepática</i>	91
5.1. Parâmetros séricos	91
5.2. Indicadores de trofismo hepático.....	93
6. Perfil lipídico	93
6.1. Parâmetros séricos	94
6.2. Índices aterogénicos	95
7. Hemograma	95
8. Equilíbrio oxidativo.....	98
8.1. Peroxidação lipídica (MDA) pelo método TBARS.....	98
8.2. Capacidade antioxidante total (TAS)	100
9. Histomorfologia da bexiga	100
9.1. Avaliação do perfil macroscópico	100

9.2. Avaliação quantitativa do tumor da bexiga	107
9.3. Avaliação do perfil microscópico.....	110
10. Marcadores tumorais e inflamatórios	118
10.1. Marcadores tumorais	118
10.2. Marcadores de inflamação.....	119
E – DISCUSSÃO	121
F – CONCLUSÕES.....	140
G – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
H – ABREVIATURAS	161
I – PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	167

Resumo

O carcinoma da bexiga é uma patologia com taxas de incidência e prevalência e valores de morbidade e mortalidade que continuam a preocupar a comunidade médica e científica. Dados estatísticos revelam que a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir nas últimas década devido aos avanços médico-cirúrgicos, enquanto a taxa de incidência continua a aumentar. É devido a estes factos que cada vez mais se procura perceber os mecanismos fisiopatológicos celulares e moleculares que estão na base desta patologia. Assim, a comunidade científica pesquisa incessantemente novos métodos e potenciais fármacos que possam conduzir à sua prevenção e/ou regressão.

Para o estudo desta neoplasia, o modelo experimental de carcinoma da bexiga induzido por nitrosaminas em ratos tem sido já usado por outros grupos de investigação, com resultados satisfatórios.

O recurso a fármacos com propriedades anti-inflamatórias para a prevenção destes tumores poderá ser uma opção válida que exige estudos mais abrangentes. Os Celecoxibes são fármacos com acções anti-inflamatórias, analgésicas e actividades antipiréticas em modelos animais, e que na última década têm vindo a ser testados em carcinomas com o intuito de os prevenir. Estes fármacos actuam especificamente na ciclooxigenase-2 (COX-2 – envolvida na produção de prostanóides), que se julga essencial no desenvolvimento tumoral. O ácido acetilsalicílico (AAS), é igualmente um anti-inflamatório, mas com propriedades de actuação diferentes das do Celecoxibe, pois o AAS não é um inibidor selectivo, mas sim um inibidor das COX-1 e COX-2 (quando aplicado em doses elevadas). Pelas características que apresentam, nomeadamente no que diz respeito a mecanismos de acção, poderiam ser pensados como fármacos com elevado potencial na prevenção e/ou regressão do carcinoma da bexiga

O objectivo deste trabalho compreendeu três fases: 1ª – Caracterização e validação do modelo de carcinoma da bexiga induzido por nitrosamina em rato Wistar macho; 2ª – Avaliação da capacidade de um Celecoxibe (Celebrex®) na prevenção/regressão do desenvolvimento do carcinoma da bexiga; 3ª – Avaliação da capacidade do AAS (Aspegic®) na prevenção do desenvolvimento do carcinoma da bexiga.

No sentido de cumprir os objectivos traçados, foi elaborado um protocolo experimental que envolveu a utilização de 9 grupos de ratos: i) grupo Controlo, administrado com sumo de laranja; ii) grupo BBN, tratado com uma nitrosamina (a 0,05%), por via oral na água de bebida; iii) grupo CEL, administrado com 10 mg/kg/dia de Celecoxibe dissolvido em sumo de laranja; iv) grupo CEL-10 P, administrado com 10 mg/kg/dia de Celecoxibe e BBN, ambos nas primeiras oito semanas; v) grupo CEL-1 P administrado com 1 mg/kg/dia de Celecoxibe e BBN, ambos nas primeiras oito semanas; vi) grupo CEL-10 C, administrado com BBN nas primeiras oito semanas e com 10 mg/kg/dia de Celecoxibe nas últimas doze; vii) grupo AAS, administrado com 250 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico dissolvido em sumo de laranja; viii) grupo AAS-250 P, tratado com 250 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico e BBN, ambos nas primeiras oito semanas; ix) grupo AAS-25 P, administrado com 25 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico e BBN, ambos nas primeiras oito semanas. Foi estabelecido o período experimental de 20 semanas, de acordo com a literatura.

Foram efectuadas uma avaliação histomorfológica qualitativa (macroscópica e microscópica) e uma apreciação quantitativa da percentagem de tumores por grupo, número de tumores por rato e volume tumoral médio. Esta primeira avaliação foi complementada com a determinação sérica de alguns marcadores tumorais (TGF- β e TNF- α), inflamatórios (PCR e IL-1 β) e de equilíbrio oxidativo (MDA, TAS e 3-NT). Foi realizada a aferição de parâmetros hemodinâmicos, designadamente pressões arteriais, índice glicémico, função renal, hepática, perfil lipídico e hemograma completo, para além de indicadores de trofismos cardíaco, renal e hepático.

Os resultados obtidos no grupo BBN em relação ao Controlo demonstraram uma elevada percentagem de tumores (65%), de um elevado volume tumoral médio (cerca de 112 mm³). Neste grupo constatou-se a presença de lesões tumorais diversas (em médio/alto grau), nomeadamente: hiperplasia severa, displasia moderada, metaplasia epidermóide, papilomas, atrofia do urotélio e proliferação pseudopapilar. Como complemento destas observações, os marcadores de lesão tumoral apresentaram-se com um aumento da concentração sérica (TGF- β e TNF- α) e os valores dos marcadores inflamatórios (PCR e IL-1 β) apresentaram o mesmo perfil.

Em relação ao segundo objectivo do estudo – avaliação da eficácia do Celecoxibe – os resultados demonstraram uma grande eficácia (não total) na prevenção

de tumores. Com efeito, verificou-se no grupo CEL-10 P uma inibição do aparecimento de tumores em 88% dos ratos, com um número reduzido de tumores por rato (0,5), se bem que só um rato apresentava 4 pequenas massas bem definidas (volume total 21 mm³). No grupo CEL-1 P, verificou-se igualmente um efeito positivo na inibição do desenvolvimento tumoral (75%), e um volume tumoral muito insignificante (0,5 mm³). A avaliação histomorfológica revelou lesões de menor incidência nas células epiteliais (hiperplasias moderadas, atrofia do urotélio moderada e edema da mucosa moderado). Em paralelo, constatou-se ainda uma diminuição significativa da concentração sérica de TGF- β e de PCR. Porém, o grupo Curativo (CEL-10 C) não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que aumentou ligeiramente o número de ratos com tumor (78%) em relação ao grupo BBN.

Em relação ao estudo do AAS, verificou-se que este fármaco é igualmente benéfico na prevenção de tumores da bexiga, uma vez que a dose elevada provocou uma baixa percentagem de tumores por rato (25%), enquanto a dose baixa teve uma percentagem ligeiramente superior (38%). O volume tumoral foi também idêntico, com o grupo de alta dose a ter menor volume total (0,26 mm³) que o grupo de baixa dose (7,9 mm³).

Em suma, este trabalho confirmou a eficácia do protocolo no desenvolvimento tumoral, revelando lesões de grau de diferenciação moderado a alto, com alguns graus invasivos. Por seu turno, os fármacos escolhidos (um inibidor selectivo da COX-2 e um AINE, ambos com propriedades anti-inflamatórias) foram eficazes na prevenção do crescimento tumoral e na atenuação de marcadores de crescimento e proliferação celular. Estes resultados sugerem que a prevenção, mas não a regressão, do processo inflamatório é um alvo terapêutico de elevado potencial na quimioterapia do carcinoma da bexiga.

Abstract

The bladder cancer pathology has incidence and prevalence rates, as well as levels of morbidity and mortality which still concern the medical and scientific community. Statistics data shows that mortality rate has been decreasing during the last decades due to medical-surgical improvements, while incidence rate has yet increasing. This explains the continuous search for the cellular and molecular pathophysiological mechanisms underlying this disease. Thus, scientific communities search new methods and potential drugs able to prevent and/or reverse this condition.

The experimental bladder cancer model induced by nitrosamines in rats has been used for other research groups, with satisfactory results.

The drugs with anti-inflammatory properties might be valid options to prevent these tumours, deserving more complete studies. The Celecoxibs are drugs with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic actions in animal models, which, during the last decade, have been tested in cancer in order to prevent its development. These drugs act specifically in a enzyme (COX-2, which participates in the formation of prostanoids), that are thinking as essential in the progression of tumours. The acetilsalicylic acid (ASA) is also an anti-inflammatory, but with different properties the action from those of the celecoxib, since the ASA is not a selective inhibitor, but an inhibitor of COX-1 and COX-2 (when used in high doses). Due to its characteristics, namely concerning the action mechanism could be viewed as potential drugs to prevent and/or attenuate bladder cancer.

The goal of this work has three distinct phases: 1st – Characterization and validation of the model of bladder cancer induced by nitrosamines in male Wistar rats; 2nd – Evaluate the ability of a Celecoxib (the Celebrex[®]) to prevent or revert bladder cancer development; 3rd – Evaluate the ability of a ASA (Aspegic[®]) to prevent bladder cancer development

In order to achieve the planed aims, an experimental protocol was designed, using 9 rat groups: i) control group, treated with orange juice; ii) BBN group, treated with nitrosamine (0.05% in drinking water); iii) CEL group, treated with 10 mg/kg/day of Celecoxib dissolved in orange juice; iv and v) CEL-10 P and CEL-1 P groups, which intend to evaluate the preventive effect of Celecoxib on tumour development; vi) CEL-1

C group, which intend to evaluate the cure effect of Celecoxib on tumour development; vii) AAS group, treated with 250 mg/kg/day of AAS dissolved in orange juice; viii and ix) AAS-250 P and AAS-25 P groups, which intend to evaluate the preventive effect of AAS on tumour development. A 20-week experimental period was established, according to the literature.

A histological qualitative (macroscopy and microscopy) evaluation was made, as well as a quantification of percentage of tumours per group, number of tumours per rat and median tumour volume. This evaluation was complemented with the determination of serum markers of tumour (TGF- β and TNF- α), inflammation (PCR and IL-1 β) and redox status (MDA, TAS and 3-NT). As supplementary evaluation hemodynamics parameters were made, namely blood pressure, glycaemia, renal and hepatic function, lipid profile and complete haemograma, as well as cardiac, renal and hepatic trophism.

The obtained results in the BBN group versus the control has demonstrate an elevated percentage of tumours (65%), accompanied by an high median tumour volume (about 112 mm³). Moreover, in that group there were distinct tumour lesions (of moderate/high grade), namely: severe hyperplasia, urothelium atrophy and papillary proliferation. As complement for those observations, the tumour markers showed an increment of serum concentration (TGF- β and TNF- α) and the inflammatory markers (PCR and IL-1 β) reveler the same profile.

Concerning the second goal of the study – the evaluation of the Celecoxib efficacy – the results have demonstrated a higher efficacy (not total) in cancer prevention. Therefore, in CEL-10 P there was an inhibition of tumour development in 88% of the rats, with a reduced number of tumours per rate (0.5), despite the 4 tumours of low dimensions in the only rat which has presented tumours (total volume of 21 mm³). In the CEL-1 P group, there was also a positive effect on the inhibition of tumor development (75%), and a very insignificant tumour volume (0.5 mm³). The histological evaluation has revealed a lower incidence of epithelial cells lesions (moderate hyperplasia, urothelium atrophy and moderate mucosa oedema). Simultaneously, there was a significant decrease in serum content of TGF- β and PCR. However, the curative group (CEL-10 C) showed no satisfactory results, since a slightly increased in the number of rats with tumor (78%) compared to the BBN group.

Concerning the ASA study, we found that this drug is also beneficial in the prevention of bladder tumors, since the high dose caused a small percentage of tumors per rat (25%), while the low dose had a slight high percentage (38 %). The tumor volume was also identical, with the high dose group revealed a lower total volume (0.26 mm³) than the low dose group (7.9 mm³).

As summary, this work has confirmed the efficacy of the protocol for tumour development, revealing moderate and high grade lesion, with some degree of invasivity. On the other hand, the drugs tested (a selective COX-2 inhibitor and a NSAID, both with anti-inflammatory properties) were efficient in preventing tumour growth and attenuating the markers of growth and cellular differentiation. The results suggests that prevention of inflammatory process, but not reversion, is a therapeutic target of high potential in chemoprevention of bladder cancer.



A – INTRODUÇÃO

1. Fisiopatologia do Cancro da Bexiga

1.1. Características anatomo-histológicas da via urinária normal

A bexiga faz parte do aparelho urinário e localiza-se na cavidade pélvica, logo atrás da sínfise púbica e é revestida pelo urotélio. No homem, localiza-se anteriormente ao recto mas, na mulher, está situada imediatamente à frente da vagina e antero-inferiormente ao útero. A sua principal função é armazenar a urina que provém dos rins e passa pelos ureteres, sendo posteriormente eliminada através da uretra (figura 1).

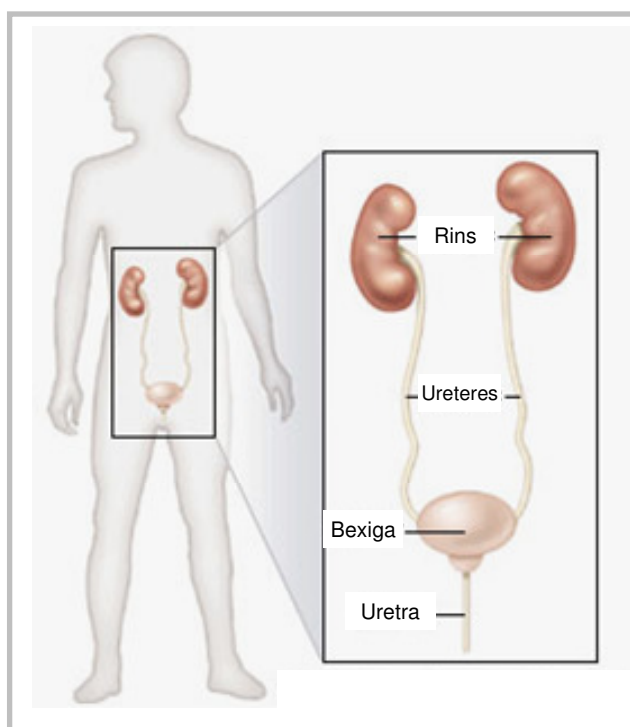


Figura 1 – Anatomia do aparelho urinário.
Fonte: Adaptado de Enciclopédia Britânica, 2003

A forma da bexiga varia em função do grau de repleção, assumindo forma de balão quando se encontra cheia. As suas dimensões dependem da presença ou ausência de urina. Os ureteres entram na bexiga na parte inferior da sua superfície postero-lateral e a uretra sai da bexiga pela porção antero-inferior. A área triangular da parede vesical, delimitada posteriormente pela inserção dos ureteres e anteriormente pela uretra, tem o nome de trígono. Esta região difere histologicamente da restante parede vesical e não se expande quando a bexiga enche.

A parede da bexiga é muito espessa, devido às camadas exteriores ao epitélio, compostas principalmente por músculo liso. A espessura do próprio epitélio varia de quatro a sete camadas de células quando a bexiga está vazia, para apenas duas a três

INTRODUÇÃO

quando está cheia (figura 2). O epitélio de transição é especializado de modo a que as células que o compõem deslizem umas sobre as outras e o número de camadas diminua à medida que o volume da bexiga aumenta.

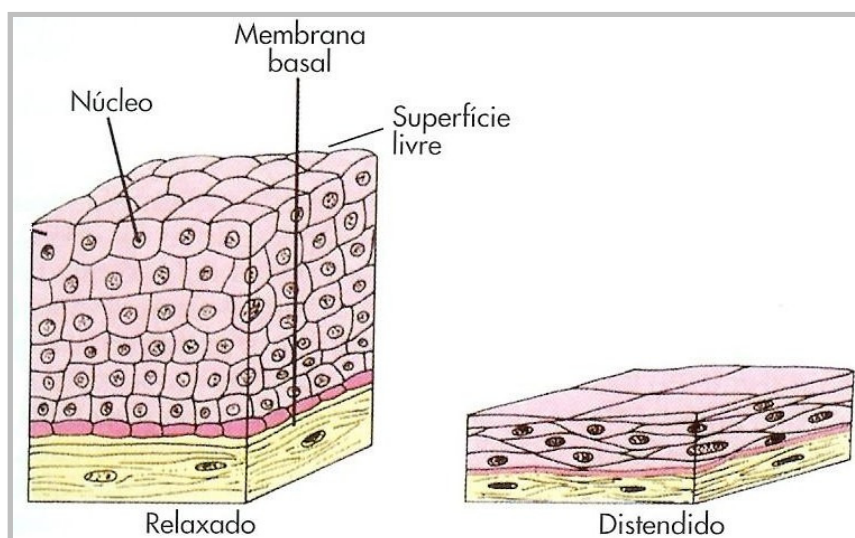


Figura 2 – Epitélio de transição da bexiga.

Fonte: Retirado de aula de Ilídio Correia, 2004 (UBI, Covilhã).

O epitélio está preparado para receber a urina do organismo e é praticamente impermeável aos produtos tóxicos. Assim, a transformação tumoral deste pode suceder em todo o tracto urinário. No entanto, a frequência de aparecimento de tumores é muito diferente, dado que aproximadamente 90% dos tumores epiteliais surgem na bexiga.

Externamente a bexiga é revestida por tecido conjuntivo e adiposo, por onde passam os vasos sanguíneos, os vasos linfáticos e os nervos. A revestir a membrana basal encontra-se uma camada de células basais e, sobre esta, mais uma ou duas camadas de células intermédias dispostas perpendicularmente, às quais se sobrepõe uma camada mais superficial composta por células grandes e achatadas, designadas por células “guarda-chuva”, que se estendem de forma paralela à membrana basal, na superfície da urina.

Anatomicamente, a bexiga está em contacto anterior com a sínfise púbica e a parede abdominal, sendo que posteriormente contacta com o recto no homem e a vagina na mulher. A cúpula está em contacto com o peritoneu parietal.

O estabelecimento coordenado de junções específicas célula-célula é necessário para a morfogenia e a posição celular durante o desenvolvimento e para manutenção de integridade de tecido em organismos adultos. Várias estruturas associadas à membrana contribuem para a coesão e comunicação entre células. Elas estão presentes na maioria

INTRODUÇÃO

dos tecidos, mas são muito proeminentes em epitélios. As junções intercelulares servem como locais de adesão e também agem como tampão para prevenir o fluxo de materiais pelo espaço intercelular.

A zona ocludente (junções apertadas) regula a passagem de iões e moléculas pela via paracelular e mantém a distribuição polarizada de lipídios e proteínas na membrana plasmática (figura 3). Os desmossomas, juntamente com as junções aderentes, representam as principais junções adesivas célula a célula em epitélios (Potter e col., 1999). As junções aderentes estão localizadas perto da superfície apical de células epiteliais polarizadas. Em contraste com as junções aderentes que são unidas ao microfilamento de actina, os desmossomas estão associados a filamentos intermediários (IFs).

Em junções aderentes e desmossomas e as glicoproteínas transmembranares dependentes de Ca^{++} da superfamília das caderinas, medeiam os contactos específicos célula a célula. Nas junções aderentes, os microfilamentos de actina no citoplasma da célula ligam-se à caderina epitelial (caderina E) pelas cateninas (Pokutta e col., 2000). Os complexos de catenina consistem em catenina α , catenina β , catenina γ . Os complexos catenina-caderina E são encontrados em locais de contacto entre células, conhecidos como zonas aderentes, e são os alvos de muitos factores de crescimento e de vias de sinalização hormonal que regulam a sua função e expressão. Além disso, estes complexos podem modular ou iniciar eventos de sinalização implicados na diferenciação e controlo do crescimento (Celik-Ozenci e col., 2006).

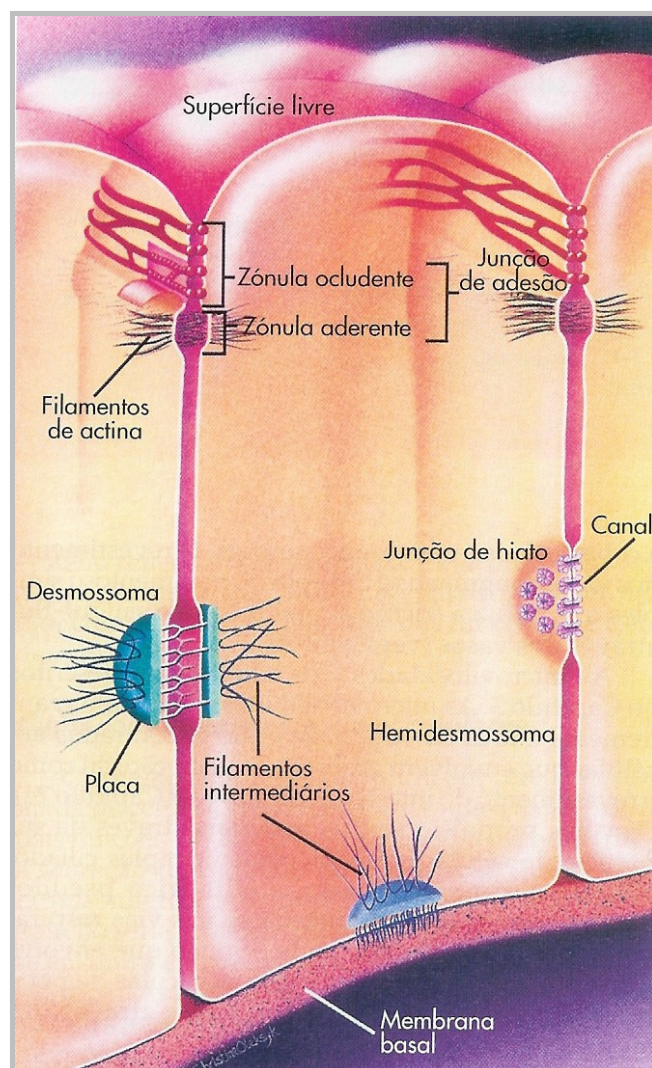


Figura 3 – Identificação dos elementos de adesão celular no epitélio.
Fonte: Retirado de aula de Ilídio Correia, 2004 (UBI, Covilhã).

1.2. Epidemiologia do cancro da bexiga

As principais doenças do tracto inferior podem ser infecções (geralmente causadas por Bacilos Gram negativos), obstruções (por causas intrínsecas ou extrínsecas, como cálculos, fibroses e tumores), cálculos (de oxalato de cálcio, ácido úrico e magnésio) e neoplasias. A maioria das neoplasias tem origem no urotélio devido à acção de agentes carcinogénicos ambientais excretados na urina. As neoplasias uroteliais são mais frequentes na bexiga e nos homens, sendo que a maioria são superficiais e papilares, podendo uma pequena parte invadir a camada muscular.

INTRODUÇÃO

O cancro da bexiga é a nona neoplasia mais frequente a nível mundial, em termos de incidência, representando 3,3% de todos os casos de tumores. Na Europa, em 1995, foi a quinta malignidade mais comum e a sexta principal causa de mortalidade por cancro, sendo contabilizados 127 000 novos casos e 46 000 mortes. No século passado a sua incidência aumentou desde a década de 60 até à década 80, ocorrido mais recentemente uma estabilização das taxas (Voorzanger-Rousselot e col., 2007). Em Portugal, foi a décima causa de morte em 2005, com um total de 632 casos, num universo de 23 323 óbitos devido a tumores (representando 2,8% do total) (Figura 4).

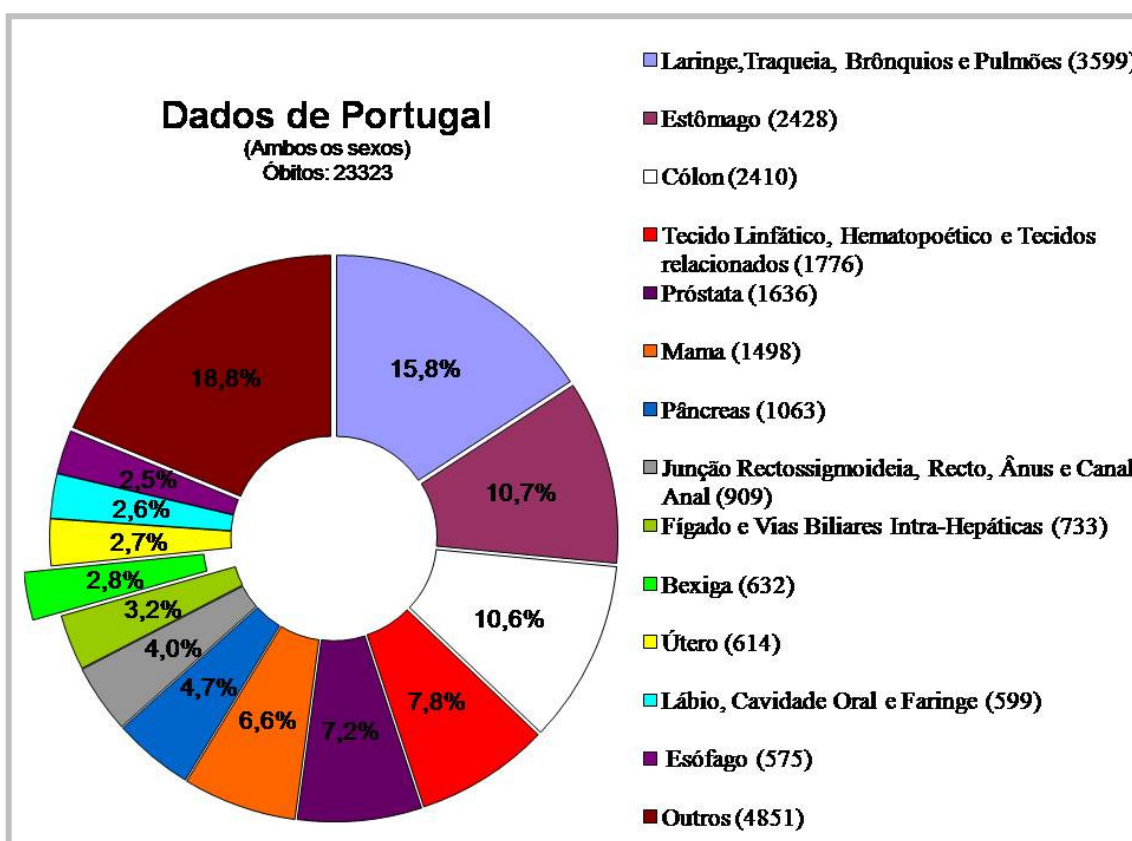


Figura 4 – Representação gráfica das percentagens de óbito em Portugal no ano de 2005 nos tumores mais frequentes.

Fonte: Instituto Nacional de Estatística (INE), 2005.

A mortalidade tem vindo a diminuir tanto para homens como para mulheres e em todas as idades, podendo este dado dever-se à detecção mais precoce e a melhorias na sobrevivência (Voorzanger-Rousselot e col., 2007), particularmente devido ao avanço cirúrgico.

Segundo dados internacionais, a incidência do cancro da bexiga é muito superior no sexo masculino que (na ordem de 3:1). No entanto, em óbitos no nosso país em 2005, essa diferença foi menos acentuada (H:438; M:194). É o segundo tumor urogenital mais comum, somente superado pelo cancro da próstata (Figura 4). A

INTRODUÇÃO

.....
incidência do cancro da bexiga é mais elevada nos países desenvolvidos e regiões fortemente industrializadas (Droller e col., 1998). Nos últimos 25 anos a incidência aumentou 5%, mas o índice de mortalidade diminuiu 36%. A doença é mais comum em indivíduos de raça caucasiana do que em indivíduos de raça negra. De notar que a sua incidência/mortalidade aumenta com a idade, sendo que o pico ocorreu nas décadas de setenta e oitenta, sendo quase nula a taxa de mortalidade antes dos 30 anos (dados de 2005, na figura 5).

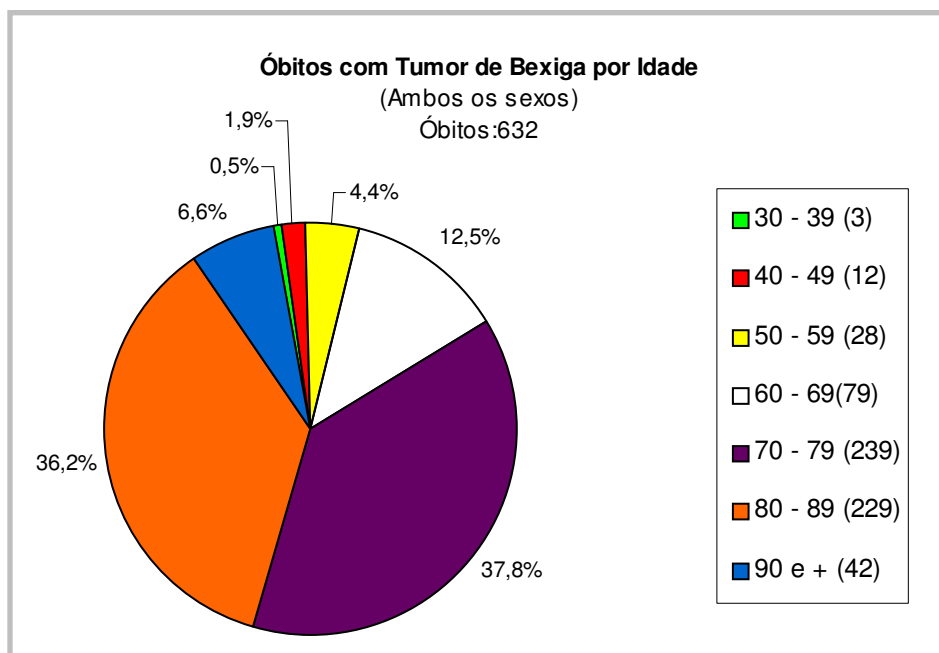


Figura 5 – Representação gráfica da mortalidade por idades em 2005.
Fonte: INE, 2005.

Devido à natureza das neoplasias da bexiga, a sua prevalência excede a incidência primária, até porque na maioria dos casos a doença apresenta-se como superficial (Pisani e col., 2002). São raros os tumores vesicais encontrados novamente em autópsias, o que significa que virtualmente todos os doentes com estes tumores são diagnosticados e que o período de latência pré-clínico é relativamente curto (Kishi e col., 1981). O longo período de latência entre a exposição aos supostos carcinogénicos e o desenvolvimento da doença clínica dificulta o estabelecimento de relações causa-efeito. Contudo, o tumor da bexiga foi uma das primeiras neoplasias a ser relacionadas com carcinogénicos. Rehn e col. (em 1985), observaram em trabalhadores de unidades fabris uma associação entre a exposição a aminas aromáticas e a neoplasia. Mais tarde, foram feitas associações entre modelos animais e humanos expostos a corantes artificiais (Droller e col., 1998). São vários os estudos que descrevem a associação entre o tabagismo e o tumor da bexiga. Alguns, demonstram alguns deles que 50% dos

carcinomas não ocorreriam se os pacientes não fossem fumadores, descrevendo um aumento no risco de até quatro vezes. Essencialmente, o tabaco é o principal factor de risco associado à neoplasia vesical (Lamm e col., 1998).

1.3. Características morfológicas e histopatológicas do carcinoma urotelial

As células da bexiga podem sofrer alterações morfológicas do tipo hiperplástico e metaplástico ou displástico.

A hiperplasia epitelial descreve um aumento do número de camadas celulares que, no entanto, não apresentam anormalidades na sua arquitectura e núcleo. Por conseguinte, a metaplasia urotelial indica alterações da mucosa vesical, geralmente por focos em áreas distintas, demonstrando uma aparência epitelial não transicional, com desenvolvimento epidermóide (metaplasia escamosa) ou glandular (metaplasia adenomatosa).

A displasia urotelial pode ter diferentes estádios, como mostra a figura 6:

- i) Anormalidades proliferativas pré-neoplásicas – A hiperplasia atípica é muito similar à hiperplasia epitelial, excepto neste caso em que existem também anormalidades nucleares, reflectindo-se num desarranjo parcial da camada de células superficiais, designadas por células “guarda-chuva” (Cheng e col., 1999);
- ii) Displasia – refere-se a alterações epiteliais que se encontram num estágio intermédio entre o urotélio normal e o carcinoma *in situ*. As células displásicas têm um núcleo grande, arredondado e que não exhibe a polaridade do epitélio normal. O Epitélio displásico não apresenta um número superior de camadas celulares (Cheng e col., 1999);
- iii) Carcinoma *in situ* – pode ocorrer sob a forma de lesões eritematosas, aveludadas, superficiais da mucosa vesical. Histologicamente, consiste num carcinoma de células transicionais fracamente diferenciado e confinado ao urotélio. O carcinoma *in situ* pode ser assintomático ou pode produzir severos sintomas de frequência urinária, urgência e disúria. Está presente em 25% ou mais dos pacientes com tumores de alto grau e ocorre em 20% a 75% dos casos de tumores invasivos (Sarkis e col., 1994).

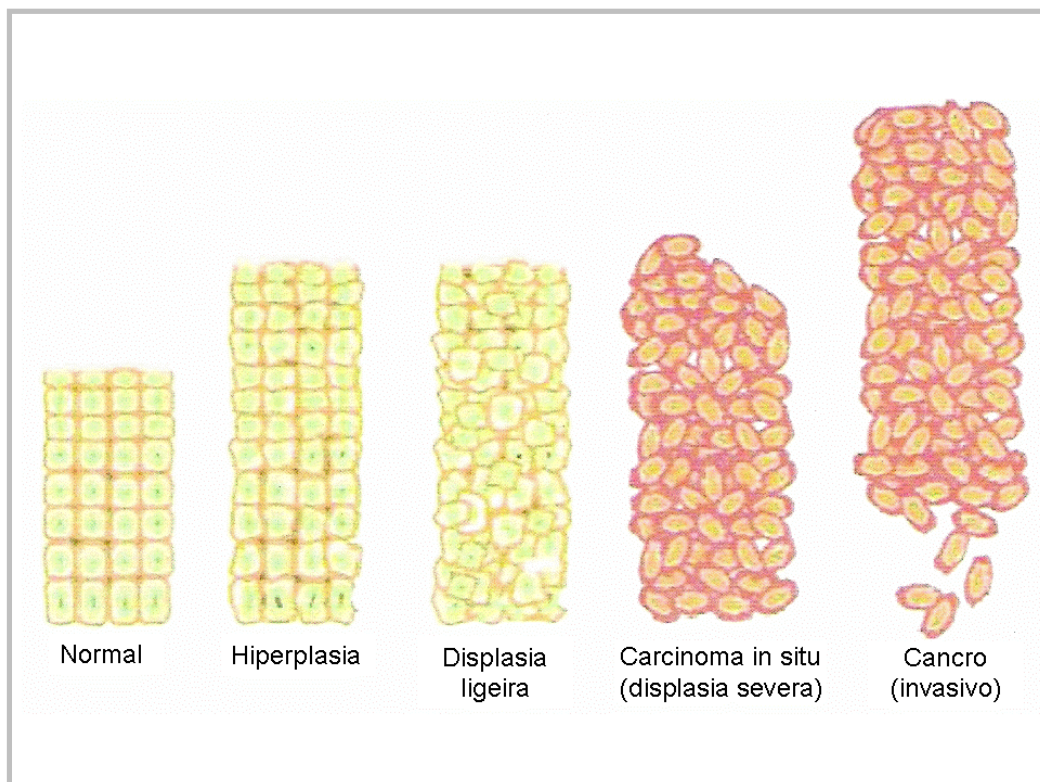


Figura 6 – Evolução do tecido em função do tipo de neoplasia.
Fonte: American Foundation for Urologic Disease.

1.3.1. Classificação histológica

O carcinoma vesical engloba vários tumores histologicamente diferentes:

Tumores do Urotélio (células de transição) – mais de 90% dos tumores vesicais são tumores uroteliais. Estes tumores têm um crescimento do número de camadas celulares epiteliais, perda da polaridade celular, maturação celular anormal desde a camada basal até à superficial, aumento do rácio núcleo-citoplasma, e um número aumentado de mitoses. Os carcinomas uroteliais manifestam-se sob várias formas de crescimento tumoral, incluindo papilar, infiltrativo, nodular, misto e de crescimento epitelial plano (Epstein e col., 1998). Aproximadamente 70% dos tumores da bexiga são tumores papilares, 10% são nodulares e 20% são mistos.

Carcinoma Escamoso – nos países ocidentais tem ocorrência inferior a 10% dos vários tumores vesicais. São factores de risco: a inflamação crónica por cálculos, cateteres vesicais, infecções urinárias crónicas ou divertículos. Estes tumores surgem em doentes em média 10 a 20 anos mais novos do que os pacientes com tumores de urotélio e

INTRODUÇÃO

.....
associam-se geralmente a um mau prognóstico, devido essencialmente ao seu estado avançado na altura do diagnóstico.

Adenocarcinoma – constituem menos de 5% dos tumores vesicais. Podem ser classificados em adenocarcinoma vesical primário, do úraco ou metastático. Surgem geralmente na cúpula vesical e são os tumores associados às extrofias vesicais.

1.3.2. Classificação quanto ao estadiamento

O principal índice para a classificação de tumores vesicais quanto o estadiamento é a presença/ausência de invasão da camada muscular. Assim, os tumores que não invadem a camada muscular são designados por superficiais, enquanto que os que invadem são denominados de profundos ou invasivos (Figura 7).

A principal classificação usada na actualidade clínica é a classificação de TNM, da União Internacional contra o Cancro (UICC), segundo a qual os tumores malignos são classificados na forma exacta dos seus estádios tumorais. Assim, são atribuídos prefixos – seguidos de números – aos diferentes estádios (tabela 1):

Prefixo T – baseia-se na descrição da extensão do tumor

Prefixo N – ausência ou presença de disseminação ganglionar

Prefixo M – ausência ou presença de metástases à distância

Na clínica, quando estas categorias são acompanhadas por informação anatomo-patológica, usa-se o prefixo p colocado anteriormente aos prefixos descritos.

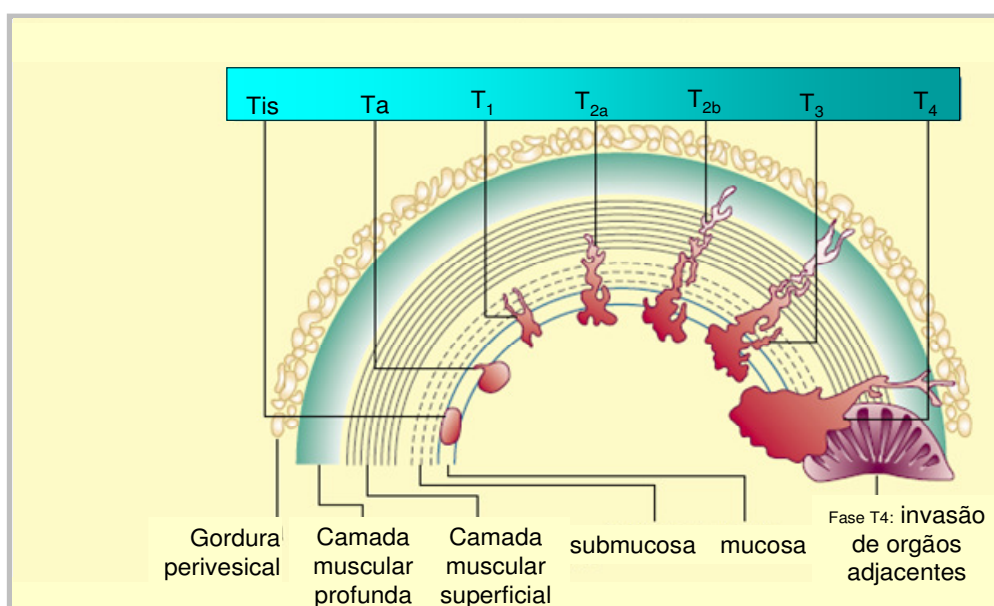


Figura 7 – Fases do tumor da bexiga segundo a classificação TNM.

Fonte: Adaptado de Meran, 2007.

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Classificação TNM do tumor vesical quanto ao estadiamento.

T	CANCRO SUPERFICIAL	
	T0	Ausência de tumor
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
	Ta	Tumor papilar
	T1	Invasão de tecido conjuntivo sub-epitelial
	CANCRO INVASIVO	
	T2a	Invasão superficial do tecido muscular
	T2b	Invasão profunda do tecido muscular
	T3a	Invasão superficial da gordura perivisceral
	T3b	Invasão profunda da gordura perivisceral
	T4a	Tumor que invade a próstata, vagina e útero
	T4b	Tumor fixo na parede pélvica ou abdominal
	TX	Incapacidade de avaliação do tumor primário
N	N0	Ausência de cancro em gânglios linfáticos
	N1	Nódulos tumorais num único gânglio linfático, com menos de 2 cm
	N2	Nódulos tumorais, num ou mais gânglios linfáticos, de 2 a 5 cm
	N3	Pelo menos um gânglio afectado com nódulo tumoral superior a 5cm
	NX	Não podem ser avaliados os gânglios linfáticos regionais
M	M0	Ausência de metástases distantes
	M1	Presença de metástases à distância
	MX	A presença de metástases à distância não pode ser avaliada

Fonte: Adaptado de D’Ancona, 2005.

Na figura 8 estão representadas as diferenças de desenvolvimento do carcinoma vesical, sendo as setas largas representativas das vias com maior probabilidade de ocorrência. Este formato implica uma forma de desenvolvimento sequencial segundo a qual os cancros inicialmente aparecem em baixos graus, progredindo depois para graus mais avançados. No entanto, na clínica os tumores da bexiga nem sempre ocorrem da mesma forma, podendo estar envolvidas diferentes vias e sequências interrelacionadas.

INTRODUÇÃO

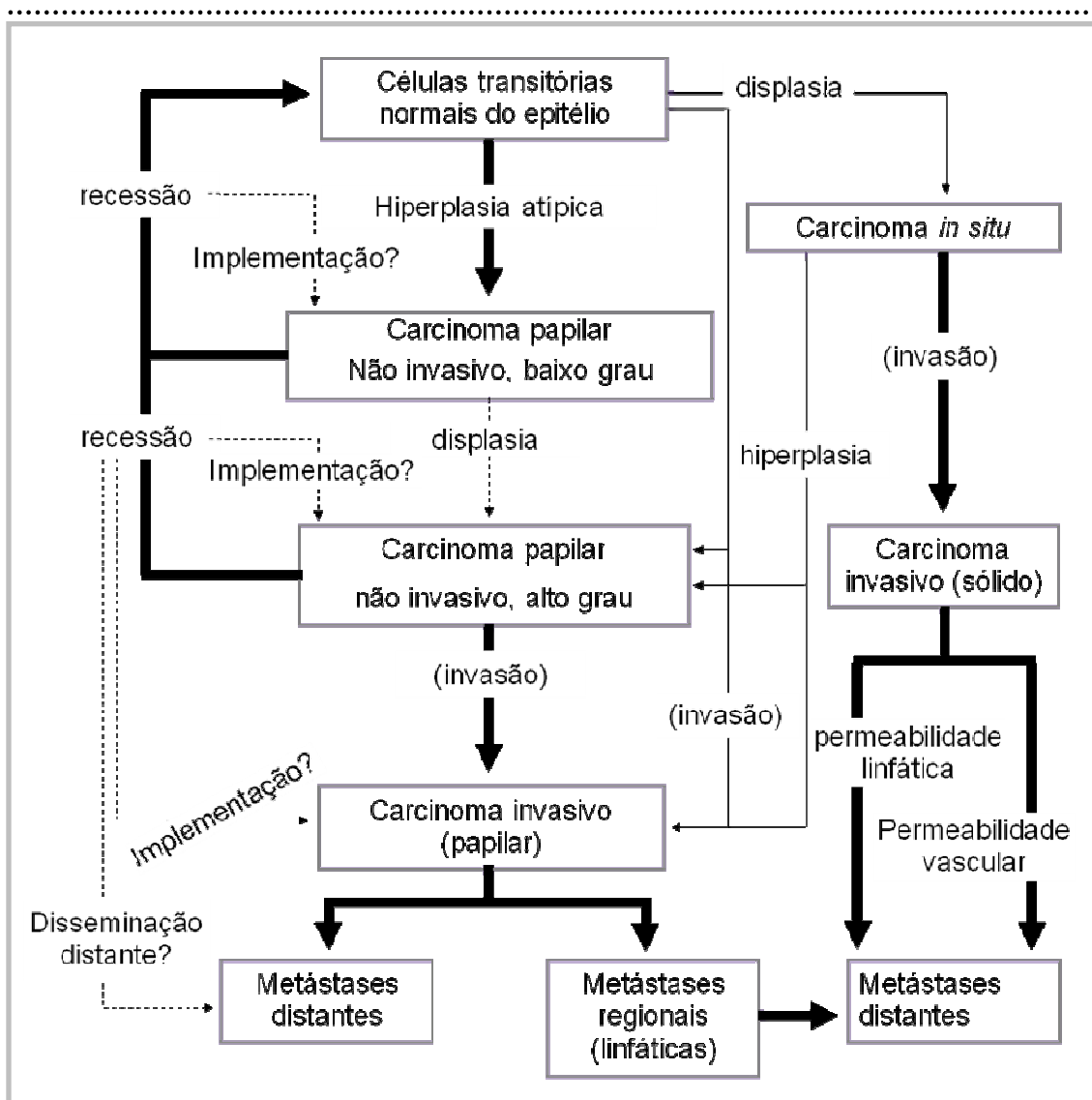


Figura 8 – As diferentes vias de desenvolvimento do carcinoma vesical.

Fonte: Adaptado de Droller, 1998.

1.4. Mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga: componente genética

1.4.1. Alterações genéticas e epigenéticas

As alterações genéticas podem induzir o desenvolvimento de lesões papilares de grau elevado. Assim, é provável que estas lesões de alto grau possam manifestar alterações genéticas diferentes, resultando em displasia em vez de uma simples hiperplasia. Estas lesões têm tendência a produzir células anormais, que proliferam

INTRODUÇÃO

apenas no epitélio plano, sendo designados de carcinoma *in situ*. No entanto, estas lesões também podem produzir tumores papilares de grau elevado, levando a alterações nodulares e tornando-se directamente invasivas (Droller e col., 1998).

Relativamente às alterações genéticas no carcinoma vesical, são hoje apontadas modificações a diferentes níveis:

i) Cromossomas anormais

Estudos citogenéticos identificaram muitas mudanças cromossómicas estruturais e numéricas em tumores de células transacionais. As aberrações cromossómicas podem conduzir a produtos de fusão ou mudança na regulação do gene (ex: aumento da expressão de certos genes), e isso tem um impacto directo na proliferação celular, e no controlo do ciclo celular ou da apoptose. No caso de deleções, duplicações, trissomias, e monossomias, um efeito de dosagem do gene também pode estar envolvido.

Estudos genéticos moleculares de cancro da bexiga demonstraram deleções de vários braços cromossómicos, incluindo 3p, 6q, 9q, 11p, 17p, e 18q. A perda do 9q foi apontado como sendo o evento primário na génese de cancro da bexiga (figura 9). Apartir das as mudanças iniciais que aparecem neste tumor (TCC), surgem as deleções 8q e 1q. As deleções 4p e 17p e a formação de isocromossoma 5p foram descritas em associações a fenótipos de tumor agressivos (Al-Sukhun e col., 2003).

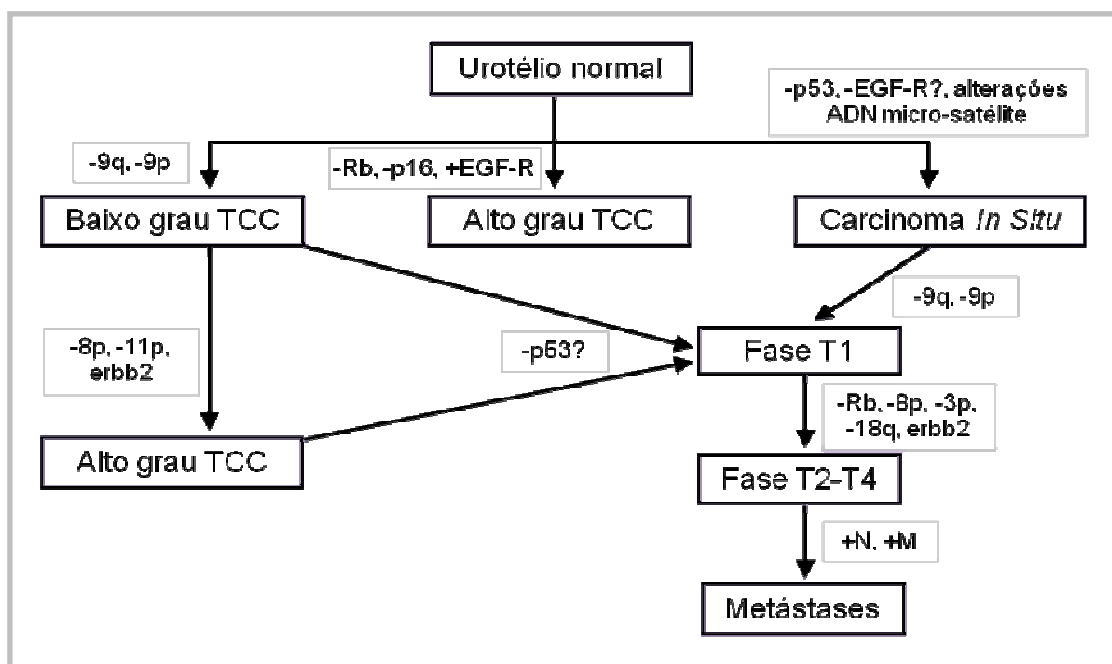


Figura 9 – Modelo de desenvolvimento e progressão de carcinoma de células transacionais.

Fonte: Adaptado de Jung e col, 2000.

Legenda: Alterações genéticas clinicamente mais comuns correlacionadas com o grau e a fase específica.

ii) Metilação aberrante do ADN

A hipermetilação de genes na região do promotor 5' está associada ao silenciamento da transcrição e é um mecanismo alternativo para a baixa regulação da expressão do gene, em vez da deleção do gene ou mutação. A hipermetilação da região de promotor do gene p16/INK4A (inibe CDK4 e CDK6) num subconjunto de pacientes com TCC superficial foi descrita como sendo um evento inicial na patogénese. A determinação de metilação de 10 genes em 98 cancros da bexiga indicaram que esses genes são metilados durante o processo de desenvolvimento de cancro da bexiga. O perfil de metilação pode representar um novo biomarcador com potencial de prenúncio em risco de TCC (Al-Sukhun e col., 2003).

1.4.2. Alterações ao nível do ciclo celular

Durante anos, muitos estudos mostraram factores que controlam o ciclo celular, proliferação celular e vias apoptóticas, prevendo os mecanismos patogénicos que levam ao cancro. Tais factores incluem, entre muitos outros, o gene p53 e o gene retinoblastoma (Rb), que foram identificados como genes supressores de tumor. O p53 é essencial para desempenhar um papel na protecção da integridade do ADN, prevenindo a entrada na fase S até que o dano de ADN seja consertado, dirigindo células não consertadas para apoptose. O gene Rb também parece ter um papel proeminente na regulação do ciclo celular na fase G1, impedindo ou permitindo células para a replicação de ADN (figura 10) (Sellers e col., 1997). Mutações ou ausência destes genes não só poderiam ter implicações importantes para as características biológicas do tumor, como também para a resposta a agentes prejudiciais a ADN, como os agentes quimioterapêuticos e radiação.

Foram demonstradas mutações, inactivações e alta expressão destes genes em muitos tipos de tumor sólidos, incluindo o cancro de células transicionais da bexiga (Al-Sukhun e col, 2003).

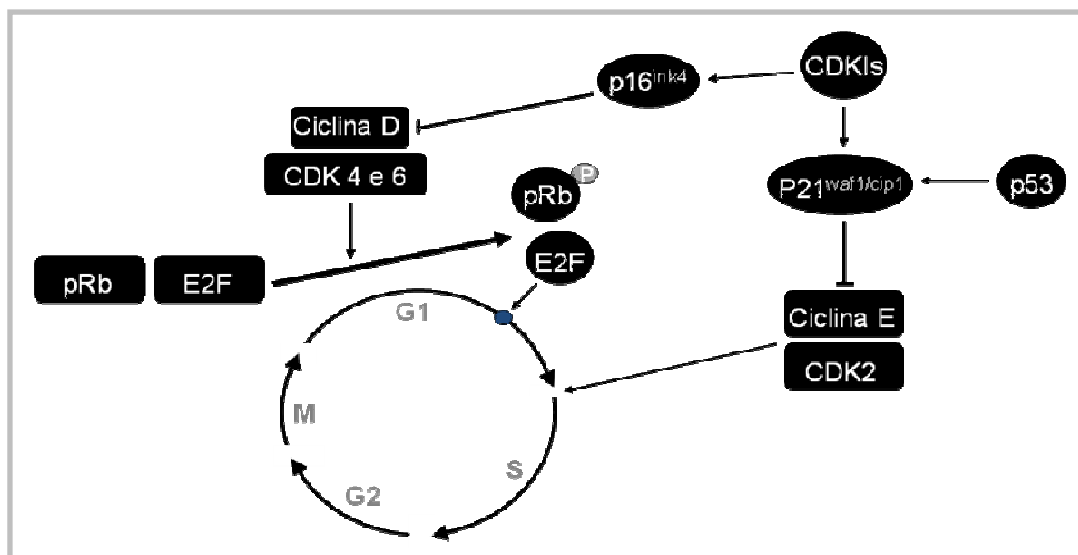


Figura 10 – O ciclo celular e a sua regulação pelas ciclinas, ciclinas dependentes de quinases (CDKs) e CDK inibitórias (CDKIs).

Fonte: Adaptado de Al-Sukhun, 2003.

Legenda: A ciclina D interage com CDK4 e CDK6 para dirigir a progressão da célula para G1. A associação da ciclina E com CDK2 activa a transição G1-S e dirige a entrada para a fase S. No seu estado activo, Rb é hipofosforilada e forma um complexo com um grupo de factores de transcrição, conhecido por E2F. Quando pRb é inactivada por fosforilação mediada por CDK2, CDK4 ou CDK6, são libertados factores transcrição E2F, resultando na activação de genes essenciais à transcrição para a progressão da fase S. O p53, trabalhando em conjunto com o p21, pode diminuir as actividades enzimáticas do complexo ciclina E-CDK2.

1.4.2.1. Estimulação do crescimento e protooncogenes

A activação de protooncogenes requer mecanismos de amplificação de gene ou d mutação de um único alelo, conduzindo a uma alta expressão.

i) *Oncogenes ras*

No cancro da bexiga, tinham sido identificadas mutações nos codões 12, 13 e 61 de H-ras. Porém, a presença da mutação H-ras não se correlacionou com o grau de tumor numa série de 152 tumores de bexiga humanos, levando a que fosse considerado como um evento molecular não principal na patogénese (Al-Sukhun e col., 2003).

ii) *Receptores EGF (EGFR)*

Foi relatada uma associação positiva entre alta expressão de EGFR e o cancro da bexiga em fases avançadas, identificando este receptor como um factor de prognóstico em pacientes com cancro da bexiga. No entanto alguns investigadores não o puderam confirmar (Al-Sukhun e col., 2003).

iii) Oncogene bcl-2

O produto desta proteína oncogene tem um papel muito importante na supressão da apoptose, inibindo assim respostas a quimioterapia e radioterapia. De forma interessante, a expressão de bcl-2 em tumores de bexiga foi associada com fenótipos menos agressivos. A imunoreactividade de Bcl-2 foi correlatada inversamente com o grau histológico (Al-Sukhun e col., 2003).

1.4.2.2. Genes supressores de tumores e supressão do crescimento

Embora os oncogenes sejam mais facilmente detectados, uma vez que apresentam um efeito positivo dominante, outro mecanismo extremamente importante da carcinogénese é a inactivação dos genes codificadores das proteínas que regulam o crescimento celular, a reparação de ADN e a apoptose. Assim, os genes supressores de tumores têm a função de proteger a células de alterações genómicas. Muitos deles actuam como pontos de controlo do ciclo celular, o que permite a sua intercepção quando são detectadas lesões no ADN, evitando assim a mutagénese.

i) O gene retinoblastoma

A forma hipofosforilada é a predominante em G1, mostrando um efeito no crescimento supressivo. A pRb torna-se hiperfosforilada na entrada de G2 e permanece assim nas fases G2/M. Foi postulado que regula a proliferação celular, restringindo a progressão do ciclo da célula num ponto crítico da fase G1. Vários estudos tinham demonstrado uma associação estatisticamente significativa entre a perda de Rb, fase e grau de tumor. Estes estudos sugeriram que enquanto isto aconteceu em todas as fases do cancro da bexiga, foi geralmente associado a tumores invasores (figura 9) (Takahashi e col., 1991).

ii) O gene p53

Funciona como um factor de transcrição para activar a expressão de genes que controlam pontos-chave do ciclo celular (por exemplo: p21^{WAF1/CIP1}), apoptose (BAX), rearranjo de ADN e angiogénese (trombospondina). O p53 mutado é disfuncional e tem uma meia-vida prolongada. A alteração do gene p53 é das aberrações moleculares mais comuns em tumores humanos. É sabido que uma alta expressão de p53 nuclear está

INTRODUÇÃO

.....
associado com progressão tumoral, independente de grau, da presença de invasão vascular ou carcinoma *in situ* (Sarkis e col., 1993). Aproximadamente 50% de tumores que metastizam e matam o paciente mostram nenhuma alteração de p53; estes tumores progrediram apesar da via p53/p21^{WAF1/CIP1} se ter mantido intacta. Isto sugere que estejam envolvidas vias múltiplas na progressão tumoral, e que o cancro é um processo com múltiplos passos genéticos (Al-Sukhun e col., 1993).

iii) O p21^{WAF1/CIP1}

A contenção do ciclo celular que é mediada pelo p53 é efectuada pela indução do p21^{WAF1/CIP1}, um CDKI que pode ser expressado constitutivamente por várias vias independentes de p53 (figura 10). Na realidade, a sobrevivência entre pacientes com um fenótipo p53 alterado, mas com preservação de expressão de p21, era semelhante entre pacientes com p53 normal (Al-Sukhun e col., 2003).

iv) Ciclina D1/E

Foi demonstrado em tumores que permaneceram numa baixa fase de diferenciação, altos níveis de p27 e ciclina E. Os tumores que progrediram para doença invasiva, mostraram uma diminuição gradual em p27 e ciclina E (nivelou com o passar do tempo). Estes resultados sugerem que a diminuição dos níveis de p27 e ciclina E têm um papel na progressão no cancro da bexiga (Kamai e col., 2001).

1.5. Outros mecanismos fisiopatológicos no carcinoma da bexiga

Um vasto leque de circunstâncias inflamatórias crónicas torna as células susceptíveis a transformações neoplásicas. Geralmente, a inflamação persistente favorece um risco elevado de cancro. A inflamação é um processo de multi-passos que inclui: o ferimento, a reparação e a resolução. Todas as células inflamatórias (neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, mastócitos e linfócitos) são recrutadas após uma lesão ou infecção, e podem levar ao início e à progressão do cancro. Existem pontos moleculares chaves que ligam a inflamação às alterações genéticas, como as prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e factores angiogénicos. Os radicais livres podem actuar como agentes prejudiciais directos ou

indirectos em reacções com outros componentes químicos ou estruturais nas células. As principais espécies químicas reactivas são os radicais livres derivados do oxigénio (ROI) e do nitrogénio (RNI).

1.5.1. O desequilíbrio oxidativo

O stresse oxidativo é o desequilíbrio no balanço entre a produção de espécies reactivas de oxigénio e as defesas antioxidantes. Os radicais livres são continuamente produzidos durante eventos fisiológicos normais e atacam macromoléculas, incluindo as proteínas, o ADN, e os lipídios, causando danos nos tecidos. Os organismos têm desenvolvido mecanismos de defesa antioxidante a fim de remover esses radicais livres. Nas defesas celulares antioxidantes estão incluídas enzimas: como a glutathione, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione redutase, a peroxidase e a catalase (Halliwell, 1994; Betteridge, 2000) (figura 11).

Existe um grande número de agentes que fazem disparar a produção de ROS. Um aumento dos níveis de ROS pode constituir um sinal de stresse, que activa as vias de sinalização específicas e sensíveis a redução. Uma vez activadas, estas vias de sinalização podem ficar danificadas, principalmente as funções potencialmente protectoras (Finkel e col., 2000).

As ROS estão implicadas na patogénese de várias doenças (Stratta e col., 1991). A peroxidação lipídica é a deteiorização oxidativa dos lipídios poli-insaturados, resultando na formação de endoperóxidos estereoespecíficos e hidroperóxidos, por envolvimento enzimático ou não enzimático de ROS. Estas espécies resultam da exposição a uma larga variedade de drogas, de agentes químicos e ambientais, ou de processos metabólicos normais que podem dar início à peroxidação de lipídios da membrana (Chakraborty e col., 2007).

INTRODUÇÃO

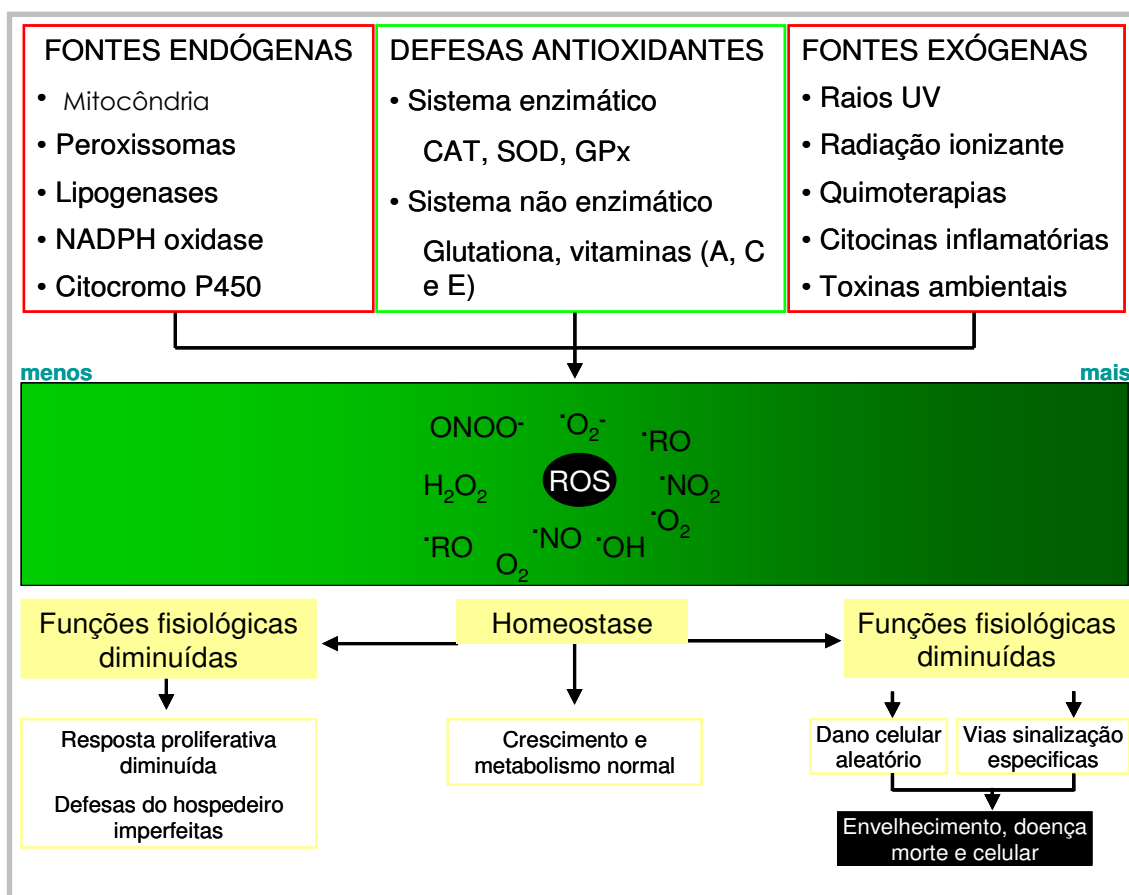


Figura 11 – As fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Finkel e col., 2000.

As ROS são geradas como resultado do metabolismo intracelular nas mitocôndrias e peroxissomas, assim como de uma variedade de sistemas enzimáticos no citoplasma (Finkel e col., 2000). No entanto, a maior fonte de produção de ROS é o complexo III da cadeia fosforilativa nas mitocôndrias.

Está bem descrito o envolvimento de espécies de oxigênio em muitas doenças, como a inflamação crónica, úlceras, cancro, reumatismo, isquémia e aterosclerose (Cimen e col., 2003).

Estudos prévios revelaram que alguns Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) podem *in vitro*, diminuir a produção de radical superóxido (O_2^\cdot) por fagócitos activados e também remover radicais hidroxilo (HO^\cdot) por mecanismos antioxidantes (Cimen e col., 2003).

O começo da carcinogénese mediada por espécies reativas de oxigênio intermediárias (ROI) e espécies reativas de azoto intermediárias (RNI), seguido de inflamação crónica, pode ser directo (oxidação, nitração, halogenação do ADN nuclear,

ARN e lipídios), ou pode ser mediado por produtos ROI-RNI e proteínas, lipídios e hidratos de carbono que são capazes de formar aductos no ADN (Federico e col., 2007).

1.5.2. O processo inflamatório

As células inflamatórias segregam um grande número de citocinas e quimiocinas que promovem o crescimento descontrolado de células neoplásicas, além da produção do factor de crescimento autócrino pelas células do tumor. As ROI e RNI são produzidas por estímulos de citocinas pró-inflamatórias em células fagocitárias e não fagocitárias, com activação da sinalização de cinases. Por exemplo, o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) realça a formação de ROI pelos neutrófilos, enquanto a interleucina-1 β (IL-1 β), o TNF- α e o interferão- γ (IFN- γ) estimulam a expressão da enzima monóxido de azoto sintase (NOS) em células inflamatórias e epiteliais (Federico e col., 2007).

A produção de IL-6 é estimulada pela PGE₂ derivada da ciclooxigenase-2 (COX-2), que é elevada nos macrófagos. A inflamação crónica é associada a uma fase próxima da angiogénese. Os macrófagos, as plaquetas, os fibroblastos e as células tumorais são as principais fontes de factores angiogénicos, tais como o factor de crescimento básico de fibroblastos, o factor de crescimento endotelial vascular, e as prostaglandinas 1 e 2 (à excepção das citocinas inflamatórias, quimiocinas e NO). Foi demonstrado que as prostaglandinas derivadas do metabolismo oxidativo do ácido araquidónico em células inflamatórias contribuem para o desenvolvimento do cancro (Federico e col., 2007).

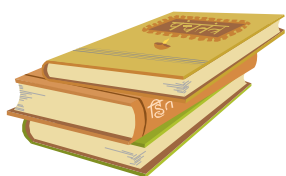
A COX-2 é induzida em locais de inflamação. Além disso, está envolvida noutras funções, como na resposta imune e em mecanismos de tolerância imune durante a implantação de blastocistos. A COX-2 também é expressa em neoplasias (Fosslien, 2000). A síntese de prostaglandinas tumorais pela via de sinalização da COX-2 leva à estimulação da proliferação celular em cancros, à inibição da apoptose, aumento da indução de cancro na angiogénese (Tsuji e col., 1998) e invasão (Tsuji e col., 1997).

A COX-2 pode ser induzida por factores químicos e físicos durante a inflamação. Promotores de tumor, citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacaridos (LPS) e factores de crescimento podem regular a expressão da COX-2 a nível da transcrição e

INTRODUÇÃO

.....
pós-transcrição (Chen e col., 1997). O factor de crescimento epidermal (EGF), o factor de transformação do crescimento beta (TGF- β), o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 α e 1 β (IL-1 α e IL-1 β) e o monóxido de azoto induzem a COX-2. Mais importante, o EGF, o TGF- β , e os seus receptores, assim como o iNOS, emergem significativamente como indutores da COX-2 na carcinogénese (Fosslein, 2000).

Mais ainda, a IL-1 induz o mARN da COX-2 nos locais de inflamação. A IL-1 β tem sido detectada “junto” da COX-2 na base da úlcera gástrica em ratos, mas não no tecido adjacente intacto. A expressão da COX-2 em culturas celulares da base da úlcera tem sido reduzida pelo bloqueio da IL-1 β , indicando que esta induz a COX-2 na renovação da úlcera. O mesmo processo foi usado para o TNF- α e o TGF- β 1, verificando-se resultados idênticos à IL-1 β (Fosslein, 2000).



Em suma, o desenvolvimento tumoral parece estar intimamente associado a estímulos inflamatórios.

1.6. Modelo animal de indução de carcinoma da bexiga por N-Butil-N-(4-hidroxiutil)nitrosamina (BBN)

A exposição excessiva do homem ao fumo do cigarro e a substâncias químicas industriais (ambos incluem aminas), foi descrita como sendo o principal factor de risco para o desenvolvimento de cancro da bexiga, em ambos os sexos. Em modelos experimentais parece ser mais provável que fêmeas e machos desenvolvam de forma semelhante cancro da bexiga induzido por certos carcinogénios químicos, como por exemplo, as aminas aromáticas, designadamente N - butil - N - (4-hidroxiutil)nitrosamina (BBN). Em contraste, um estudo recente mostrou que alguns carcinogénios, como o metabolito arsénico ácido dimetilarsínico, seriam mais tóxicos à bexiga feminina que à bexiga masculina em ratos. Este achado é consistente com evidências epidemiológicas que sugerem que as mulheres são mais susceptíveis para cancro da bexiga induzido pelo metabolito arsénio que os homens. Assim, a base para a diferença dependente do sexo na incidência de cancro da bexiga ainda não é entendida (Miyamoto e col., 2007).

O BBN é uma substância orgânica, líquida a 20°C, com uma aparência límpida e uma coloração amarelada. Tem o seu ponto de ebulição a 167°C/0,7 kPa, e apresenta-se como uma substância de elevada toxicidade. Os seus principais produtos de decomposição são o monóxido e dióxido de carbono e os óxidos nítricos (NO_x).

Os compostos N-nitrosos são derivados de aminas, amidas secundárias e ureias. São imediatamente formados no tracto digestivo pela reacção de uma amina secundária com um nitrito. O nitrito, por sua vez, pode ser formado na boca por redução bacteriana de nitrato. Estas substâncias requerem mobilização a nível hepático para bom funcionamento do organismo. Os compostos N-nitrosos são quase todos potentes carcinogénios. Contudo, o órgão alvo varia entre espécies e entre compostos (Bartsh e col., 1987).

As nitrosaminas são compostos N-nitrosos derivados de aminas secundárias ou cíclicas (por exemplo, o BBN), activadas por hidroxilação num carbono adjacente ao azoto. Isto resulta na quebra da ligação carbono-azoto, originando um ião diazónio e, por conseguinte, um ião carbónio, sendo que ambos são potentes agentes alquilantes. Este é o mecanismo geral de formação de todas as nitrosaminas (O'Neil e col., 1991).

INTRODUÇÃO

A primeira vez que o efeito carcinogénico do BBN foi descrito decorria o ano de 1964. Os primeiros estudos descrevem tumores ao nível da bexiga em modelos animais, nomeadamente em ratos. Desde então esse modelo experimental tem sido usado por muitos investigadores para estudar a histogénese e os efeitos de vários agentes na carcinogénese e proliferação de tumores da bexiga. Em experiências seguintes foi descrito que a administração diária de BBN (0,05%) em ratos, ao longo de oito semanas, conduzia a desenvolvimento de tumores da bexiga (Osawa, 1999).

Os modelos experimentais de carcinoma da bexiga quimicamente induzidos em ratos podem ser excelentes ferramentas para o estudo de mecanismos de carcinogénese, devido à sua constante herança genética, etiologia e ampla definição do nível de desenvolvimento tumoral. Por outro lado, a ingestão oral, a excreção renal e a acumulação intravesical de agentes carcinogénicos – como o BBN – representam uma vantagem para a sua utilização nestes modelos (El-Marjou e col., 2000).

O tratamento de ratos com OH-BBN resulta no desenvolvimento de cancro da bexiga com células transicionais e escamosas, que têm marcadas semelhanças a nível histopatológico com a doença humana, tendendo a ser invasivos. 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 (Grubbs e col., 2000).

A nitrosamina induz especificamente o carcinoma da bexiga, exibindo diferenciação urotelial, escamosa ou anaplásica. Em ratinho ocorre a indução de carcinoma *in situ* que, com o tempo, atinge o estadio de carcinoma invasivo. Já em ratos, os tumores desenvolvidos são maioritariamente superficiais (El-Marjou, 2000). Foram relacionados estas fases com as possíveis alterações genéticas identificadas nos carcinomas, sendo que a principal alteração era nos genes supressores de tumores, como o p53, tornando-se assim um dos principais promotores tumorais (Hongzhong, 1997).

A indução de carcinoma da bexiga em ratos por BBN proporciona o aparecimento de tumores papilares que, uma vez em crescimento, se diferenciam num estado invasivo, afectando outros parâmetros. Este perfil é muito idêntico ao evidenciado no ser humano (Kunze e col., 1977).

2 - Inibidores selectivos das COXs: Acção anti-carcinogénica

2.1. As Isoenzimas Ciclooxygenases

2.1.1. Prostaglandinas

A conversão do ácido araquidónico (AA) em prostaglandinas (PGs), por acção das coclooxygenases (COX) é o primeiro passo da via de formação de PGs e tromboxanos (figura 12). Nos homens existem duas isoformas da COX. A COX-1 é normalmente expressa em quase todos os tecidos (Celik-Ozenci e col., 2006), enquanto a COX-2 é expressa em resposta a vários estímulos, particularmente em associação com respostas inflamatórias. As prostaglandinas assim formadas estão associadas a diferentes funções fisiológicas e fisiopatológicas em vários tecidos, nomeadamente ao nível dos mecanismos membranares, comunicação celular, modelação na síntese de ADN e ARN, predisposição a neoplasias por invasão aumentada, metástases, proliferação celular e respostas hormonais, como na angiogénese (Basler e col., 2004).

As prostaglandinas são pois potentes mensageiros lipídicos bioactivos (Simmons e col., 2004). A COX também protagoniza a redução de prostaglandina G₂ (PGG₂) a prostaglandina H₂ (PGH₂). Uma vez que as reacções enzimáticas da COX não precisam de ATP para ocorrerem, passou a designar-se prostaglandina sintase em vez de sintetase. A enzima COX, também conhecida como prostaglandina H sintase (PGHS) ou prostaglandina endoperoxidase sintase (E.C.1.14.99.1), foi identificada como a principal enzima no seu estado oxidativo na conversão de AA a PGG₂ e PGH₂ (Simmons e col., 2004).

INTRODUÇÃO

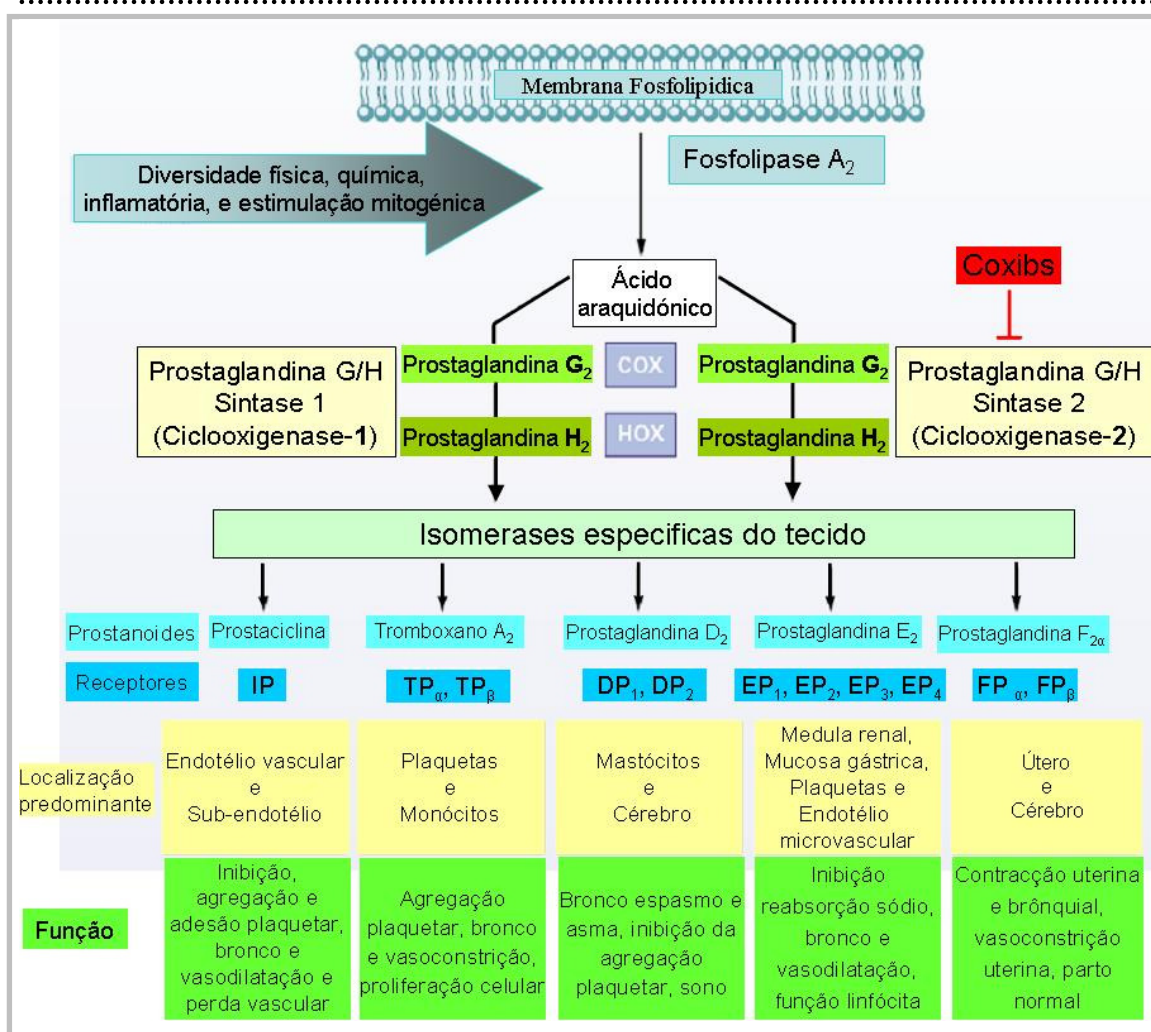


Figura 12 – Produção e acção das prostaglandinas e tromboxanos.

Fonte: Adaptado de Simmons e col., 2004; Rajakariar e col., 2006.

Legenda: O ácido araquidónico é convertido através da prostaglandina sintase G/H citosólica que tem actividade ciclooxigenase (COX) e hidroperoxidase (HOX) para o intermediário instável prostaglandina H₂. Esta sofre rearranjos espontâneos ou é enzimaticamente isomerada, oxidada ou reduzida para originar os isómeros de prostaglandinas bioactivos mostrados.

2.1.2. As ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2)

As isoformas 1 e 2 são codificadas pelos genes COX-1 e COX-2, respectivamente, exibindo 61% de homologia, pois têm origem no mesmo ancestral (Fosslien, 2000). A nível estrutural, as COXs possuem vários domínios que permitem a sua funcionalidade: de sinalização péptida do terminal amino, de dimerização, de ligação à membrana e catalítico. De ressaltar que é no domínio catalítico que ocorre a interacção da COX com a PGG₂ (ou outros peróxidos lipídicos), sendo composto por duas partes distintas.

INTRODUÇÃO

Uma diferença estrutural crucial entre os locais activos da COX-1 e COX-2 é uma substituição da isoleucina 523 na COX-1 por uma valina na COX-2. É esta diferença na COX-2 que faz com que só possa ser acedida por algumas drogas selectivas (Simmons e col., 2004).

Actualmente, são vários os inibidores das COXs. No entanto, uns inibir só uma ou as duas COXs, dependendo das doses (os AINEs, como a Aspirina), enquanto uma outra geração designada de inibidores selectivos da COX-2 (Coxibes) só inibe a COX-2 (figura 13).

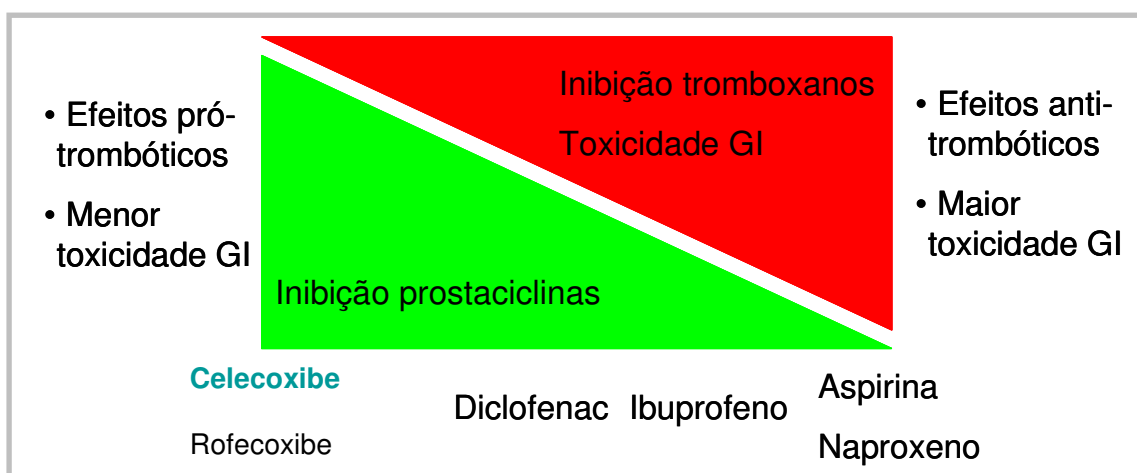


Figura 13 – Espectro e actividade biológica dos inibidores da COX. Cada agente tem um potencial efeito diferente na síntese de PGI₂ e tromboxano.

Fonte: Adaptado de Mukherjee, 2002.

2.2. Os inibidores da COX-1

Em 1971, John Vane descreveu que a aspirina e outras drogas anti-inflamatórias não esteróides (AINEs), inibiam a actividade da enzima prostaglandina G/H sintase (PGHS), também denominada de ciclooxigenase. Desde a original descoberta de Vane, a COX tem sido ligada a determinados processos fisiológicos e patológicos (atrás referidos), e a sua inibição pelos AINEs reduz sintomas associados a vários processos inflamatórios (Vane, 1971). Com efeito, os AINEs têm sido a classe de drogas mais requisitadas no advento da farmacoterapia.

Contudo, como a maioria dos fármacos, os AINEs não são livres de riscos. Alguns dos seus efeitos – dispepsia, gastrites, úlceras pépticas, hemorragias gastrintestinais, ataque hemorrágico, úlceras de perfuração gastroduodenal – são defeitos que envolvem a alteração da integridade da mucosa intestinal. Mais ainda, os

INTRODUÇÃO

.....
AINEs também afectam negativamente o tratamento das úlceras (Wolfe e col., 1999). Assim, a COX-1 é necessária à manutenção dos níveis basais de PGs que protegem a mucosa gástrica. Já a produção de PGs em processos inflamatórios e de mitogénese ocorre especialmente por acção da COX-2 (Williams e col., 1999). Consequentemente, os efeitos adversos dos AINEs foram associados somente à inibição da COX-1 na mucosa gástrica, enquanto os efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e anti-analgésicos foram associados à inibição da COX-2.

A isoforma COX-1 é expressa na maioria das células, originando uma produção homeostática de prostaglandinas, que mantêm a integridade da mucosa intestinal, assim como do fluxo sanguíneo renal. Também é expressa nas plaquetas e medeia a produção de tromboxano A₂, que é um potente activador da agregação plaquetar.

Os AINEs (e a aspirina) têm mostrado actividade promissora na prevenção do cancro, interferindo com a síntese das prostaglandinas pela inibição da COX, a chave de efeitos terapêuticos e secundários (figura 14). Os AINEs inibem o crescimento de cancro em células *in vitro*, inibindo a formação de tumores em roedores induzidos por carcinogénios. Contudo, os efeitos colaterais dos AINEs limitam o seu potencial como agentes quimiopreventivos de tumores (Stark e col., 2001).

2.2.1. O ácido acetilsalicílico (AAS)

O ácido acetilsalicílico é um anti-inflamatório não esteróide também designado por ácido 2-acetiloxibenzóico, acetilsalicilato e aspirina. A fórmula empírica é C₉H₈O₄ e tem um peso molecular de 180,157 g/mol (figura 14). O ácido acetilsalicílico é uma das drogas mais utilizadas, com um consumo médio de 30 gramas por indivíduo, em países industrializados (Amann e col., 2002). O ácido acetilsalicílico é uma droga usada frequentemente como analgésico (alívio de dores), como antipirético (redução da febre) e como anti-inflamatorio. O ácido acetilsalicílico tem igualmente um efeito antiagregante, ou anticoagulante, inibindo a via do tromboxano A₂, que em circunstâncias normais contribui para reparar danos nos vasos sanguíneos (Lewis, e col., 1983).

INTRODUÇÃO

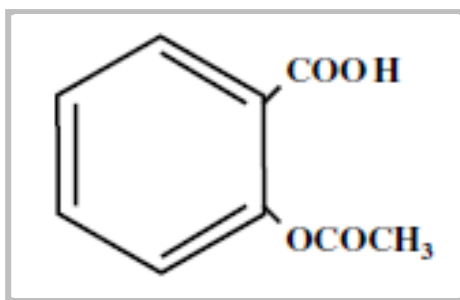


Figura 14: Representação da estrutura química do ácido acetilsalicílico.
Fonte: Tesei e col., 2008.

i) Propriedades farmacodinâmicas

O AAS inibe irreversivelmente a COX-1 e modifica a actividade enzimática da COX-2. Em condições normais, a COX-2 produz prostanóides; no entanto, quando inibida pelo AAS, ocorre modificação da COX-2, levando a produzir lipoxinas (Warnere col., 2002). Assim, o AAS tem a capacidade de suprimir a produção de prostaglandinas e de tromboxanos. O AAS actua como um agente de acetilação onde um grupo acetil se une covalentemente a um resíduo de serina no local activo da enzima COX. Isto faz com que o AAS seja diferente de outros AINEs (tal como o diclofenac e o ibuprofen), que são inibidores reversíveis (Tohgi e col., 1992).

O uso a longo prazo de AAS em baixas doses obstrui irreversivelmente a formação de tromboxano A₂ nas plaquetas, produzindo um efeito inibitório na agregação plaquetar. Esta propriedade anticoagulante faz com que este composto tenha uma enorme utilidade na redução da incidência de ataque cardíaco. Com efeito, sabe-se que 40 mg de AAS por dia podem inibir uma grande porção da libertação máxima de tromboxano A₂ de forma aguda, sem afectar grandemente a síntese de prostaglandina I₂ (Tohgi e col., 1992).

ii) Propriedades farmacocinética

O ácido acetilsalicílico é hidrolisado no estômago e no sangue a ácido salicílico e a ácido acético, sendo o tempo de meia-vida biológico apenas de 20 minutos. O ácido salicílico é fracamente solúvel nas condições ácidas do estômago, o que pode levar a atrasos na absorção de altas doses (de 8 a 24 horas). Além disso, como o pH no intestino é mais elevado, o AAS é rapidamente absorvido pelo aumento da área de absorção (Ferguson e col., 1970; Levy e col., 1972).

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 50-80% do salicilato no sangue está ligado a proteínas, enquanto o restante permanece activo no estado ionizado; a ligação a proteínas é dependente da concentração. O volume de distribuição é de 0.1-0.2 l/kg (Levy e col., 1972).

O salicilato é metabolizado no fígado, mas a principal via de eliminação é a renal (Hartwig-Otto e col., 1983). A eliminação renal é em ácido salicílico livre e metabólitos conjugados: 75% na forma de ácido salicílico; 15% na forma de glucurónicos; 10% na forma de ácido salicílico.

Quando pequenas doses (menos de 250 mg/adulto) são ingeridas, o tempo de meia vida de eliminação é de aproximadamente 2 a 4,5 horas. Quando são ingeridas doses mais elevadas de salicilato (mais de 4 g), ocorrem tempos de meia vida muito mais longos (15-30 horas) (Chyka e col., 2007).

2.2.2. Estudos de potencial efeito anti-tumoral do ácido acetilsalicílico

O papel do AAS em reduzir a incidência de muitos tipos de cancro tem sido intensamente estudado. Em diversos estudos, o uso de AAS não reduziu a incidência de cancro da próstata. Os seus efeitos no cancro pancreático são díspares. Schernhammer e col. (2004), encontraram um aumento estatisticamente significativo no risco de cancro pancreático com AAS, em mulheres. Larsson, em 2006, publicou uma meta-análise em que não encontrava nenhuma evidência entre o AAS e outros AINEs associados ao aumento do risco da doença. A droga pode ser eficaz na redução do risco de vários cancros, incluindo o colón (Thun e col., 1991; Chan e col., 2004; Chan e col., 2005) e o pulmão (Caine e col., 2002; Van Dyke e col., 2008). O seu efeito preventivo em adenocarcinomas pode ser explicado pela inibição expressão da COX-2 (Wolff e col., 1998).

Num artigo publicado em 2009 por Imaeda e colegas, verificou-se que o AAS pode impedir danos no fígado que eram causados por doses excessivas de acetaminofeno. Este composto induz hepatotoxicidade e morte celular por um aumento de TLR9, que por sua vez, activava uma cascata inflamatória, envolvendo a pro-IL-1 β e a pro-IL-18. O AAS teve um efeito protector nos hepatócitos porque conduziu a um "abaixamento de citocinas" proinflamatorias.

Não existem dados sobre o efeito do AAS no tumor da bexiga.

2.3. Inibidores selectivos da COX-2 (Coxibes)

Para minimizar os efeitos dos AINEs, e maximizar os potenciais terapêuticos na inibição da actividade da COX-2, foram desenvolvidos inibidores selectivos da COX-2, apelidados abreviadamente de Coxibes. Esta hipótese inicial muito simplista (COX-1 boa – COX-2 mau), revela-se na prática bem mais complexa do que originalmente se pensou (Yong e col., 2007).

O desenvolvimento dos Coxibes permitiu pois colmatar as deficiências originadas pelos AINEs ao nível gastrointestinal. Assim, apesar de ambos os grupos inibirem a prostaglandina sintase G/H, a enzima que catalisa a reacção do ácido araquidónico em prostaglandinas e tromboxano, sabe-se que os AINEs inibem as duas isoformas da COX, enquanto os coxibes são específicos na inibição da COX-2 (Wood e col., 2001).

O principal objectivo no desenvolvimento de novos AINEs é atingir uma melhor tolerância gástrica e reduzir a incidência de disfunção renal e plaquetar (Fosslien, 2000). Assim, modificações químicas da estrutura molecular de AINEs não selectivos têm conduzido a compostos que selectivamente inibem a COX-2 (Ledro Cano e col., 1999). Por outro lado, a COX-2 produz prostaglandinas nos locais de inflamação, como a PGI₂, que é um vasodilatador e inibidor da agregação plaquetar. Inibidores selectivos da COX-2 não tem efeito na produção de tromboxano A₂ mas, uma vez que inibem a produção de PGI₂, podem alterar o balanço natural entre o pró-trombótico tromboxano A₂ e o antitrombótico PGI₂, o que poderá estar relacionado com o aumento de eventos trombóticos cardiovasculares (Mukherjee, 2002). Com efeito, várias pesquisas apontam para um efeito cardioprotector da COX-2 em potencial detrimento dos inibidores da COX-2 (Mukerjee, 2002). Inibidores da COX-2 têm sido associados a um aumento da pressão sanguínea, levando ao desenvolvimento de hipertensão (Mukerjee, 2002).

As citocinas de inflamação primária (como o TNF- α , a IL-1 α e a IL-1 β) induzem o gene da COX-2 de forma a ser produzida COX-2 que, por sua vez, sintetiza PGs pró-inflamatórias. A COX-2 é altamente induzível por citocinas pró-inflamatórias e factores de crescimento nos locais de inflamação, onde a enzima sintetiza PGs pró-inflamatórias envolvidas na inflamação, febre e dor. A IL-1 β tem sido detectada juntamente com a COX-2 ao longo da base de úlceras gástricas em ratos, mas não no tecido adjacente intacto. A expressão da COX-2 em culturas celulares da base de úlceras

INTRODUÇÃO

.....
é reduzida pelo bloqueio da IL-1 β , indicando que é responsável pela indução da COX-2 no aparecimento da úlcera (Fosslien, 2000).

Outras citocinas pró-inflamatórias, como o factor alfa de necrose tumoral (TNF- α) e o factor de crescimento transformante beta 1 (TGF- β), também influenciam a acção da COX-2 no aparecimento de úlceras gástricas em modelo de rato. Tal como a IL1- β , estes factores também só aparecem juntamente com a COX-2 na base da úlcera e não no tecido adjacente intacto, indicando que o TNF- α e o TGF- β induzem a COX-2 (Fosslien, 2000).

Uma das PGs produzidas em doses elevadas em ambientes de tumor é a PGE₂, que se pensa desempenhar um importante papel na progressão do cancro.

Inibidores selectivos da COX-2 estão constantemente sob estudo para avaliar o seu potencial papel em prevenir o cancro da próstata em pacientes de alto risco, ou recorrência ao cancro da bexiga. Vários estudos suportam o conceito que inibidores da COX-2 reduzem o risco em vários cancros. Especificamente, o celecoxibe demonstra capacidade de regressão de pólipos (Basler e col., 2004).

2.3.1. O Celecoxibe

O celecoxibe é um coxibe quimicamente designado por 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1-H-pirazol-1-il] benzenossulfonamida, e é um pirazole diaril substituído. A fórmula empírica é C₁₇H₁₄F₃O₂S e tem um peso molecular de 318,38 (figura 15).

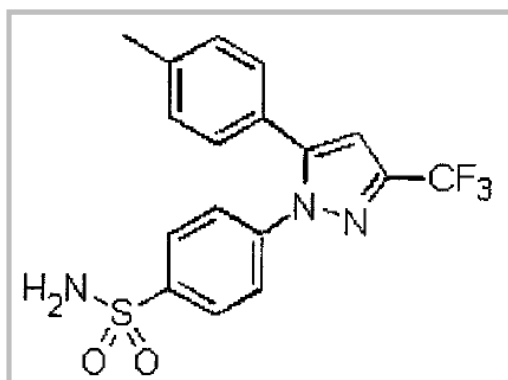


Figura 15 – Representação da estrutura química do celecoxibe.
Fonte: Hood e col, 2003.

INTRODUÇÃO

O celecoxibe é um fármaco selectivo para COX-2, evidenciando acções anti-inflamatórias, analgésicas, e actividades antipiréticas em modelos animais. O mecanismo de acção é a inibição da síntese das prostaglandinas, primariamente pela via da inibição da Ciclooxygenase-2 (COX-2), e que em concentrações terapêuticas em humanos não inibe a isoenzima Ciclooxygenase-1 (COX-1). Encontra-se no mercado com o nome CELEBREX[®] e tem como principais indicações terapêuticas: alívio sintomático da osteartrose e da artrite reumatóide; administração da dor aguda em adultos; tratamento primário de dismenorreia e reduzir o número de pólipos coloreticais em pólipos adenomatosos familiares (Familiar Adenomatous Familial - FAP).

O celecoxibe não é mutagénico (teste de Ames) nem carcinogénico. Este dado foi testado para doses acima de 200 mg/kg em ratos machos e 10 mg/kg em ratos fêmeas.

i) Propriedades farmacodinâmicas

O Celecoxibe pertence ao grupo farmacoterapêutico dos inibidores selectivos da COX-2. Está provado cientificamente que têm actividade inibitória selectiva da COX-2 no intervalo de doses terapêuticas (200-400 mg por dia), não se observando inibição estatisticamente significativa da COX-1 neste intervalo.

A COX-2 encontra-se também envolvida na ovulação, na implantação e no encerramento do canal arterial, regulação da função renal e funções do sistema nervoso central. O celecoxibe reduz a formação de prostaciclina sistémica (e possivelmente também da endotelial) sem afectar o tromboxano das plaquetas.

ii) Propriedades farmacocinéticas

O celecoxibe, pela sua natureza química, é bem absorvido, atingindo a concentração plasmática máxima após cerca de 2-3 horas (tabela 2). O fármaco apresenta, no intervalo de doses terapêuticas, uma farmacocinética independente da dose e do tempo e dependente do tipo de indivíduo (figura 16). Em concentrações plasmáticas terapêuticas, a ligação às proteínas plasmáticas (preferencialmente à albumina e menos quantidade à glicoproteína α_1) é cerca de 97%, e o fármaco não se encontra ligado preferencialmente aos eritrócitos. A baixa solubilidade da droga prolonga a absorção levando a um tempo de semi-vida de eliminação de 8-12 horas. As concentrações plasmáticas no estado estacionário são atingidas após cinco dias de tratamento. A propriedade farmacológica reside no próprio fármaco, já que os principais

INTRODUÇÃO

metabolitos encontrados na circulação não apresentam qualquer actividade inibitória da COX-1 e COX-2.

O celecoxibe é eliminado preferencialmente pelo metabolismo hepático com pequenas (<3%) alterações da droga na urina e fezes. Aproximadamente 57% da dose é excretada nas fezes e 27% na urina.

Tabela 2: Propriedades farmacocinéticas e interações medicamentosas do Celecoxibe.

Características	Celecoxibe
Biodisponibilidade oral (%)	22-40
Tempo para a máxima concentração plasmática (horas)	2-4
Tempo meia vida de eliminação (horas)	Aproximadamente 11
Volume de distribuição (mL)	455±166
Ligação a proteínas plasmáticas (%)	>97
Principal caminho no metabolismo hepático	Oxidação pelo citocromo P-450 2C9, 3A4
Interação com inibidores do citocromo P450	Sim
Interação com anti-hipertensores	Aumento da pressão sanguínea
Influência na função renal	Baixa em 43% (AUC)

Fonte: Adaptado de Wood e col., 2001.

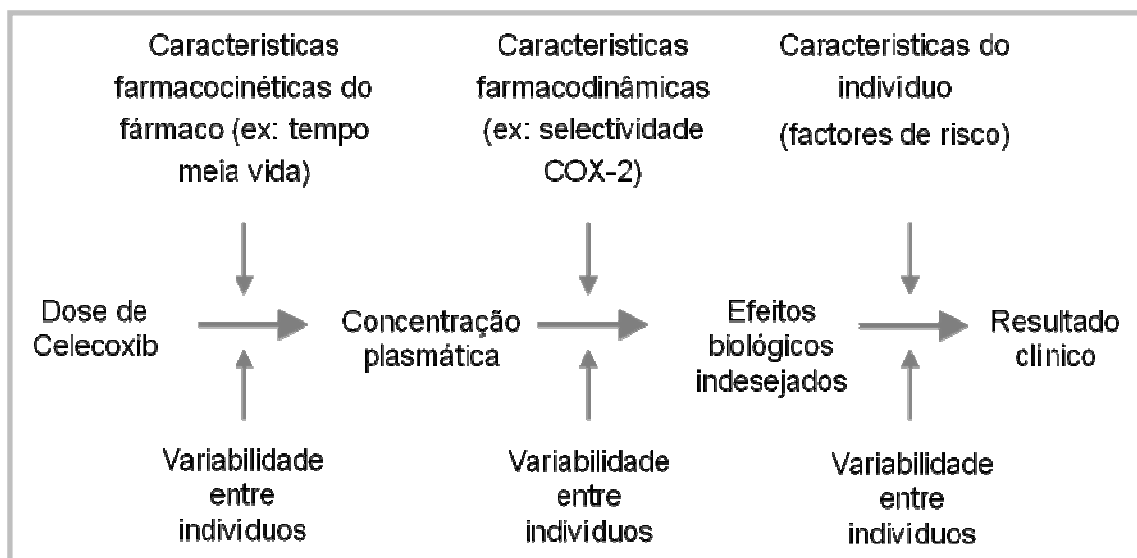


Figura 16 – Factores que podem influenciar a selectividade clínica e segurança do Celecoxibe em cada indivíduo.

Fonte: Adaptado de Wood e col., 2001.

2.4. Estudos de potencial efeito anti-tumoral dos Coxibes

Para além do seu uso como anti-inflamatórios, os AINEs têm mostrado uma redução no risco de certos cancros. No entanto, a questão permanece intacta: quais são os mecanismos envolvidos nesses efeitos benéficos? Desde 1994 que níveis de COX-2 aparecem sobre regulados em vários epitélios tumorais, como na mama, estômago, pâncreas, bexiga, pulmões e próstata. Tendo em conta que um dos mecanismos primários de acção dos AINEs é a inibição da COX-1 e da COX-2, foi inicialmente postulada a hipótese de que os efeitos benéficos serem, em parte, mútuos, muito por força da inibição também de COX-2 no micro-ambiente do tumor. Com base nesta hipótese, várias manipulações genéticas, farmacológicas e moleculares, têm “travado” a actividade e a expressão da COX-2, diminuindo a formação de tumores em modelos animais e humanos. Assim, demonstra-se que a COX-2 é um alvo benéfico na inibição da progressão tumoral, tendo a COX-2 um importante papel na progressão do tumor. Contudo, os AINEs e coxibes também afectam outros alvos “não-COXs”, que podem ter alguns efeitos quimiopreventivos (Young e col., 2007).

INTRODUÇÃO

A COX-2 está relacionada com a regulação tumoral, associando-se à angiogénese, modulação do sistema imunitário, regulação da migração/invasão celular e inibição da apoptose. Existem outros produtos da via da COX-2, como o malondialdeído, que directamente forma aductos no ADN, resultando em mutações que podem dar início a um processo carcinogénico. Todos estes efeitos estimulam a progressão tumoral e ajudam a explicar o papel pró-neoplásico da COX-2 (Young e col., 2007).

Uma das PGs produzidas em doses elevadas em ambientes de tumor é a PGE₂, que se pensa desempenhar um papel importante na progressão do cancro. Inibidores selectivos da COX-2 estão constantemente sob estudo para avaliar o seu potencial papel em prevenir o cancro da próstata em pacientes de alto risco, ou recorrência ao cancro da bexiga. Vários estudos suportam o conceito que inibidores da COX-2 reduzem o risco em vários cancros.

Tem sido sugerido que os inibidores da COX-2 têm efeitos anti-neoplásicos em culturas celulares e modelos de tumor em animal, onde tipicamente são usadas concentrações que excedem as dosagens de tratamento em condições de tratamentos inflamatórios. Foi descoberto que uma concentração mínima de 40-60 µM de Celecoxibe é requerida para inibir a expressão da proteína anti-apoptótica survivina, estimulando a apoptose em culturas celulares de glioblastoma. Estudos recentes têm indicado que o tratamento celular com celecoxibe está ligado à resposta do stresse no retículo endoplasmático (ESR) (Pyrko e col., 2007).

Quando os efeitos anti-tumor do celecoxibe são estudados em culturas celulares in vitro são normalmente requeridas concentrações na ordem dos 30-100 µM de modo a inibir substancialmente o crescimento ou indução de apoptose em células tumorais (Pyrko e col., 2007).

Tem sido verificado que uma alta expressão da COX-2 e prostaglandinas E(2) (PGE(2)) demonstram um papel significativo na tumorogénese do cólon, pulmões, peito, bexiga e cancro de pele e vários tipos celulares.

Eis alguns dos tumores nos quais a COX-2 tem sido implicada:

Neoplasias do cólon rectal

Muitas descobertas tem mostrado que o maior efeito anti-carcinogénico ocorre pela inibição da COX-2. Será importante referir que o mARN da COX-2, mas não da COX-1, e a sua proteína se encontram elevados nos neoplasmas do cólon rectal

INTRODUÇÃO

.....
humano. A COX está aumentada 2 a 5 vezes em 85 a 90% dos casos (Smalley e col., 1997). Os tumores maiores produzem significativamente mais COX-2 que o pequenos tumores. Mais importante, os tumores profundos e invasivos, mas não as metástases, estão associados a altos níveis de COX-2 (Fujita e col., 1998). A expressão da COX-2 é particularmente mais evidente em tumores com extensão nos nódulos linfáticos.

ii) Cancro da mama

In vitro a expressão da COX-2 é alta em cancro metastático e altamente invasivo nas linhas celulares MDA-MB-231. Em contraste, é muito mais baixo em cancros da mama invasivos dependentes de estrogénio nas linhas celulares MCF-7 (Liu e col., 1996). Uma expressão alta da COX-2 leva à síntese e libertação de substâncias que induzem a expressão da COX-1 nas células estromais adjacentes (Fosslein, 2000).

iii) Cancro do pulmão

O mRNA da COX-2 é expresso no carcinoma do pulmão, mas mais em adenocarcinomas que em carcinoma de células escamosas. Para além disso, a COX-2 foi detectada em epitélios alveolares atípicos que são considerados precursores malignos nos pulmões (Fosslein, 2000).

iv) Cancro hepatocelular

A expressão primária no cancro do fígado pode estar relacionada com a diferenciação tumoral. Pela técnica de imunomarcção da COX-2, verificou-se que era mais alta em tecidos cancerígenos que nos correspondentes tecidos não cancerígenos (Koga e col., 1999). Em 2007, Fantappiè e seus colaboradores descobriram que o celecoxibe induz a libertação do citocromo c, activação das caspases 9 e 3, e eventualmente, apoptose em células com cancro hepatocelular.

v) Cancro da pele

O método de imunomarcção usado em biopsias de carcinoma celular escamoso de pele, mostrou um grande aumento na coloração da proteína COX-2 comparada com a pele não exposta ao sol (Buckman e col., 1998).

vi) *Cancro gástrico*

Têm sido reportadas descobertas de elevados níveis de COX-2 em tumores gastrintestinais. No entanto, não existe correlação entre a sua expressão e a histologia. Mais ainda, os seus níveis nos tumores são significativamente correlacionados com os parâmetros tumorais na classificação TNM, mas não pelos parâmetros histopatológicos (Fosslein, 2000).



Tendo em conta as vastas evidências do envolvimento das COXs em processos de desenvolvimento neoplásico, e mesmo em estudos do papel dos inibidores da COX-2 em alguns tumores, será importante averiguar se estes compostos são eficazes na prevenção/atenuação do carcinoma da bexiga.



B – OBJETIVOS

Estudos epidemiológicos têm mostrado que compostos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) talvez possam desempenhar um papel importante na prevenção de tumores no homem. O aparecimento de elevadas concentrações de prostaglandinas, sobretudo de prostaglandina E₂, em zonas de lesão neoplásica, reforça aquela ideia. Um número de estudos pré-clínicos tem sugerido que a inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) tem um efeito anti-tumoral no cólon, pele e mama, em modelos animais.

Os Celecoxibes (inibidores selectivos da COX-2) são anti-inflamatórios não esteróides, que tem como principais indicações terapêuticas o alívio sintomático em processos inflamatórios, nomeadamente na osteartrose ou da artrite reumatóide, mas que têm apresentado importantes efeitos anti-tumorais em outros carcinomas.

O ácido acetilsalicílico é um anti-inflamatório não esteróide que inibe a COX-1, e tem como indicações terapêuticas o alívio da dor (analgésico), a redução da febre (antipirético) e anti-inflamatorio. Porém, tem sido associado a uma redução do desenvolvimento tumoral. Este fármaco é inibidor da COX-2, mas somente em doses elevadas.

Assim, pelas características que apresentam, nomeadamente no que diz respeito aos mecanismos de acções selectivos, os Celecoxibe e o AAS poderão ser fármacos com potencial efeito preventivo e/ou curativo/regressivo do desenvolvimento do carcinoma da bexiga.

Neste contexto, o objectivo do presente estudo consistiu em avaliar as potencialidades destes fármacos na inibição do desenvolvimento na progressão do carcinoma da bexiga em ratos, induzido por um agente carcinogénico (uma nitrosamina). Foram estabelecidas três fases:

1. Caracterização e validação do modelo de carcinoma de bexiga induzido por nitrosamina em rato Wistar macho;
2. Avaliação da capacidade do celecoxibe na prevenção e/ou regressão do desenvolvimento do carcinoma da bexiga em rato.
3. Avaliação da capacidade do ácido acetilsalicílico na prevenção do desenvolvimento do carcinoma da bexiga em rato.

Para tal, foi idealizado um protocolo experimental com os seguintes grupos em estudo:

- ☐ Grupo Controlo – sumo de laranja, por via oral.
- ☐ Grupo BBN – nitrosamina (0,05% na água de bebida).
- ☐ Grupo Celecoxibe (CEL) – 10 mg/Kg/dia, dissolvido em sumo de laranja, por via oral.
- ☐ Grupo Preventivo BBN/Celecoxibe (CEL-10 P) – nitrosamina (0,05% na água de bebida) e celecoxibe (10 mg/ Kg/dia), por via oral. Ambos em simultâneo.
- ☐ Grupo Preventivo BBN/Celecoxibe (CEL-1 P) – nitrosamina (0,05% na água de bebida) e celecoxibe (1 mg/ Kg/dia), por via oral. Ambos em simultâneo.
- ☐ Grupo Curativo BBN/Celecoxibe (CEL-10 C) – nitrosamina (0,05% na água de bebida) e celecoxibe (10 mg/ Kg/dia), por via oral. Primeiro BBN e depois Celecoxibe.
- ☐ Grupo AAS (AAS) – 250 mg/Kg/dia, dissolvido em sumo de laranja, por via oral.
- ☐ Grupo Preventivo BBN/AAS (AAS-250 P) – nitrosamina (0,05% na água de bebida) e AAS (250 mg/ Kg/dia), por via oral. Ambos em simultâneo.
- ☐ Grupo Preventivo BBN/AAS (AAS-25 P) – nitrosamina (0,05% na água de bebida) e AAS (25 mg/ Kg/dia), por via oral. Ambos em simultâneo.

Foi escolhido um período experimental de 20 semanas (de acordo com a literatura), sendo que as primeiras 8 semanas servem de período de administração do carcinogénico (para indução tumoral), enquanto que as restantes 12 semanas correspondem ao período para manifestação das alterações.

Para cada um dos grupos foram avaliados diversos parâmetros relacionados com a hemodinâmica e funções cardíaca, renal e hepática. Para além disso, foi feita uma caracterização (quantificação e qualificação) dos carcinomas da bexiga e doseados alguns indicadores/marcadores para avaliação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas possíveis alterações. Os parâmetros em causa foram os seguintes:

I – Parâmetros de caracterização geral, bioquímica e hemodinâmica

1 – Medição do peso corporal e da quantidade de BBN e água ingerida.

2 – Determinação de parâmetros de avaliação da função cardíaca

– Pressões arteriais e frequência cardíaca

– Massas cardíaca e ventricular esquerda

3 – Avaliação bioquímica da função renal

– Concentrações séricas de creatinina, azoto ureico e ácido úrico

– Massa renal

4 – Avaliação bioquímica da função hepática

– Actividade da TGO e da TGP

– Massa hepática

5 – Avaliação do perfil lipídico

– Colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL e colesterol-LDL

– Razões entre colesterol total e colesterol das lipoproteínas

6 – 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

7 – Parâmetros hemorreológicos

– Plaquetas

– Eritrócitos

– Reticulócitos

– Leucócitos

II – Caracterização histomorfológica do carcinoma da bexiga

- 1 – Avaliação do perfil macroscópico
- 2 – Avaliação do perfil microscópico
- 3 – Avaliação quantitativa

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

- 1 – Factor de crescimento tumoral beta (TGF- β)
- 2 – Facto de necrose tumoral alfa (TNF- α)
- 3 – Proteína C reactiva (PCR)
- 4 – Interleucina 1 beta (IL-1 β)
- 5 – Peroxidação lipídica (MDA)
- 6 – Capacidade antioxidante total (TAS)
- 7 – Nitrotirosina (3-NT)



C – MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e dieta: protocolo do estudo

1.1. Animais e acondicionamento

Neste estudo foram usados ratos machos de estirpe Wistar (n=67), adquiridos ao biotério Charles-River (Barcelona, Espanha) e mantidos cuidadosamente durante o estudo no Instituto da Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, segundo as normais legais e éticas em vigor (figura 17a, 17b e 17c).

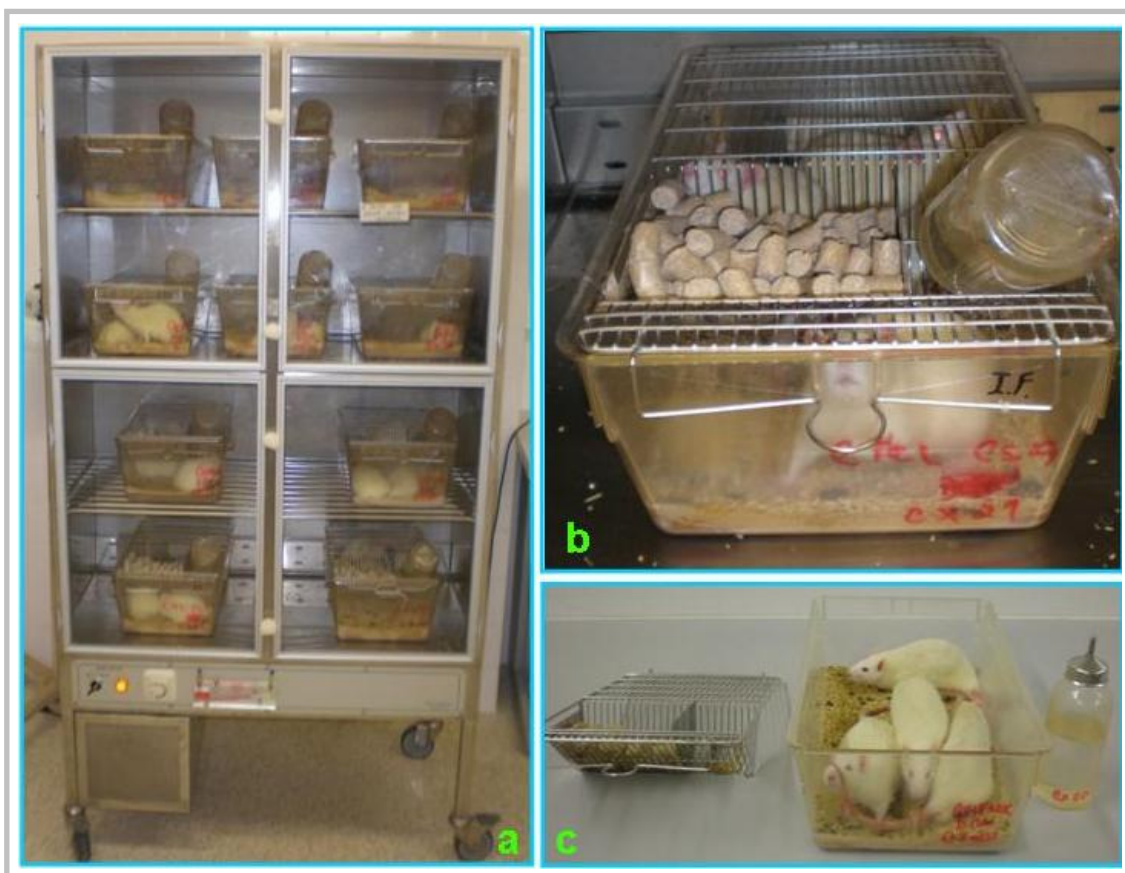


Figura 17 – Fotografias ilustrativas das condições de acondicionamento dos ratos: em armário com temperatura e humidade controladas (a), em gaiolas apropriadas (b e c).

Quando chegaram ao Instituto, os ratos tinham 8 semanas de idade e um peso médio entre 250 e 305 gramas. Durante todo o estudo, os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas (três ratos por gaiola), num armário com temperatura controlada (22°C), e sujeitos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas (figura 17).

MATERIAL E MÉTODOS

A alimentação consistiu numa dieta sintética apropriada (A04, SAFE, Augy, França) fornecida *ad libitum*. Relativamente à bebida, seis grupos foram mantidos com acesso a uma solução de BBN (a 0,05% em água), enquanto os outros três tiveram acesso a água destilada, também *ad libitum*.

Grupos em estudo

Após um período de adaptação dos animais ao meio, os ratos foram divididos em função dos seus pesos em quatro grupos, sujeitos às seguintes dietas e procedimentos figura 18:

i) grupo Controlo

Grupo de 6 ratos aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*, sendo ainda administrado sumo de laranja por via oral (veículo), durante 20 semanas.

ii) grupo carcinogénio (BBN)

Grupo de 12 ratos aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética, e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) durante as primeiras oito semanas e no restante período de tempo (até às 20 semanas) água (*ad libitum*).

iii) grupo Celecoxibe (CEL)

Grupo de 4 ratos aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*, sendo ainda administrado por via oral 10 mg/kg/dia de Celecoxibe (Celebrex[®], Pfizer) diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas, sendo depois substituída por água até às 20 semanas.

iv) grupo Celecoxibe (10 mg) Preventivo + BBN (CEL-10 P)

Grupo de 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) nas primeiras 8 semanas e água nas seguintes 12 semanas. Foi ainda administrado por via oral, 10 mg/kg/dia de Celecoxibe diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

v) grupo Celecoxibe (1 mg) Preventivo + BBN (CEL-1 P)

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo de 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) nas primeiras 8 semanas e água nas seguintes 12 semanas. Foi ainda administrado, por via oral, 1 mg/kg/dia de Celecoxibe diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

vi) grupo BBN + Celecoxibe (10 mg) Curativo (CEL-10 C)

Grupo de 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) nas primeiras 8 semanas e água nas seguintes 12 semanas. Foi ainda administrado, por via oral, 10mg/kg/dia de Celecoxibe diluído em sumo de laranja, durante as últimas 12 semanas (num total de 20).

vii) grupo Aspirina (AAS)

Grupo de 4 ratos aos quais foi disponibilizada uma dieta sintética e água destilada, ambos *ad libitum*, sendo ainda administrado, por via oral, 250 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico (Aspegic[®], Sanofi Aventis) diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

viii) grupo Aspirina alta dose Preventivo + BBN (AAS-250 P)

Grupo de 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) nas primeiras 8 semanas e água nas seguintes 12 semanas. Foi ainda administrado, por via oral, 250 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

ix) grupo Aspirina baixa dose Preventivo + BBN (AAS-25 P)

Grupo de 8 ratos aos quais foi disponibilizada, *ad libitum*, uma dieta sintética e como bebida uma solução de BBN (a 0,05%) nas primeiras 8 semanas e água nas seguintes 12 semanas. Foi ainda administrado, por via oral, 25 mg/kg/dia de ácido acetilsalicílico diluído em sumo de laranja, durante as primeiras 8 semanas.

MATERIAL E MÉTODOS

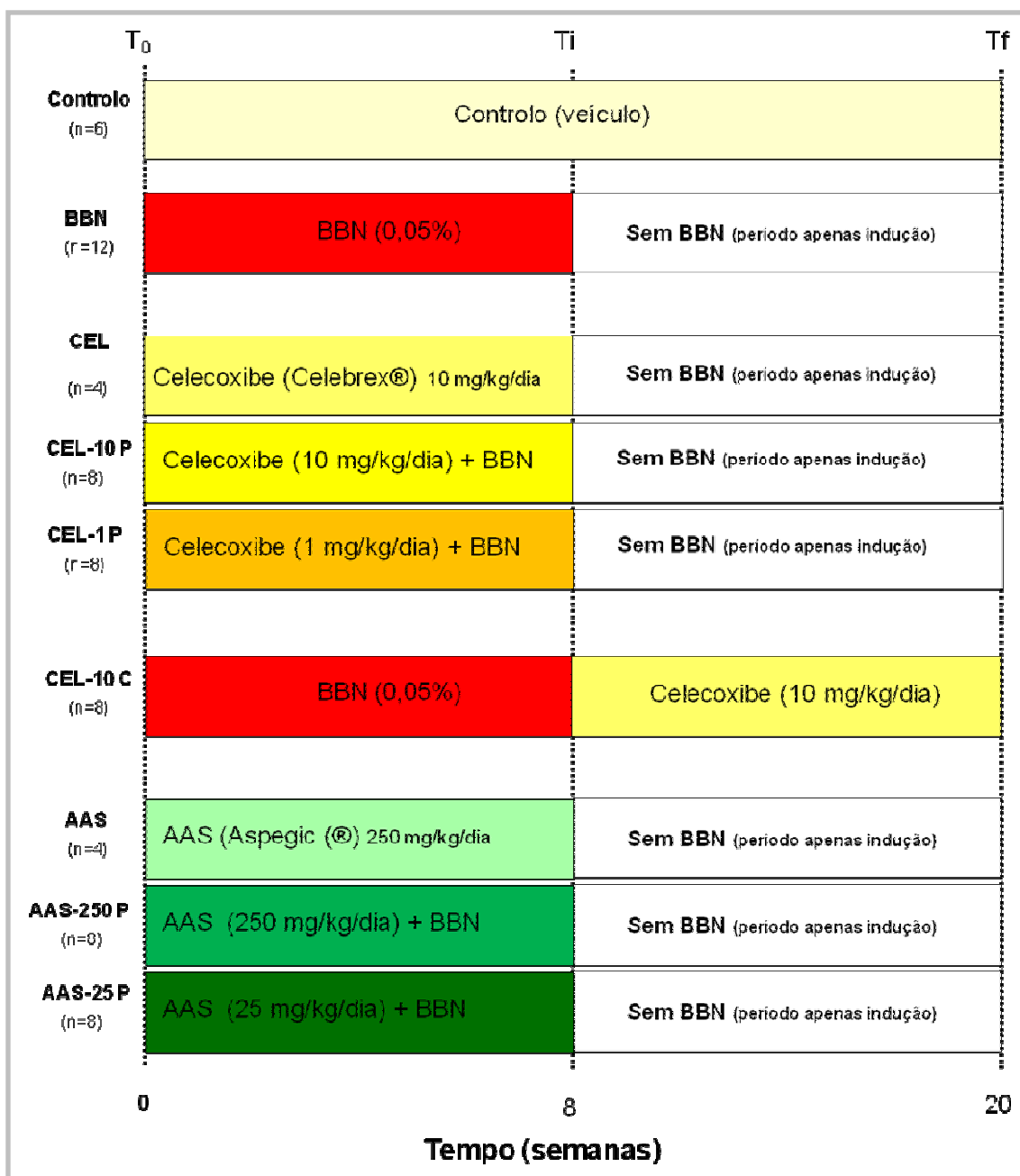


Figura 18 – Diagrama ilustrativo do protocolo em estudo.

O tratamento isolado com BBN teve por objectivo confirmar a capacidade deste carcinogénio para indução de tumores da bexiga, em comparação com o grupo controlo. Os tratamentos conjuntos de BBN e Celecoxibe ou ácido acetilsalicílico foram efectuados para avaliar um potencial efeito preventivo/curativo dos fármacos nas alterações induzidas pelo BBN, ou seja, avaliar o potencial efeito anti-tumoral por parte destes dois fármacos anti-inflamatórios. O tratamento isolado com Celecoxibe e do ácido acetilsalicílico, serviram para avaliar os efeitos destes fármacos por si só, ao nível

dos parâmetros em avaliação, ajudando ainda a aferir das reais capacidades preventivas dos fármacos com o BBN. As administrações orais dos dois fármacos e do sumo de laranja foram feitas através de uma cânula esofágica, sempre entre as 15 e as 16 horas, de forma a minimizar o eventual stresse criado no animal, sendo realizada com o máximo cuidado para não criar ferimentos/traumatismos que pudessem interferir com as determinações em estudo.

1.2. Monitorização do peso corporal

Os animais foram pesados numa balança analítica (Kern CB6K1) desde a sua chegada e, semanalmente, durante todo o tratamento. No fim do estudo, foram ainda registados os pesos de órgãos (coração, ventrículo esquerdo, rins e fígado).

1.3. Monitorização da bebida ingerida

Foi registada a quantidade de bebida ingerida ao longo das vinte semanas para todos os grupos em estudo. Para tal, foram usados biberões graduados como suporte para a bebida, que era meticulosamente controlada três vezes por semana.

2. Avaliação das pressões arteriais

Foram avaliadas as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e a frequência cardíaca (FC) nos nove grupos em estudo. Essa avaliação foi efectuada numa fase intermédia (semanas 7 a 9) e perto do final do estudo (entre as 18 e 20 semanas).

A medição destes parâmetros foi efectuada na artéria da cauda do rato, pelo método “tail cuff”, recorrendo a um esfigmomanómetro (modelo LE 5001) e uma gaiola de contenção adequada, provenientes da Letica (Barcelona, Espanha) (figura 19a, 19b e 19c).

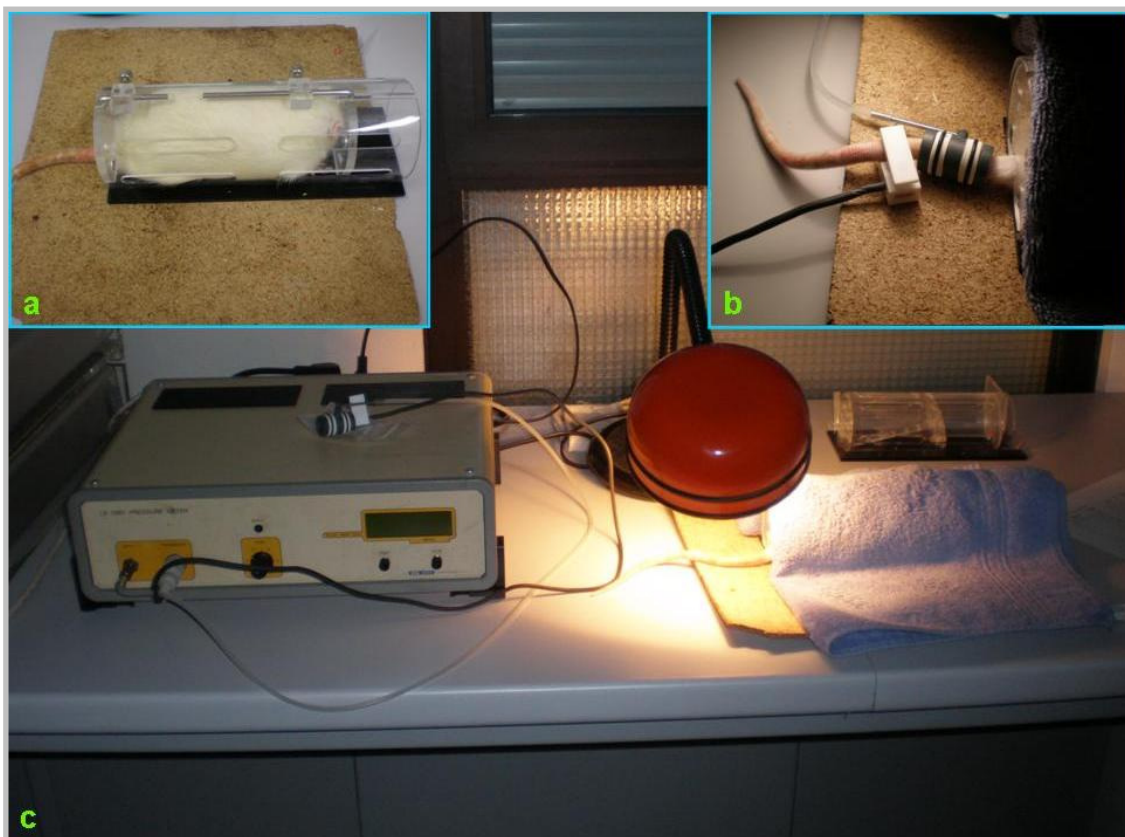


Figura 19 – Procedimento de medição das pressões arteriais na artéria da cauda pelo método da “manga insuflável”: (a) habituação do rato à gaiola de contenção, (b) manga insuflável e transducer na cauda e (c) esfignomanómetro.

Para evitar grande variabilidade de resultados, foram efectuados alguns passos para permitir a obtenção de medições mais fiáveis e homogéneas:

Efectuou-se uma fase de adaptação prévia ao estudo, dos ratos à gaiola, de forma a reduzir o stresse associado à manutenção do animal em condições de quase total imobilização (figura 19a);

Provocou-se uma prévia vasodilatação dos vasos periféricos, de modo a facilitar a acuidade da medição, sendo o rato submetido a uma temperatura de 25-30°C durante cerca de 30 minutos;

Efectuou-se um elevado número de medições consecutivas no mesmo animal, no sentido de rejeitar alguns valores fora do intervalo real (que resultam da conhecida hiperactividade do animal).

3. Colheita de sangue e recolha de órgãos

Os animais foram anestesiados com 2 mL/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/mL de cloridrato de cetamina (Ketalar[®]) em clorpromazina a 2,5 % (Largactil[®]). O sangue foi colhido da veia jugular em seringas de 5 mL, com agulhas previamente passadas por heparina (B Braun Melsunger AG, Alemanha) para evitar coagulação instantânea durante a colheita (figura 20a e 20b).

De cada animal foram obtidos, em média, cerca de 10 mL de sangue que foram distribuídos para realização das diferentes determinações analíticas pretendidas:

- Tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer[®]; SST[™]II Advance) para a obtenção de soro;
- Tubo com polímero de gel de K₂EDTA (BD Vacutainer[®]; SST[™]II Advance) para a obtenção de plasma;
- Tubo com heparina-lítio (Sarstedt, Monovette[®]) para a obtenção de sangue total.

Após anestesia e recolha de sangue procedeu-se ao sacrifício dos animais. Efectuou-se de seguida uma incisão mediana xifo-púbica para a exposição dos órgãos intra-abdominais (figura 21a). Uma vez exposta a cavidade abdominal, procedeu-se à identificação e isolamento da bexiga (figura 21b e 21d). Procedeu-se então à sua recolha, assim como do fígado, do coração e dos rins.

De forma a permitir uma preservação mais efectiva da bexiga, ainda antes da sua remoção foi efectuada uma injeção de formol tamponado (10%) no seu interior e posterior encerramento sob a forma de balão (figura 25d).

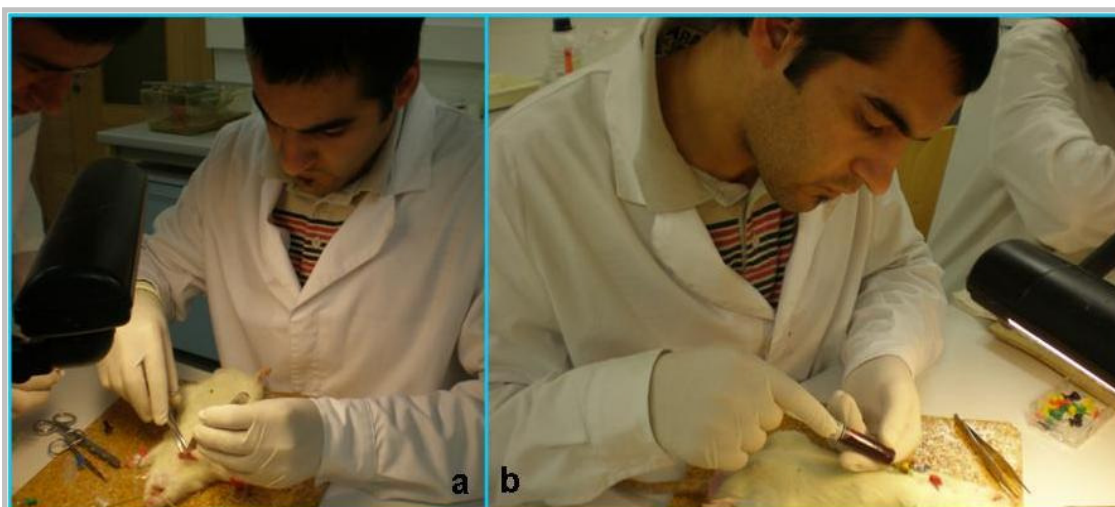


Figura 20 – Procedimentos experimentais para colheita de sangue: a) incisão para visualização da jugular e b) colheita de sangue.

MATERIAL E MÉTODOS

Os órgãos foram imediatamente colocados em caixas de petri que continham solução de Krebs-Henseleit (pH=7,4 e 4°C) constituída por: CaCl_2 (2,5 mM), D-glucose (11 mM), KCl (4,8 mM), NaCl (118 mM), NaEDTA (0,03 mM), MgSO_4 (1,2 mM), KH_2PO_4 (1,2 mM), NaHCO_3 (24 mM) e ácido ascórbico (0,06 mM). Essa solução permite a conservação enquanto se procede à limpeza dos tecidos e eliminação das gorduras adjacentes. De seguida, procedeu-se à sua pesagem e divisão em alíquotas para os diferentes fins: estudo bioquímico (congelados mediante a técnica de freeze-clamping em azoto líquido e posterior conservação a -80°C) e estudo histológico (conservados em formol tamponado a 10%).

Em alguns animais foi ainda possível recolher urina para futura realização de exame citológico urinário.

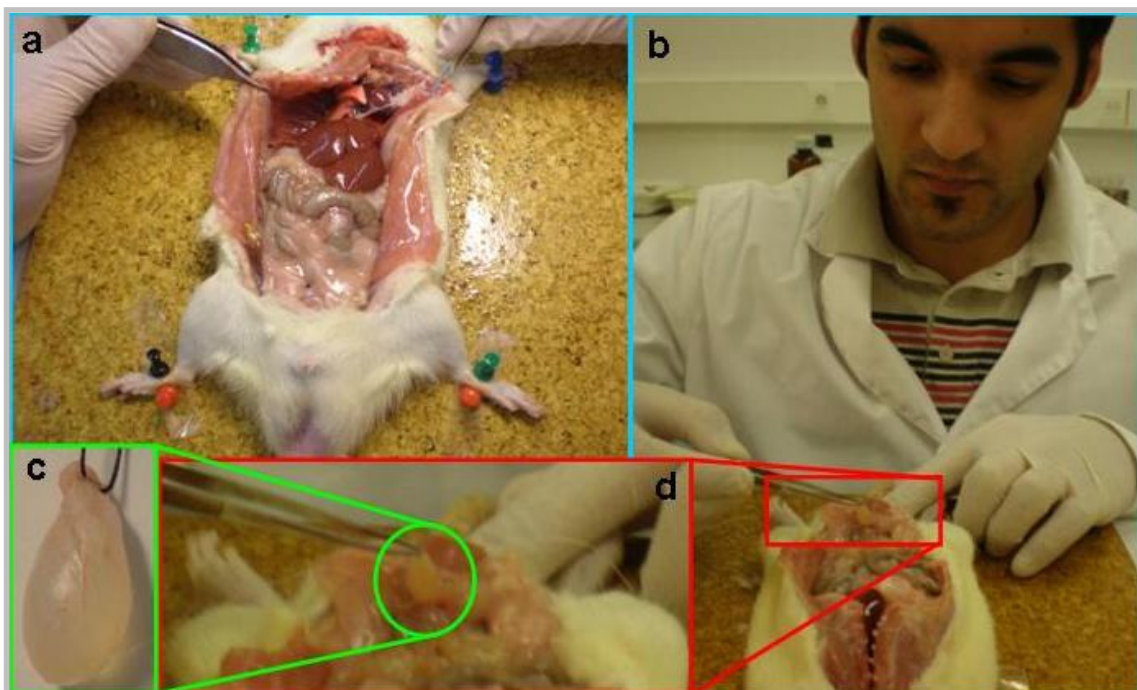


Figura 21 – Fotografias representativas de a) uma incisão mediana xifo-púbica, b) identificação da bexiga, d) ampliação pormenorizada de b), e c) extracção da bexiga depois do formol injectado no seu interior.

4. Determinação de alguns indicadores de trofismo

A nível cardíaco, foram registadas as massas do coração e do ventrículo esquerdo, com o intuito de estabelecer um conjunto de relações que nos pudessem indicar alterações de trofismo: a relação massa cardíaca/massa corporal; massa ventricular esquerda/massa corporal e massa ventricular esquerda/massa cardíaca. Foram também pesados os rins e o fígado, de forma a estabelecer as relações massa fígado/massa corporal e massa renal/massa corporal, para averiguar possíveis alterações de trofismo a nível hepático e renal, respectivamente.

5. Perfil bioquímico

Foram efectuadas diversas determinações bioquímicas (a partir de amostras de sangue total, de soro e de plasma) para avaliação da função renal, da função hepática, do perfil lipídico e do hemograma. A tabela 3 descreve de forma esquemática e sumária as metodologias subjacentes às determinações bioquímicas efectuadas.

Foram ainda calculados índices específicos que podem traduzir alterações de carácter displipidémico/aterogénico: Col-LDL/Col-Total, Col-Total/Col-HDL e Col-LDL/Col-HDL.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos avaliados em soro e metodologia utilizada.

Perfil analisado	Parâmetros avaliados	Kit / Analisador / O analisado	Princípio do método	
Hidratos de Carbono	Glicemia	Glu, Roche / Roche Hitachi 717 analyser / cor vermelha	$\text{Glicose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{gluconolactona} + \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-aminofenazona fenol} \xrightarrow{\text{POD}} 4\text{-}(p\text{-benzoquinona-monoinino})\text{-fenazona} + 4\text{H}_2\text{O}$	
			Creatinina	Creatinina + ácido pícrico $\xrightarrow{\text{Solução alcalina}}$ Complexo Creatinina – Ácido pícrico
			Ureia	$\text{Ureia} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{UREASE}} 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_2$; $\alpha\text{-oxoglutaratato} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{L-glutamato} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$
Função renal	Ácido úrico	UA plus, Roche / Roche Hitachi 717 analyser / cor vermelha	$\text{Acido úrico} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{URICASE}} \text{Alantoina} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{TOOS} + 4\text{-aminofenazona} \xrightarrow{\text{PEROXIDASE}} \text{quinona-dumino} + 4\text{H}_2\text{O}$	
			Azoto ureico	Ureia x 0,467 = Azoto ureico
			TGO/AST	$\alpha\text{-cetoglutaratato} + \text{L-aspartato} \xrightarrow{\text{AST}} \text{L-glutamato} + \text{oxaloacetato}$; $\text{oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{L-malato} + \text{NAD}^+$
Função hepática	TGP/ALT	ALT, Roche Roche / Hitachi 717 analyser / diminuição do NADH	$\alpha\text{-cetoglutaratato} + \text{L-alanina} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{L-glutamato} + \text{piruvato}$; $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactato} + \text{NAD}^+$	
			Colesterol total	Aplicação seguida, col-esterase, oxidase e peroxidase
			Colesterol HDL	Aplicação colesterol esterase e oxidase
Perfil lipídico	Colesterol LDL	LDL-C plus, Roche	Aplicação colesterol esterase e oxidase	
	Triglicerídeos	TG, Roche	Aplicação seguida, col-esterase, oxidase e peroxidase	
		Analísador Hitachi 717 / CHOL e TG - vermelho; H e LDL - azulado		

Legenda: Síntese dos parâmetros avaliados, do tipo de amostra, do kit e analisador usados, e os princípios de cada kit (a cinza estão representadas reações cinéticas)

6. Hemograma

Foram avaliados diversos indicadores hematológicos nos ratos dos 9 grupos em estudo, designadamente a diferentes níveis:

Plaquetar

O número de plaquetas (PLT), o plaquetócrito (PTC), o volume plaquetar médio (VPM) e a distribuição da forma das plaquetas (PDW).

Glóbulos brancos (leucócitos)

O número total de glóbulos brancos (GB).

Glóbulos vermelhos (eritrócitos)

O número de glóbulos vermelhos (GV), a concentração de hemoglobina (HGB), o hematócrito (HCT), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a distribuição da forma dos glóbulos vermelhos (RDW).

7. Estudo histomorfológico da bexiga

7.1. Processamento das amostras para histopatologia

Todas as amostras foram processadas segundo o mesmo protocolo:

- Fixação em formol tamponado a 10%, até 24 horas;
- Transferência dos tecidos para cassetes histológicas;
- Inclusão em parafina segundo as seguintes normas:
- Formol tamponado a 10% I, durante 120 minutos;
- Formol tamponado a 10% II, durante 120 minutos;
- Álcool etílico 80%, durante 90 minutos;
- Álcool etílico 96%, durante 90 minutos;
- Álcool etílico 96%, durante 90 segundos;
- Álcool etílico 100%, durante 90 minutos;
- Álcool etílico 100%, durante 90 minutos;

- Xilol I, durante 90 segundos;
- Xilol II, durante 90 segundos;
- Xilol III, durante 90 segundos;
- Paraplast I, durante 105 minutos;
- Paraplast I, durante 105 minutos.

O meio de inclusão usado (Paraplast) apresentava um ponto de fusão entre 55 e 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).

7.2. Obtenção das secções

Os blocos de parafina (Paraplast), foram cortados num micrótomo rotativo, (Micrótomo 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:

- Albumina glicerinada de Mayer – adesivo utilizado nas preparações para processamento de rotina, coradas com H&E.
- Poli-L-lisina – adesivo utilizado nas preparações para imunohistoquímica.

Finalmente, as preparações foram colocadas numa estufa a 37°C durante cerca de 12 horas.

7.3. Técnicas histológicas: H&E

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).

7.3.1. Hematoxilina-Eosina

Nesta marcação, destinada a avaliar as características básicas estruturais da bexiga, foi utilizada como solução corante nuclear, a Hematoxilina de Harris (coloração azul do núcleo) e como corante do citoplasma a Eosina aquosa (coloração rosa do citoplasma) (Stevens e Wilson, 1996).

A técnica consiste nos seguintes passos:

- Desparafinar em xilol, durante 10 minutos, duas vezes;
- Hidratar em álcoois de graduação decrescente, durante 5 minutos cada;
- Lavar em água corrente, durante 10 minutos;
- Mergulhar em Hematoxilina Harris, durante 2 minutos;
- Lavar em água corrente, durante 10 minutos;
- Mergulhar em Eosina 1%, durante 1 minuto;
- Desidratar em álcoois de graduação crescente, durante 5 minutos cada;
- Clarificar em xilol, duas vezes, cinco minutos cada;
- Montar os cortes histológicos com Entellan.

A observação das lâminas com os cortes das bexigas foi efectuada num sistema automático de análise de imagem (Nikon Eclipse 80i Fluo) com camera digital (D x M1200 F). Os carcinomas vesicais foram classificados segundo três parâmetros: número, tamanho e morfologia/forma.

8. Estudo de marcadores de proliferação, carcinogénese e inflamação

Foram avaliadas as concentrações séricas do factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina-1 beta (IL-1 β) e do factor de crescimento transformante beta (TGF- β), através de métodos micro ELISA utilizando kits comerciais (R&D systems, Minneapolis, USA). A quantificação da proteína C reactiva (PCR), foi também feita recorrendo a um método micro ELISA (Helica Biosystems, Inc. Fullerton, Calif, USA) (tabela 4).

8.1. Fundamento geral do método micro ELISA em “sandwich”

Este ensaio emprega uma técnica quantitativa de ensaio micro ELISA em sandwich. Um anticorpo monoclonal específico de rato, específico para cada um dos elementos a dosear, reveste a microplaca. Os padrões, controles e amostras são pipetados para os poços e a substância a dosear existente no soro liga-se ao anticorpo imobilizado. Após a lavagem das substâncias não ligadas, um conjunto enzimático (conjugado de peroxidase) contendo um anticorpo policlonal anti-citocina ou anti-PCR de rato, é adicionado aos poços. A seguir a uma lavagem, destinada a remover qualquer conjugado em excesso, é adicionada uma solução contendo um substrato da enzima presente no conjugado. A reação enzimática gera um produto azul que passa a amarelo quando a solução de paragem (HCl) é adicionada aos poços. A intensidade da cor medida a 450 nm num leitor de microplacas (LP400, Diagnostics Pasteur) é proporcional à quantidade de substância a dosear presente nas amostras. Os valores de citocinas e PCR presentes nas amostras são lidos a partir de uma curva de calibração elaborada para esse efeito.

Tabela 4 – Parâmetros de proliferação, carcinogénese e inflamação avaliados.

Parâmetro analisado	Tipo de amostra	Diluição	Absorvância leitura / comprimento onda / correção	Valor mínimo detectável
TGF- β	Soro	1:2	450 / 550	5 pg/mL
TNF- α		1:40		5 pg/mL
IL-1 β		1:1		21 pg/mL
PCR		1:1000	450 / 620	2,5 ng/mL

9. Equilíbrio oxidativo

9.1. Preparação das amostras

Para além do soro, foram analisados o fígado, os rins e o coração nos nove grupos em estudo. Para proceder à sua análise, foi necessário realizar um protocolo de homogeneização dos tecidos, que consiste no seguinte:

Pesar 0,2g de tecido e colocar num tubo limpo de polipropileno com 2 ml tampão fosfato salino (gelado), a pH = 7,4 (5% peso/volume). De seguida, são adicionados 10 µl de solução de Butil Hidroxitoluente (BHT) em acetonitrilo. Os tecidos foram então homogeneizados (Heidolph digital (RZR) 2000) e posteriormente centrifugados a 4000 rpm, 10 minutos a 4°C. De seguida, foram sonicados durante 3 minutos e novamente centrifugados a 4000 rpm, durante 15 minutos à mesma temperatura. O sobrenadante resultante (homogeneizado de tecido) foi retirado para um eppendorf marcado e congelado à temperatura de -80°C, para posterior quantificação.

Foi ainda medida a peroxidação lipídica (através do TBARS) e a capacidade antioxidante total (TAS).

9.2. Doseamento do TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances)

Para quantificação das concentrações de MDA nas amostras (tecidos e soro) foi necessário a construção de uma curva de calibração (realizada em duplicado). Da solução comercial de malondialdeído bis(dimetilacetal), fez-se uma solução mãe de concentração 83,5 µmol/L, a partir da qual se preparam as soluções padrão de concentrações 0,1; 0,21; 0,42; 0,83; 1,67; 2,5; 4,17; 8,3; 16,7 µmol/L que, em conjunto com o branco, servem para a obtenção da curva de calibração.

Colocaram-se em tubos de polipropileno de 10 ml, 100 µl de amostra, ou água destilada (para o branco), ou solução padrão (amostras padrão). A cada um destes tubos foram adicionados 100 µl de antioxidante Butil-hidroxitoluente (BHT) dissolvido em etanol; 100 µl 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 a pH = 3,5 e, por fim, 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) que funciona como reagente cromogénio. De seguida, colocaram-se os tubos no escuro durante 60 minutos a uma temperatura de 5°C. Posteriormente, levaram-se a banho-maria, a 95-100°C, durante 60 minutos, cobrindo-os com esferas de vidro. Após esse tempo, e depois de arrefecidos os tubos num banho de gelo, procedeu-se à extracção com 2,5 ml de uma solução de n-butanol: piridina: água destilada (15:1:0,5) (v:v:v).

Procedeu-se de seguida a uma centrifugação (4000 rpm, 10 min). Foram recolhidos 300 µL de sobrenadante para um poço da placa de reacção de poliestireno (COSTAR[®], 96 well EIA/RIA plate), para posterior leitura da absorvância a 532 nm.

9.3. Doseamento da capacidade antioxidante total (Total Antioxidante Status - TAS)

Para além do MDA, foi também quantificado a capacidade sérica do organismo em criar resposta à formação de radicais livres, com a medição da sua capacidade antioxidante. Para isso, foi necessário realizar um protocolo com as seguintes soluções: tampão acetato (pH 3,6), HCl 40 mM, TPTZ 10 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, Reagente FRAP (tampão acetato, TPTZ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e Trolox 1750 μM .

Para quantificação das concentrações de TAS no soro foi necessário a construção de uma curva de calibração (realizada em duplicado). Da solução comercial de Trolox fez-se uma solução mãe de concentração 1750 μM , a partir da qual se preparam as soluções padrão de concentrações 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 μM . O branco era constituído por água e reagente FRAP.

Em cada poço da placa de reacção de poliestireno (COSTAR[®], 96 well EIA/RIA plate) foram colocados 10 μL de soro, dos padrões e água (para o branco). De seguida foram acrescentados a cada poço 300 μL de reagente FRAP e 30 μL de água. Colocou-se a placa a incubar no leitor da placa (BIOTEK[®], Synergy HT, ligado a um computador (Fujitsu, Siemens)) durante 15 minutos a 37°C. Por fim, foi lida a absorvância a 593 nm.

9.4. Doseamento da nitrotirosina (3-NT)

Para quantificação da concentração sérica de 3-Nitrotirosina (3-NT) utilizou-se um *Kit* de imunoensaio enzimático (HyCult biotechnology b.v.) baseado na técnica de ELISA. Este método baseia-se no método de *Sandwich*, segundo o qual a quantidade de 3-NT presente na amostra é ligada ao anticorpo que reveste a placa, por um lado, e ao segundo anticorpo composto por biotina (*tracer*), por outro. Após completa ligação do *tracer* ao conjugado de tetrametilbenzidina-peroxidase, a adição do substrato daquela peroxidase, a tetrametilbenzidina (TMB) promove o desenvolvimento de cor, que é lida espectrofotometricamente a 450 nm. A quantidade de cor é directamente proporcional à 3-Nitrotirosina presente no soro das amostras a quantificar, sendo os valores a quantificar obtidos a partir de uma curva padrão de concentrações conhecidas (de 4 a 326 nM). Os resultados foram expresso em nM.

10. Tratamento estatístico dos resultados

Os resultados foram expressos em média aritmética complementada com o intervalo de variação de valores, sob a forma de erro padrão da média (e.p.m.). A identificação e avaliação de diferenças entre grupos foram avaliadas recorrendo à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Fisher's LSD (Protected Least Significant Difference), através de software apropriado (Statview 4.53, Abacus Concepts Inc, Berkeley, EUA). Os níveis de probabilidade inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.



D – RESULTADOS

RESULTADOS

Concluído o tempo do protocolo experimental (20 semanas), procedeu-se ao sacrifício dos animais, sendo todos os resultados aqui apresentados referentes ao tempo final, ou seja, após todos os tipos de tratamentos, com excepção da monitorização semanal dos pesos, da quantidade de bebida ingerida, e das medições das pressões arteriais.

A primeira apreciação vai incidir sobre a comparação do efeito do BBN por si só em relação ao grupo Controlo (sumo), à qual se seguirá a análise dos efeitos do Celecoxib por si só em comparação com o grupo Controlo. Por fim, relatar-se-ão os dados relativos aos grupos que tomaram BBN e Celecoxibe para deduzir possíveis efeitos preventivos e/ou curativos do fármaco no desenvolvimento de cancro da bexiga. De seguida proceder-se-á de forma análoga para o ácido acetilsalicílico.

1- Avaliação do peso corporal e da dieta

1.1. Monitorização do peso corporal

De recordar que os animais foram pesados semanalmente ao longo das 20 semanas de estudo, desde o dia de chegada até ao dia do sacrifício. A figura 26 mostra a evolução dos diferentes grupos em estudo, assim como os efeitos do BBN, do Celecoxib e do AAS, por si só, e quando em tratamentos conjugados.

No início do estudo procedeu-se à escolha dos ratos de modo a que o peso entre os grupos fosse similar, para evitar possíveis interferências deste factor com os dados a avaliar. Esse facto é visível no gráfico da figura 22, pois os valores médios de cada grupo não diferem significativamente no tempo inicial (entre 250 no grupo BBN e 305 no grupo AAS-25 P). Com o decorrer do tempo foi notável o crescimento do peso dos animais, em conformidade com a sua fase de desenvolvimento e maturação, uma vez que se trata de ratos jovens no início do tratamento.

Realizando uma análise detalhada e comparativa entre grupos, é visível um período de crescimento mais acentuado na fase inicial do estudo (até à 3ª semana), começando depois a notar-se uma relativa discrepância entre os grupos que tomaram os fármacos e os outros dois grupos (Controlo e BBN). Mais detalhadamente, no grupo BBN, o crescimento inicial foi ainda mais acentuado, prolongando-se até à sexta

RESULTADOS

.....
semana. No entanto, a partir daí esse grupo sofre pequenas oscilações, mas que não diferem em demasia do grupo Controlo, à excepção das últimas duas semanas, altura em que sofre um ligeiro decréscimo. Nos grupos que tomaram fármacos, é notório um abrandar no crescimento face aos grupos Controlo e BBN, chegando mesmo a ser essa diferença superior a 100 gramas no grupo AAS-250 P.

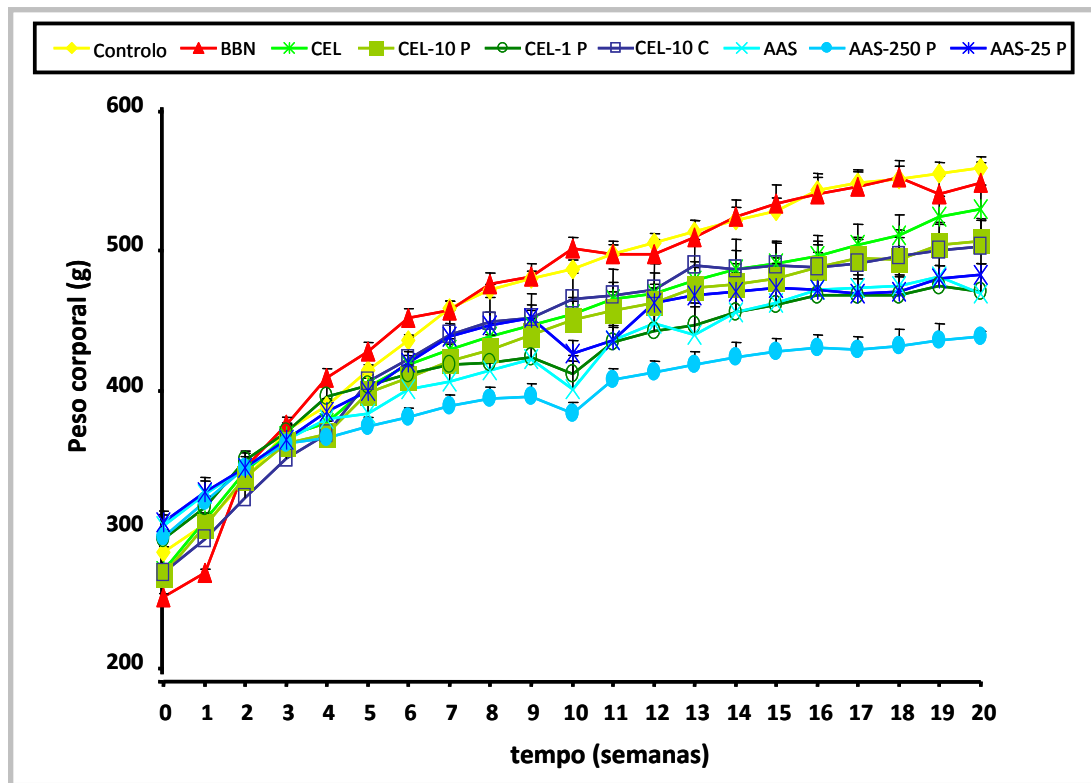


Figura 22 – Evolução do peso corporal dos animais dos 9 grupos em estudo ao longo das 20 semanas.
Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m.

Parte da discrepância do valor do peso dos ratos poderá ficar a dever-se a uma eventual diferença na quantidade de comida ingerida pelos animais, factor este que não foi avaliado, dada a dificuldade acrescida que a monitorização da quantidade de alimento ingerido poderia significar em termos de acondicionamento e manutenção dos ratos em cativeiro.

De referir, por final, que no momento de sacrifício dos animais estes apresentavam muita massa visceral, não se podendo assegurar, no entanto, se a discrepância entre os grupos se poderia dever a esse facto.

RESULTADOS

Assim, os valores finais correspondentes a cada grupo foram os seguintes (em g): Controlo - 560 ± 8 ; BBN - 549 ± 16 ; CEL 530 ± 17 ; CEL-10 P - 507 ± 16 ; CEL-1 P - 471 ± 20 ; CEL-10 C - 502 ± 19 ; AAS - 469 ± 31 ; AAS-250 P - 438 ± 5 e AAS-25 P - 483 ± 9 .

1.2. Monitorização da quantidade de bebida ingerida

Relativamente à quantidade de bebida ingerida (água ou BBN em água), este é um facto de inequívoca relevância, pois numa fase inicial do estudo os grupos diferiam no tipo de bebida. Assim, é possível aferir a discrepância entre o BBN (o agente cancerígeno encontrava-se dissolvido na água) e os restantes que tomaram exclusivamente água numa fase inicial (até às 8 semanas).

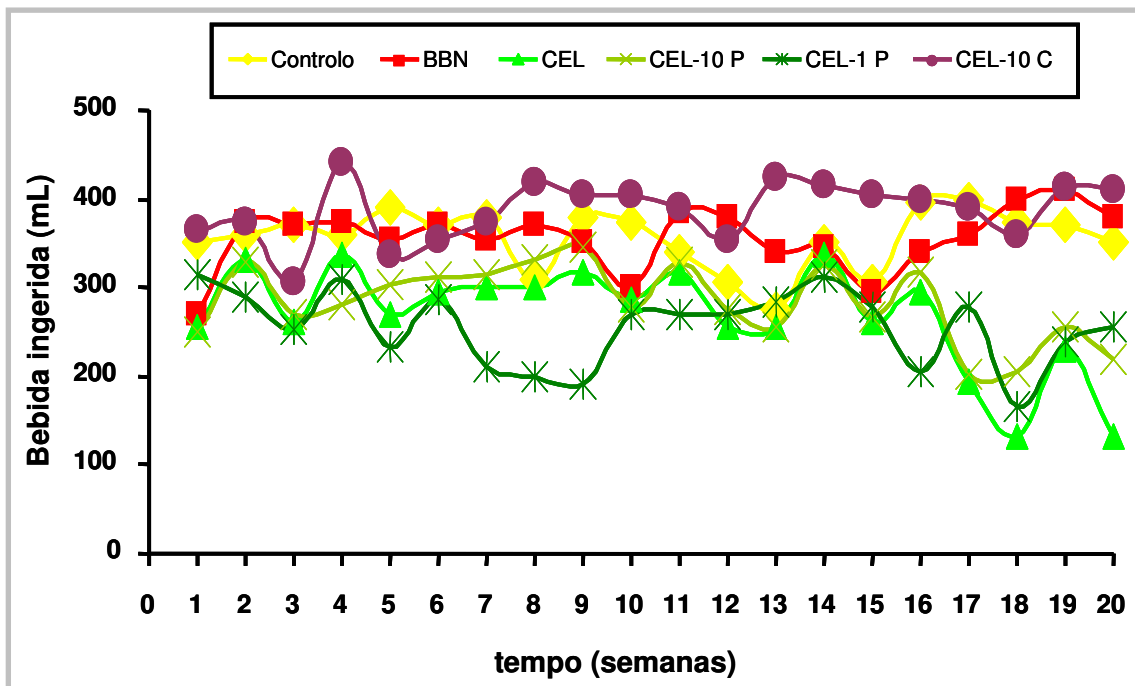


Figura 23 – Monitorização da quantidade de bebida ingerida durante as 20 semanas do estudo para os ratos do sub-estudo Celecoxibe.

Legenda: Os resultados representam médias (mL) \pm e.p.m.

Os resultados de bebida ingerida relativos ao celecoxibe são mostrados na figura 23, sendo a figura seguinte relativa ao ácido acetilsalicílico. Em ambos os fármacos há a destacar dois períodos:

- O primeiro corresponde às primeiras 8 semanas de tratamento, nas quais três grupos foram sujeitos a uma dieta em que a bebida disponibilizada era somente

RESULTADOS

água (grupos Controlo e CEL e CEL-10 C). Nos restantes três grupos (BBN e CEL-10 P e CEL-1 P), foi dissolvido BBN na água;

- O segundo período, corresponde às 12 semanas seguintes, nas quais todos os grupos tinham como bebida água (figura 23), mas um grupo (CEL-10 C) era administrado com 10 mg de celecoxibe.

A análise do gráfico acima representado permite verificar com clareza a existência de diferenças e discrepâncias ao longo do tempo. Mais pormenorizadamente, é notória a diferença entre o grupo Controlo e BBN dos restantes três grupos que tomaram celecoxib durante as primeiras oito semanas. Por outro lado, estes grupos que abandonaram o Celecoxib, apresentam agora valores muito similares aos do grupo Controlo e BBN no periodo seguinte. Porém, nas últimas 4 semanas antes do sacrifício, a quantidade de bebida ingerida pelos ratos dos grupos que abandonaram o Celecoxib decaiu para metade relativamente aos outros dois grupos. A administração do fármaco parece alterar significativamente o equilíbrio hídrico do organismo dos animais, levando a que estes ingerissem menor quantidade de bebida. Porém, no grupo curativo (CEL-10 C), verificou-se uma similariedade de valores com os grupos Controlo e BBN durante as primeiras oito semanas e um ligeiro aumento no seguinte período.

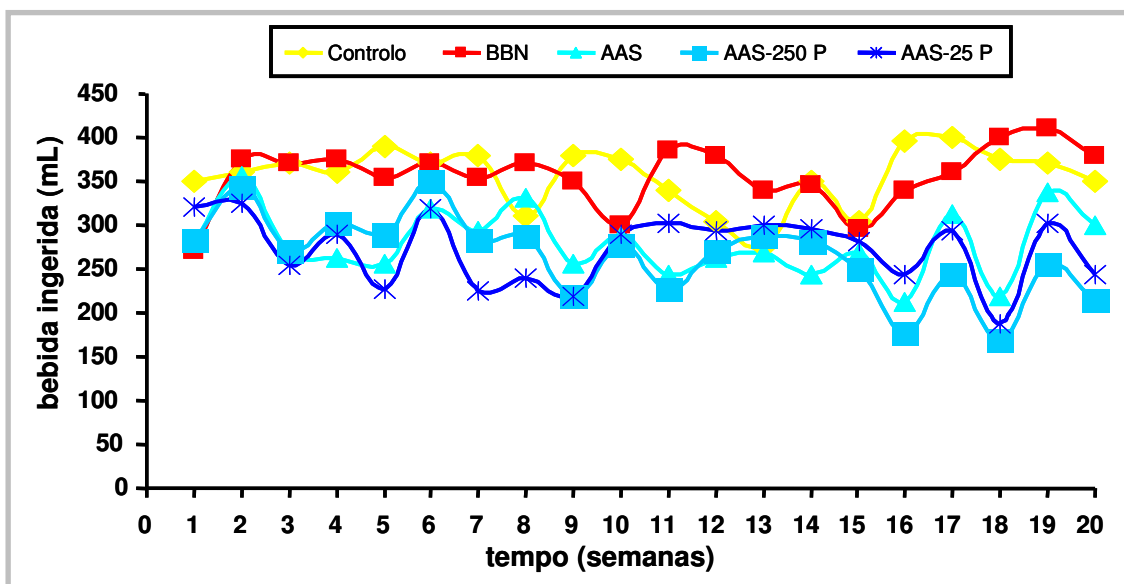


Figura 24 – Monitorização da quantidade de bebida ingerida durante as 20 semanas do estudo para os ratos do sub-estudo AAS.

Legenda: Os resultados representam médias (mL) \pm e.p.m.

RESULTADOS

Observa-se ainda que a administração de BBN na água de bebida não parece levar a oscilações significativas, isto porque o grupo BBN ostenta um consumo muito similar ao do grupo Controlo.

Nos grupos administrados com AAS (figura 24), é igualmente notória uma ligeira diferença face aos grupos Controlo e BBN nas primeiras oito semanas, sendo maior a diferença depois de os ratos abandonarem as tomas de AAS. Porém, a administração do fármaco pode induzir alterações significativas no equilíbrio hídrico do organismo dos animais, levando a que estes ingerissem menor quantidade de bebida. Não se verificam diferenças dentro dos grupos administrados com AAS, mesmo a doses diferentes.

2. Metabolismo dos hidratos de carbono

Foi determinada a glicemia dos ratos no final do tratamento, estando os valores representados na figura 25.

Pela análise gráfica, nota-se que não existe grande discrepância entre os grupos, à excepção do grupo CEL-10 P. Com efeito, o grupo BBN não apresenta qualquer significado estatístico em relação ao grupo Controlo (apesar de uma ligeira subida numérica). O mesmo se verifica quando comparado o grupo CEL com o Controlo. Relativamente do grupo CEL-10 P, verifica-se um aumento significativo ($P < 0,01$) da glicemia em relação tanto ao grupo BBN como ao grupo CEL. Estes resultados parecem indicar um efeito ao nível do metabolismo dos hidratos de carbono quando os dois compostos são administrados de forma simultânea, o que não é visível em administração isolada (figura 25). Porém, no grupo Celecoxib de baixa dose, não se observou o aumento verificado no grupo de alta dose, mas pelo contrário uma redução significativa face ao grupo BBN ($P < 0,05$). No grupo celecoxib curativo a situação foi similar, mas uma redução ainda superior face ao BBN ($P < 0,01$), e igualmente reduzido versus grupo CEL ($P < 0,05$).

Nos grupos em que se administrou AAS, verificou-se um valor idêntico ao do Controlo para o grupo AAS, uma redução ($P < 0,01$) versus BBN para o grupo AAS-250 P e um aumento apenas tendencial, no grupo homólogo de baixa dose (figura 25)

RESULTADOS

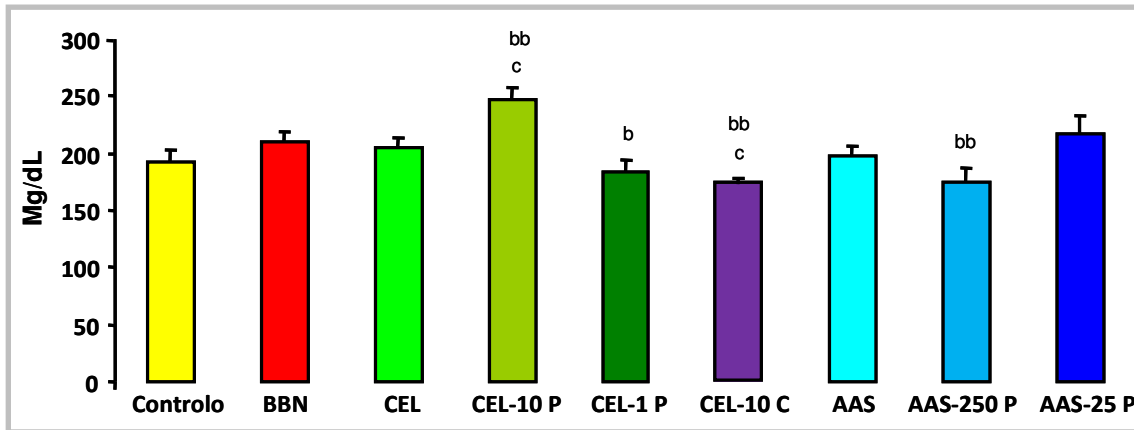


Figura 25 – Concentração sérica de glicose para os 9 grupos em estudo.

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m.

3. Pressão arterial e trofismo cardíaco

Foram estudadas as alterações ao nível das pressões arteriais e do ritmo cardíaco, assim como de índices de trofismo cardíaco e ventricular esquerdo.

3.1. Pressões arteriais e frequência cardíaca

Os valores obtidos durante os tratamentos são representados nas figuras 26A a 26 D.

Da análise da frequência cardíaca (BPM) resulta uma diferença notória da medição efectuada no tempo intermédia (semana 8) da realizada perto do final dos tratamentos (semana 18/19), com excepção clara do grupo Controlo, que não efectuou qualquer tratamento. De uma forma global, o número de batimentos por minuto, foi diminuindo desde as oito semanas, chegando alguns grupos a apresentar valores idênticos ao Controlo no final do tempo. Os únicos grupos que não apresentaram esta tendência de maior queda foram aqueles que tomaram AAS (figura 26A).

Quanto à pressão arterial sistólica (PAS), é também notória uma diferença do grupo Controlo para os restantes grupos, à imagem da frequência cardíaca. Porém, existem três grupos (BBN, CEL e CEL-10P) que não acompanham a tendência de baixar os seus valores depois de terminada a administração dos tratamentos (figura 26B).

RESULTADOS

Em relação à pressão arterial diastólica (PAD), observou-se um comportamento semelhante ao encontrado na frequência cardíaca. No entanto, nos grupos BBN, CEL e CEL-10 P verifica-se aumentos nos valores depois das oito semanas (figura 26C).

No que concerne aos resultados da pressão arterial média (PAM), os valores estão em consonância com os descritos para a pressão arterial diastólica (figura 26D).

RESULTADOS

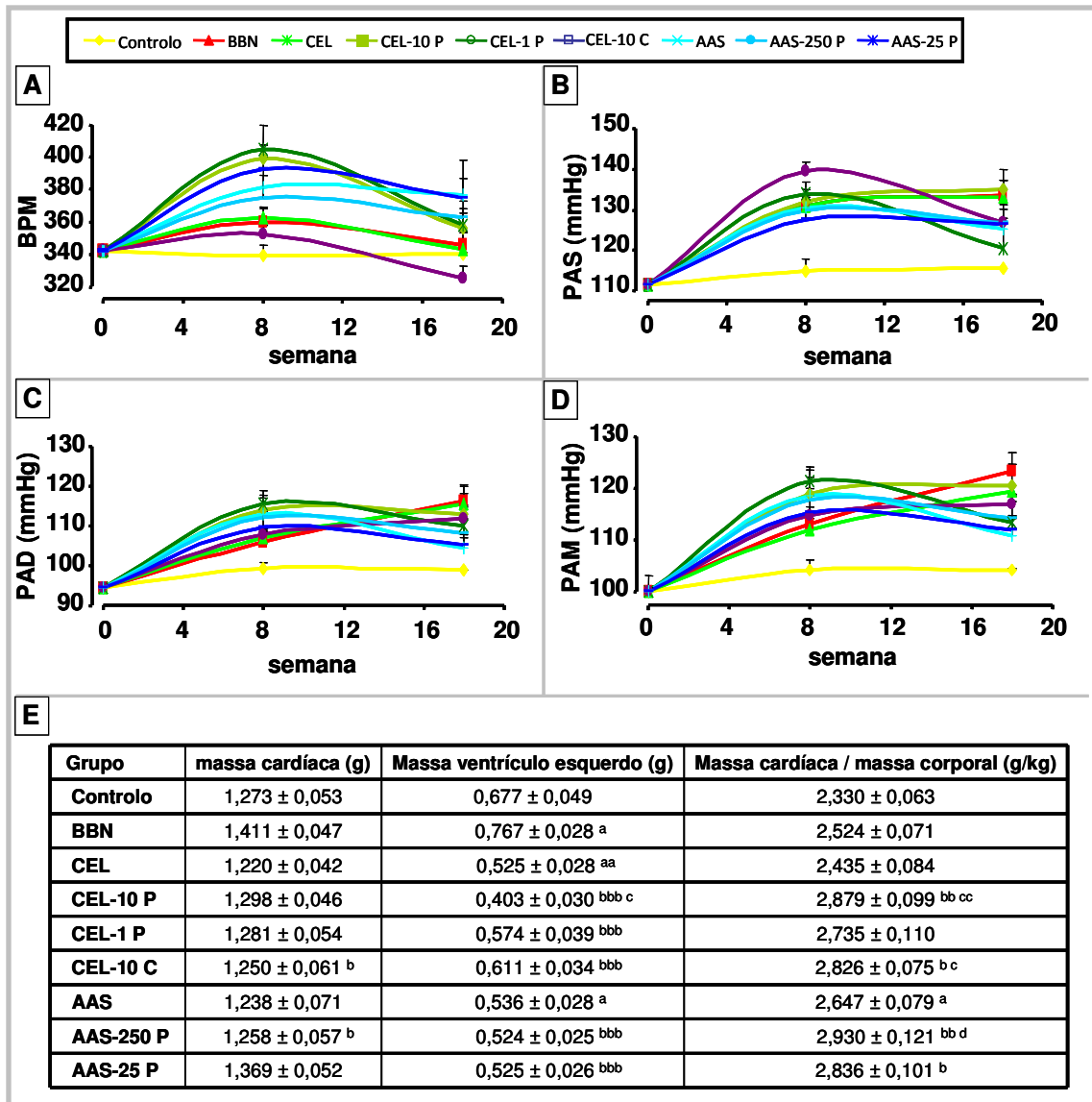


Figura 26 – A, B, C, D – Valores da frequência cardíaca e pressões arteriais (sistólica, diastólica e média) nos ratos dos 9 grupos em estudo.

E – Parâmetros indicadores de trofismo cardíaco.

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) ± e.p.m.

3.2. Indicadores de trofismo cardíaco

Os valores de massa cardíaca somente diferem no grupo BBN (com um aumento na ordem dos 13%) face ao grupo Controlo, mas sem apresentarem resultados significativos. Contudo, os grupos CEL-10 C e AAS alta dose, apresentam diminuições face ao grupo BBN ($P < 0,05$) (figura 26E).

RESULTADOS

Em relação à massa ventricular, há que realçar que este dado poderá carecer de total exactidão face à dificuldade de proceder com total precisão à sua separação do restante coração, o que pode depender da pessoa que está a manipular cirurgicamente. No entanto, não obstante essa limitação, constatou-se um aumento da massa no grupo BBN ($P<0,05$) e uma diminuição em todos os outros grupos que tomaram BBN mais fármaco ($P<0,001$). Os grupos administrados só com fármaco (CEL e AAS) também obtiveram uma ligeira redução face ao grupo Controlo ($P<0,001$ e $P<0,05$, respectivamente) (figura 26E).

A razão massa cardíaca/massa corporal resultou em maior discrepância de valores, com os grupos BBN, CEL e AAS ($P<0,05$) a registarem um aumento, tendencial apenas nos dois primeiros, vs Controlo, enquanto os restantes grupo que tomaram fármaco e o carcinogénio, apresentam valores ainda superiores aos do BBN, CEL e AAS (figura 26E).

4. Função renal

Para avaliar esta função foram estudadas as possíveis alterações de alguns parâmetros séricos, bem como de alguns índices de trofismo.

4.1. Parâmetros séricos

Os resultados dos parâmetros bioquímicos representativos da função renal estão expressos de forma gráfica na figura 27A.

Relativamente à ureia verificou-se um aumento significativo no grupo CEL-10 P ($P<0,001$ vs BBN e $P<0,01$ vs CEL). No grupo celecoxibe preventivo baixa dose e no grupo curativo verificou-se um decréscimo, com ambos a revelarem significância versus o grupo CEL ($P<0,05$).

Nos grupos que tomaram AAS, não se obtiveram alterações face ao grupo Controlo, mas o grupo que tomou a baixa dose (AAS-25 P) registou um aumento face ao BBN ($P<0,01$).

RESULTADOS

Quanto aos valores de creatinina, nos animais do grupo CEL-10 P registou-se um perfil muito idêntico ao da ureia, com aumentos face ao BBN ($P<0,001$) e CEL ($P<0,01$) (figura 27A). Nos grupos administrados com AAS, verificou-se um ligeiro acréscimo no grupo AAS ($P<0,05$ vs Controlo) e uma diminuição no AAS-250 P ($P<0,05$ vs AAS).

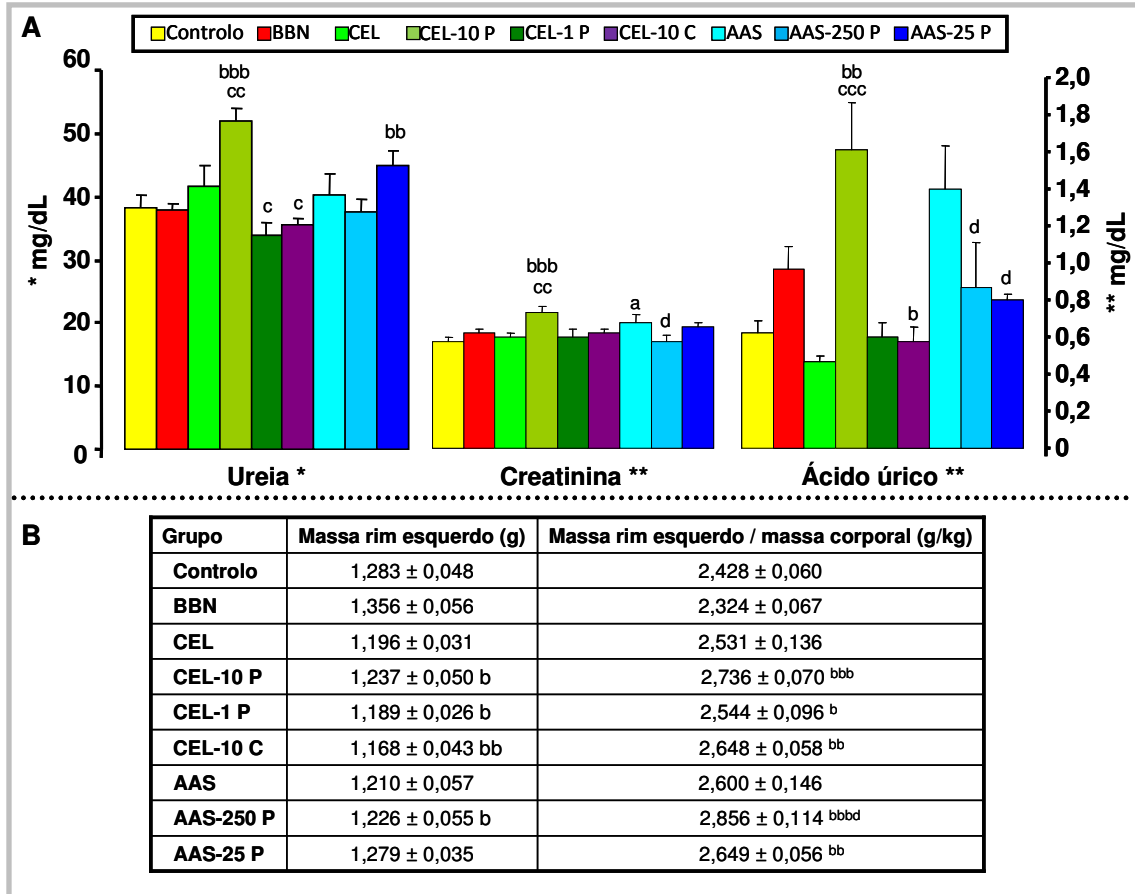


Figura 27 – A – Gráfico dos parâmetros séricos para avaliação da função renal: ureia, creatinina e ácido úrico.

B – Parâmetros indicadores de trofismo renal.

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) ± e.p.m. Os diferentes valores de significância: $P<0,05$; $P<0,01$ e $P<0,001$, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN; c – vs CEL; d – vs AAS.

Em relação ao ácido úrico, verificou-se um aumento no grupo BBN e uma redução no grupo CEL, porém sem significância estatística. Já o grupo CEL-10 P apresentou um aumento acentuado face ao grupo BBN ($P<0,01$) e CEL ($P<0,001$). Porém, no grupo curativo que tomou Celecoxibe, regista-se uma diminuição comparativamente ao grupo BBN ($P<0,05$) (Figura 27A).

RESULTADOS

Nos grupos que tomaram AAS, verifica-se uma diminuição acentuada nos grupos alta e baixa dose face ao grupo AAS (ambos $P < 0,05$).

A nível global, ressalta a ideia de que o Celecoxib na dose de 10 mg em conjunto com o BBN, na forma preventiva, agrava a função renal, enquanto que os restantes grupos Celecoxibe não transmitem essa ideia. No que se refere ao AAS, verificou-se um agravamento dos parâmetros séricos da função renal quando tomado sozinho (Figura 27A).

4.2. Indicadores de trofismo renal

Os resultados dos parâmetros representativos de trofismo na função renal estão expressos na tabela da figura 27B.

Apenas de realçar que os grupos CEL-10 P, CEL-1 P, CEL-10 C, AAS-250 P e AAS-25 P registaram um aumento significativo no parâmetro massa rim esquerdo/massa corporal face ao grupo BBN ($P < 0,001$, $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) (figura 27B). Assim, o dado mais significativo desta avaliação, é o aumento acentuado da massa renal/massa corporal nos grupos que tomaram fármacos em conjunto com o carcinogénio. Mais ainda, também isoladamente (CEL e AAS) parece haver uma hipertrofia renal, ainda que as diferenças versus Controlo não tenham atingido significado estatístico (Figura 27B).

5. Função hepática

A avaliação da função hepática passou pelos estudos das alterações de alguns parâmetros séricos, assim como de alguns índices de trofismo.

5.1. Parâmetros séricos

Os parâmetros séricos analisados foram a transaminase glutamo-oxaloacética (TGO) e a transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (figura 28A).

RESULTADOS

Os valores de TGO encontram-se aumentados no grupo BBN (em 52%) enquanto nos grupos que tomaram Celecoxibe com BBN na forma preventiva, não se verificam aumentos significativos, havendo mesmo uma redução tendencial vs BBN. Porém, na forma curativa o Celecoxibe com o BBN mostrou um aumento muito significativo face aos grupos BBN ($P < 0,05$) e CEL ($P < 0,001$). No tratamento com AAS, verificou-se um aumento nos grupos alta e baixa dose, mas apenas com o grupo alta dose a revelar significância vs o grupo AAS, sem que nenhum deles tenha prevenido aumento no grupo BBN. Relativamente à actividade da TGP os resultados não foram tão díspares entre grupos. Contudo, o grupo CEL-1 P revela uma ligeira diminuição face ao grupo BBN ($P < 0,001$), que estava tendencialmente aumentado vs o Controlo, enquanto o grupo curativo mostra um aumento significativo vs o grupo CEL ($P < 0,001$). Referente aos grupos AAS, somente a relatar um ligeiro aumento do grupo de alta dose face ao BBN ($P < 0,05$) e AAS ($P < 0,05$) (Figura 28A).

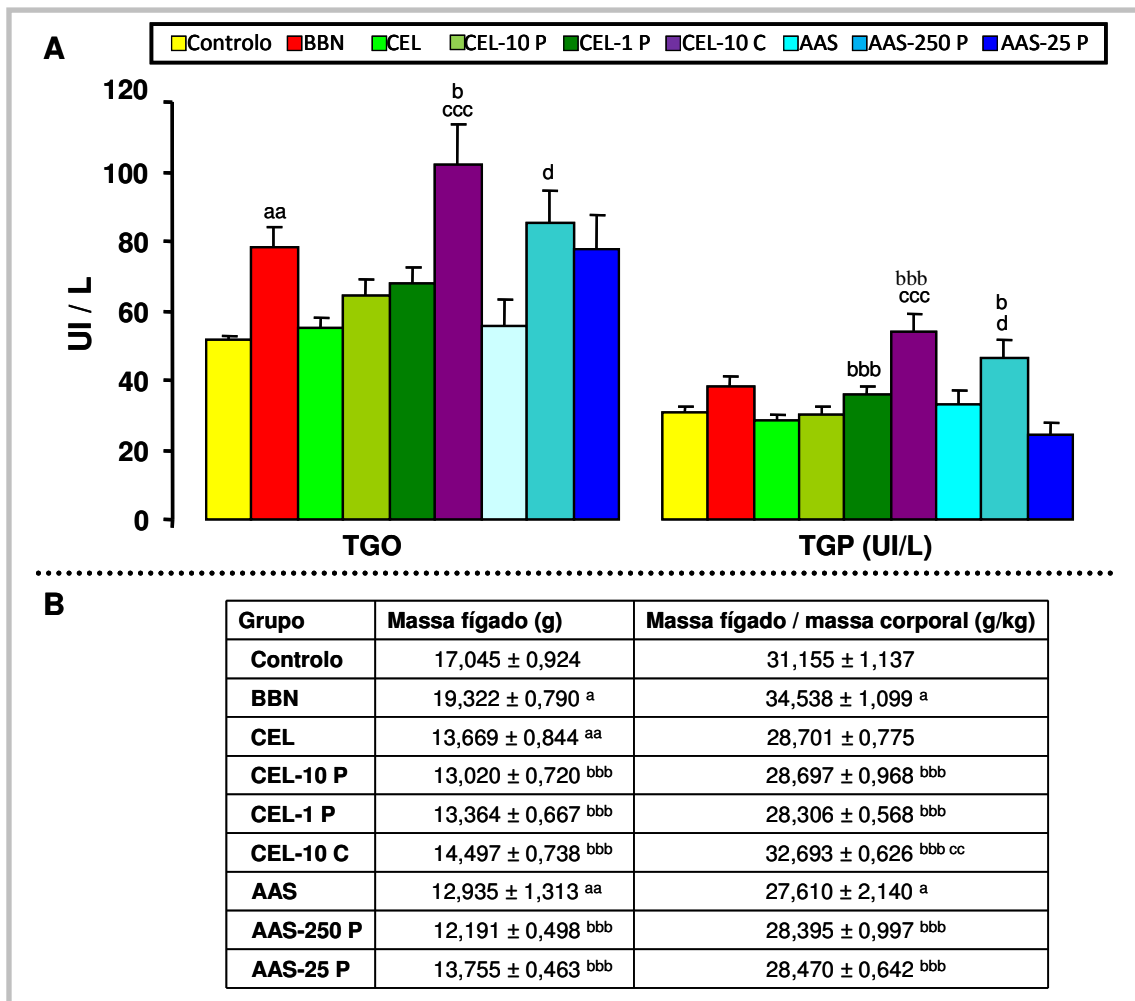


Figura 28 – A – Gráfico dos parâmetro séricos para avaliação da função hepática: TGO e TGP

B – Parâmetros indicadores de trofismo hepático.

RESULTADOS

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m. Os diferentes valores de significância: $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN; c – vs CEL; d – vs AAS.

Em suma, a ideia global transmitida pelo gráfico é a do desequilíbrio que o BBN provoca sozinho nas enzimas da função hepática, enquanto que administrado em conjunto com o Celecoxib na forma preventiva, o seu efeito tende a melhorar expressivamente. Todavia, o Celecoxibe administrado no formato curativo, tende a agravar a função hepática. No AAS, apenas de registar um ligeiro agravamento desta função quando este fármaco é administrado em altas doses (Figura 28A).

5.2. Indicadores de trofismo hepático

Os resultados dos parâmetros representativos de trofismo hepático estão na tabela da figura 28B.

Observou-se um aumento da massa do fígado/massa corporal no grupo BBN face ao grupo Controlo ($P < 0,05$) e uma redução tendencial no grupo CEL. Nos grupos Celecoxibe preventivo registou-se uma redução significativa da massa hepática/massa corporal em relação ao grupo BBN ($P < 0,001$), sendo a redução no grupo curativo menos acentuada, equiparando os valores Controlo.

No que respeita aos grupos que tomaram AAS, é notória uma redução no grupo AAS vs Controlo ($P < 0,05$) prevenindo ($P < 0,001$) o aumento registado no grupo BBN quando em associação com este, para ambos os grupos (alta e baixa dose).

6. Perfil lipídico

As lipoproteínas (ricas em triglicérides e colesterol) são componentes chave no processo de síndromas metabólicas, assim como em complicações cardiovasculares, estando envolvidas em importantes processos metabólicos. Portanto, foram estudadas as alterações de alguns parâmetros séricos e calculadas algumas razões entre os vários tipos de colesterol, como indicadores de risco aterogénico.

RESULTADOS

6.1. Parâmetros séricos

Os parâmetros séricos analisados foram expressos graficamente na figura 29A.

Relativamente ao colesterol total, o BBN e o Celecoxib não produziram efeitos significativos vs Controlo. No entanto, no grupo CEL-10 P dispararam os valores de Col-total, produzindo um aumento acentuado vs BBN ($P < 0,001$) e CEL ($P < 0,01$).

Quanto ao colesterol HDL e LDL, as discrepâncias de valores foram idênticas, notando-se somente um maior aumento do valor de HDL no grupo CEL-10 P ($P < 0,05$ vs BBN), enquanto que a maior alteração nas LDL foi o aumento no grupo CE-10 C ($P < 0,01$ vs CEL).

Em referência aos triglicerídeos, estes apresentaram-se diminuídos em todos os grupos comparativamente com o grupo Controlo, com exceção ao grupo AAS de baixa dose.

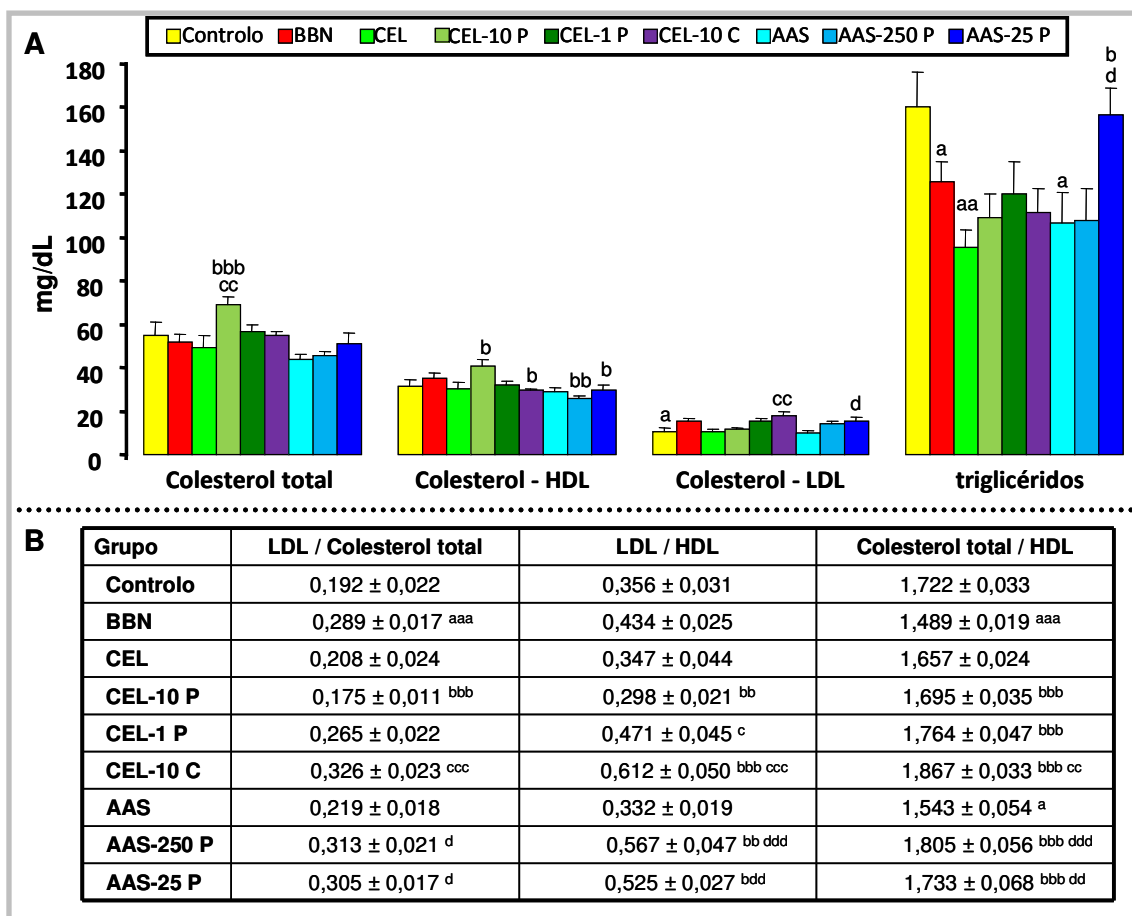


Figura 29 – A – Gráfico dos parâmetros séricos para avaliação do perfil lipídico: colesterol total, col-HDL, col-LDL e TGs.

B – Razões da função lipídica, índices aterogénicos.

RESULTADOS

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m. Os diferentes valores de significância: $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN; c – vs CEL; d – vs AAS.

6.2. Índices aterogénicos

Em relação à razão colesterol LDL/colesterol total, o BBN produziu alterações significativas vs Controlo ($P < 0,001$), enquanto que o Celecoxib 10 mg preventivo originou uma diminuição ($P < 0,05$ vs BBN) e o Celecoxibe curativo um aumento ($P < 0,001$ vs CEL). No estudo com AAS ocorreu um aumento dos grupos preventivos face ao que tomou somente AAS ($P < 0,05$, em ambos) (figura 29B).

No que respeita à razão LDL/colesterol HDL, foi notória uma diminuição no grupo CEL-10 P vs BBN ($P < 0,01$), um aumento bastante acentuado no grupo CEL-10 C ($P < 0,001$ vs BBN e CEL). Nos grupos que tomaram AAS apenas há a destacar o aumento no grupo AAS-250 P ($P < 0,05$ vs BBN e $P < 0,001$ vs AAS) e AAS-25 P ($P < 0,001$ vs AAS).

Na razão colesterol total/colesterol HDL, o comportamento dos grupos foi semelhante ao índice anterior.

7. Hemograma

Foram avaliados diversos indicadores hematológicos nos animais dos 9 grupos em estudo, designadamente ao nível plaquetar, eritrocitário, leucocitário e reticulocitário, com o intuito de avaliar as alterações dos diferentes tratamentos no que respeita ao equilíbrio hemorreológico. Os resultados estão apresentados de uma forma sumária nas tabelas 5 e 6.

RESULTADOS

.....
Tabela 5 – Indicadores hematológicos para os grupos Controlo, BBN, CEL, CEL-10 P e CEL-1 P

	Controlo	BBN	CEL	CEL-10 P	CEL-1 P
Leu ($10^3/\mu\text{L}$)	4,600 \pm 0,558	3,517 \pm 0,255	2,850 \pm 0,853	4,500 \pm 0,435	2,129 \pm 0,633 ^c
GVs ($10^3/\mu\text{L}$)	7,578 \pm 0,290	8,072 \pm 0,112	7,343 \pm 0,082	7,655 \pm 0,096	6,386 \pm 0,454 ^{bbb}
HGB (g/dL)	14,150 \pm 0,524	14,600 \pm 0,146	13,275 \pm 0,144	14,050 \pm 0,201	12,257 \pm 0,652 ^{bb}
HCT (%)	40,417 \pm 1,686	42,112 \pm 0,441	38,025 \pm 0,427	40,412 \pm 0,667	33,871 \pm 2,553 ^{bb}
VCM (fL)	53,317 \pm 0,773	52,175 \pm 0,469	51,825 \pm 0,917	52,862 \pm 1,105	52,929 \pm 0,532
HCM (pg)	18,667 \pm 0,268	18,075 \pm 0,149	18,075 \pm 0,304	18,387 \pm 0,341	19,414 \pm 0,523
CHCM (g/dL)	35,033 \pm 0,294	34,638 \pm 0,118	34,900 \pm 0,041	34,763 \pm 0,137	36,714 \pm 1,107
CVE (%)	15,017 \pm 0,528	15,438 \pm 0,395	14,800 \pm 0,430	14,388 \pm 0,533	13,629 \pm 0,238 ^{bb}
PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	990,667 \pm 46,207	1008,125 \pm 46,959	884,750 \pm 42,576	942,375 \pm 36,890	662,000 \pm 65,912 ^{bbb c}
VPM (fL)	5,817 \pm 0,250	5,725 \pm 0,113	5,975 \pm 0,149	5,888 \pm 0,079	5,629 \pm 0,173
PTC (%)	0,571 \pm 0,018	0,575 \pm 0,021	0,526 \pm 0,017	0,553 \pm 0,020	0,367 \pm 0,028 ^{bbb cc}
CVP	16,383 \pm 0,320	16,137 \pm 0,258	16,875 \pm 0,225	16,675 \pm 0,191	16,343 \pm 0,193

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m. Os diferentes valores de significância: $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN; c – vs CEL.

Relativamente ao número de leucócitos, há a registar um ligeiro decréscimo no grupo CEL-1 P relativamente ao grupo CEL ($P < 0,05$) (tabela 5).

No que concerne aos parâmetros eritrocitários, verifica-se um decréscimo acentuado no nº de GVs, HGB, HCT e CVE, no grupo CEL-1 P relativamente ao grupo BBN ($P < 0,001$; $P < 0,01$; $P < 0,01$, respectivamente) (tabela 5).

Nos dados estudados relativos às plaquetas, regista-se no grupo CEL-1 P, uma vez mais, uma quebra acentuada no número de plaquetas face ao BBN ($P < 0,001$) e CEL ($P < 0,05$), assim como de uma quebra do plaquetócrito em relação aos mesmos grupos ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) (tabela 5).

RESULTADOS

Tabela 6 – Indicadores hematológicos para os grupos Controlo, BBN, AAS, AAS-250 P e AAS-25 P.

	Controlo	BBN	AAS	AAS-250 P	AAS-25 P
Leu ($10^3/\mu\text{L}$)	4,600 \pm 0,558	3,517 \pm 0,255	3,533 \pm 0,145	2,125 \pm 0,596 ^b	2,286 \pm 0,302
GVs ($10^3/\mu\text{L}$)	7,578 \pm 0,290	8,072 \pm 0,112	7,623 \pm 0,177	6,281 \pm 0,625 ^{bbb d}	7,606 \pm 0,153
HGB (g/dL)	14,150 \pm 0,524	14,600 \pm 0,146	13,767 \pm 0,463	11,675 \pm 0,961 ^{bbb d}	14,043 \pm 0,239
HCT (%)	40,417 \pm 1,686	42,112 \pm 0,441	39,433 \pm 1,419	32,962 \pm 3,365 ^{bbb d}	41,100 \pm 0,816
VCM (fL)	53,317 \pm 0,773	52,175 \pm 0,469	51,475 \pm 0,496	52,362 \pm 0,665	53,725 \pm 0,509 ^d
HCM (pg)	18,667 \pm 0,268	18,075 \pm 0,149	18,550 \pm 0,524	19,000 \pm 0,673	17,600 \pm 0,917
CHCM (g/dL)	35,033 \pm 0,294	34,638 \pm 0,118	36,025 \pm 1,118	36,313 \pm 1,401	32,688 \pm 1,535 ^d
CVE (%)	15,017 \pm 0,528	15,438 \pm 0,395	14,100 \pm 0,135	14,913 \pm 0,674	14,725 \pm 0,188
PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	990,667 \pm 46,207	1008,125 \pm 46,959	791,333 \pm 11,566	680,125 \pm 77,568 ^{bbb}	644,750 \pm 99,717 ^{bbb}
VPM (fL)	5,817 \pm 0,250	5,725 \pm 0,113	5,750 \pm 0,155	5,950 \pm 0,143	5,775 \pm 0,164
PTC (%)	0,571 \pm 0,018	0,575 \pm 0,021	0,445 \pm 0,009 ^a	0,402 \pm 0,044 ^{bbb}	0,367 \pm 0,054 ^{bbb}
CVP	16,383 \pm 0,320	16,137 \pm 0,258	16,550 \pm 0,290	16,825 \pm 0,289 ^b	16,650 \pm 0,272

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m. Os diferentes valores de significância: P<0,05; P<0,01 e P<0,001, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: b – vs BBN; d – vs AAS.

Os dados reativos ao estudo do AAS, estão expressos na tabela 6. Em relação ao número de leucócitos há a registar uma diminuição no grupo que tomou BBN com alta dose de AAS, face ao grupo BBN (P<0,05).

Relativamente aos parâmetros eritrocitários, destaca-se a redução no número de GVs, na concentração de hemoglobina e no hematócrito, para o grupo preventivo de alta dose comparativamente aos grupos BBN (P<0,001; ambos) e AAS (P<0,05; ambos), enquanto no grupo preventivo de baixa dose apenas se regista um ligeiro acréscimo no volume corpuscular médio (VCM) face ao grupo que só tomou AAS (P<0,05). Neste mesmo grupo (AAS-25 P), denota-se um decréscimo na concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) face ao AAS (P<0,05).

RESULTADOS

Em relação às plaquetas, a administração de AAS de forma preventiva nos dois estudos traduziu-se de forma idêntica, com a diminuição abrupta do número de plaquetas ($P < 0,001$) e do plaquetócrito ($P < 0,001$) comparativamente ao grupo somente administrado com o agente carcinogénico (tabela 6).

8. Equilíbrio oxidativo

Para a avaliação da peroxidação lipídica foi quantificada uma substância (malondialdeído) produzida no organismo por acção de espécies reactivas de oxigénio com moléculas lipídicas, mediante diferentes estímulos. Por outro lado, e de forma a se poder aferir sobre um equilíbrio, foi também medida a capacidade antioxidante total (TAS) nos 9 grupos de ratos.

8.1. Peroxidação lipídica (MDA) pelo método TBARS

Pela leitura da figura 30A, constata-se que os valores de malondialdeído encontrados no soro e nos órgãos foram muito diferentes nos 9 grupos em estudo.

Relativamente ao fígado, não se registaram variações de relevo entre os diferentes grupos, com excepção (e bem notória) do grupo Celecoxibe curativo, que valores muito elevados relativamente aos grupos BBN ($P < 0,001$) e CEL ($P < 0,001$) (figura 30^a).

No rim, foi perfeitamente visível a capacidade antioxidante do celecoxibe sozinho em relação ao Controlo ($P < 0,01$), verificando-se também decréscimo quando administrado preventivamente. Por outro lado, quando aplicado curativamente, o Celecoxibe gera um enorme aumento de malondialdeído neste órgão relativamente aos grupos BBN ($P < 0,001$) e CEL ($P < 0,001$) (figura 30A).

Quanto aos níveis séricos de malondialdeído, e tal como verificado para o rim, verifica-se uma diminuição no grupo CEL ($P < 0,05$ vs Controlo) e CEL-10 P ($P < 0,01$ vs BBN) (figura 30B). Porém, quando o Celecoxibe é administrado curativamente, os

RESULTADOS

níveis deste parâmetro dispararam para níveis altíssimos comparativamente aos grupos Celecoxibe e BBN ($P < 0,001$, para ambos).

Relativamente ao AAS, não se verificam alterações significativas, em nenhum dos tecidos para nenhum dos grupos.

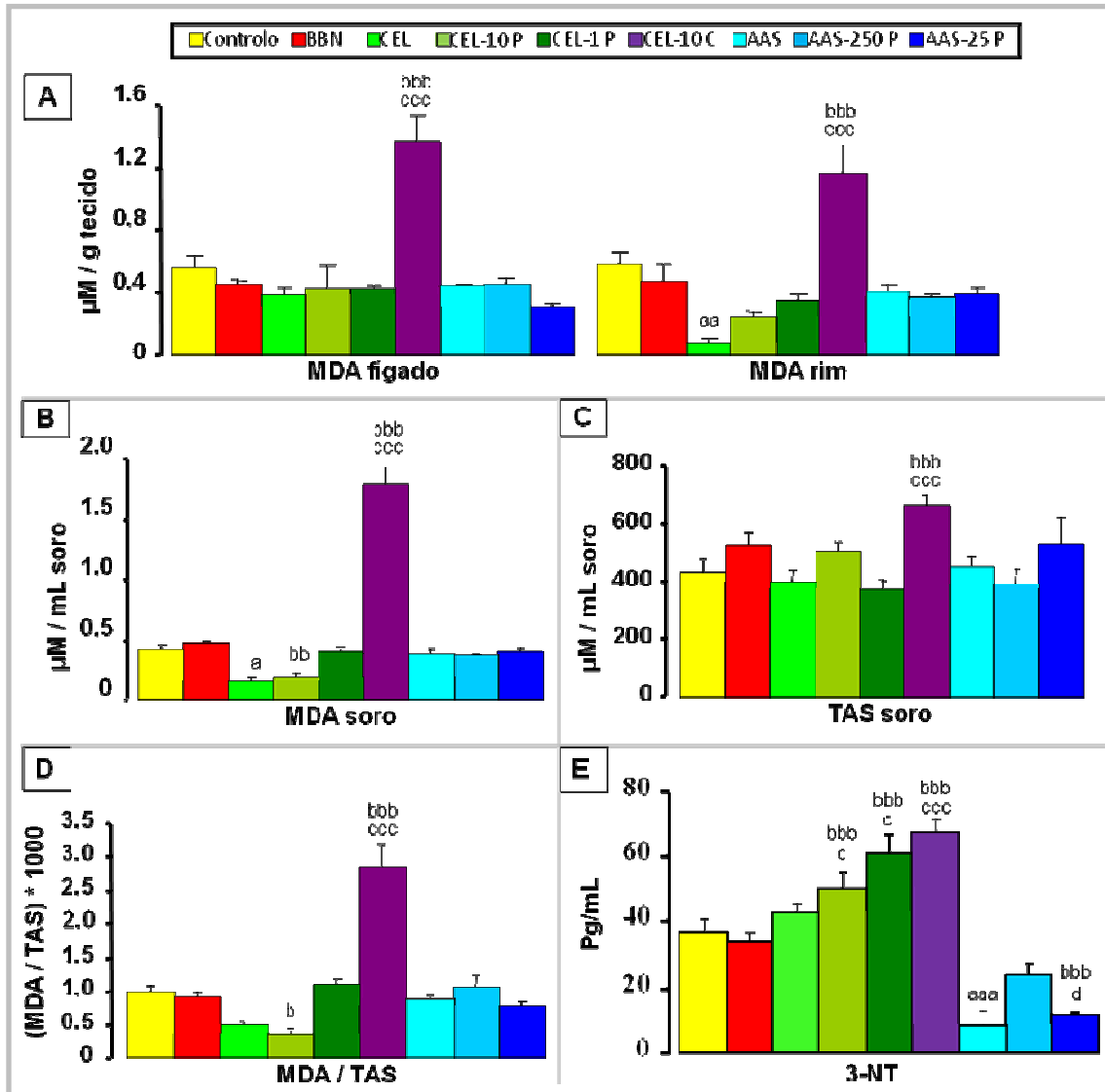


Figura 30 – Representação gráfica dos parâmetros de equilíbrio oxidativo avaliados.

- A – Valores de malondialdeído no fígado e rim.
- B – Valores de malondialdeído no soro.
- C – Valores da capacidade antioxidante total no soro.
- D – Valores do rácio MDA/TAS.
- E – Valores da nitrotirosina (3-NT).

Legenda: Os resultados representam médias (gramas) \pm e.p.m. Os diferentes valores de significância: $P < 0,05$; $P < 0,01$ e $P < 0,001$, são representados por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN; c – vs CEL; d – vs AAS

8.2. Capacidade antioxidante total (TAS)

No parâmetro que mede a actividade antioxidante total em soro (TAS) (figura 30C), foi notório um ligeiro decréscimo no grupo tratado com celecoxibe em baixa dose da forma preventiva, quando comparado com o grupo carcinogénico. Porém, o celecoxibe aplicado de forma curativa apresenta níveis mais elevados em comparação com o BBN e Celecoxibe ($P < 0,001$). Nos grupos testados com AAS, não se verificaram alterações significativas.

Fazendo uma análise comparativa entre os dois parâmetros (MDA e TAS), através do índice MDA/TAS, apenas há a destacar o efeito celecoxibe administrado de forma curativa, com índices muito elevados comparativamente aos grupos BBN e CEL ($P < 0,001$, em ambos). Contudo, deverá relatar-se a forte tendência para a redução nos grupos CEL-10 P 2 CEL-1 P. Nos grupos com AAS, não se constataram alterações significativas.

9. Histomorfologia da bexiga

O desenvolvimento ou não de carcinomas da bexiga neste modelo experimental com ratos Wistar machos, e o potencial efeito do Celecoxibe e do ácido acetilsalicílico, foram avaliados tendo por base parâmetros qualitativos e quantitativos. Primeiramente efectuou-se uma análise macroscópica a fim de avaliar quantitativamente o número de tumores e as suas dimensões, sendo posteriormente efectuada uma análise microscópica com vista à elaboração de um estudo qualitativo dos mesmos.

9.1. Avaliação do perfil macroscópico

As diferentes observações macroscópicas referentes aos grupos em estudo são descritas nas figuras 31, 32, 33, 34. À primeira vista (“olho nu”) ressalta logo a percepção da existência de resultados díspares entre os grupos, a que é consistente com os tratamentos diferenciados zelados.

RESULTADOS

No que diz respeito ao grupo Controlo (figuras 31A1 e A2), pode ser observada a ausência de qualquer tipo de malignidade a nível macroscópico, dado que tanto a bexiga representativa deste rato, como as dos restantes ratos deste grupo (não exibidas), mostraram um aspecto translúcido sem sinais evidentes de qualquer anomalia. Estes resultados serão mais tarde confirmados por análise microscópica. De referir que mesmo depois do momento da dissecação da bexiga o seu interior mostrava-se completamente normal, ou seja, não se verificou a existência de nenhuma massa tumoral, o que já era esperado para este grupo Controlo. De notar ainda a dimensão das bexigas terem aproximadamente 2 cm de comprimento, como é possível de constatar pelas imagens. Quanto aos vasos sanguíneos, estes demonstraram também características macroscópicas normais.

Relativamente às imagens dos grupos CEL e AAS (figuras 31B e 31C, respectivamente), observa-se um padrão muito semelhante ao obtido no grupo Controlo. Assim, as bexigas apresentavam-se bastante límpidas, sem aparentarem a presença de qualquer massa estranha, como se comprova nas imagens. As restantes bexigas dos mesmos grupos também se mostravam idênticas.

No que diz respeito a estes três grupos os resultados são concordantes com o esperado e de acordo com a bibliografia consultada, uma vez que não era nossa expectativa obter carcinomas ou qualquer tipo de anomalias que possam estar na génese tumoral. Por outro lado, é importante referenciar que não se verificaram alterações do tamanho das bexigas para os três grupos, confirmando-se assim a ideia de que o fármaco não provoca qualquer efeito nas bexigas, apesar de se ter verificado uma ligeira diferença final no peso dos ratos destes três grupos.

RESULTADOS

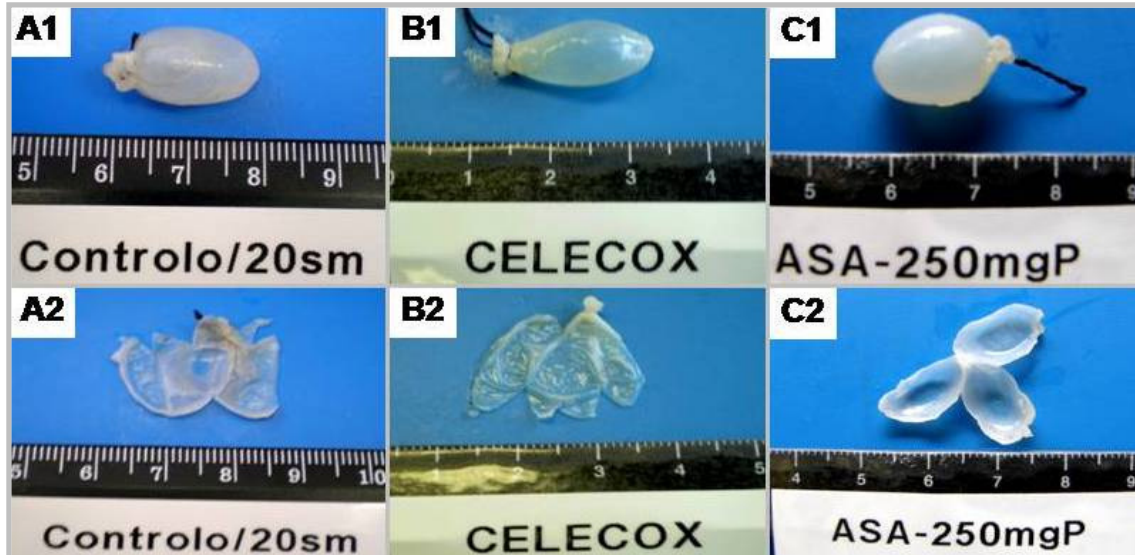


Figura 31 – Observações macroscópicas das bexigas relativas aos grupos Controlo, CEL e AAS.
Legenda: As imagens A, B e C correspondem ao grupo Controlo, Celecoxibe e ácido acetilsalicílico, respectivamente. A primeira de cada letra corresponde ao momento de recolha (forma de balão) e a segunda, após aberta para se efectuar a análise mais detalhada.

Incidindo agora sobre as observações recolhidas no grupo BBN, representadas na figura 31, verificou-se a incidência de tumores bastantes desenvolvidos e até facilmente visíveis a “olho nu”, contrariamente ao observado nos grupos referenciados anteriormente (Controlo, CEL e AAS) que não apresentavam qualquer anomalia. Além disso, é bem visível a presença de massa tumoral, mesmo sem a incisão na bexiga para posterior análise do conteúdo interior. Nota-se também que as massas tumorais são bem desenvolvidas, apresentando dimensões elevadas, sendo a bexiga ilustrada na figura 31A o caso mais crítico, na qual a massa tumoral ocupa quase todo o seu interior. Este facto é ainda mais relevante se comparados os tamanhos desta bexiga com os do grupo Controlo. Esta bexiga aparenta ainda uma dimensão maior, podendo dar a ideia que a sua expressão possa ocorrer devido ao crescimento tumoral. Nas figuras 32B observam-se tumores de menores dimensões, embora notavelmente desenvolvidos e com maior número comparado com as imagens referidas anteriormente.

RESULTADOS



Figura 32 – Observações macroscópicas de bexigas representativas do grupo BBN.

Legenda: As imagens A, B e C correspondem ao grupo BBN. O primeiro número de cada letra corresponde ao momento de recolha (forma de balão) (excepto letra B) e o segundo, após aberta para se efectuar a análise mais detalhada.

Verifica-se ainda na figura 32B1 a existência de vasos mais expressivos, sugerindo a ideia de angiogénese. Aliás, esta é uma característica que engloba quase todas as bexigas deste grupo.

Até ao momento (análise ainda apenas macroscópica), e comparando estes resultados apenas com o Controlo, é notável o papel do agente cancerígeno. Assim, mesmo não tendo provocado tumor em todos os ratos, desenvolveu tumores de massas bem distintas, que serão posteriormente analisados microscopicamente para possível comparação com massas cancerígenas humanas, uma vez que Grubbs e col (2000) afirmaram que o BBN induzia cancro de bexiga histologicamente semelhante aos humanos. De relatar que a análise microscópica das bexigas irá servir para analisar também o tipo de tumor, bem como as possíveis diferentes formações nele expressas.

Alusivo aos grupos que tomaram BBN e Celecoxib, pretendeu-se perceber uma possível acção anti-cancerígena do Celecoxib em efeito preventivo/curativo. As imagens representativas de 8 ratos são as mostradas na figura 33.

RESULTADOS

É nos resultados deste grupo que reside um dos principais objectivos deste estudo e a grande expectativa deste trabalho.

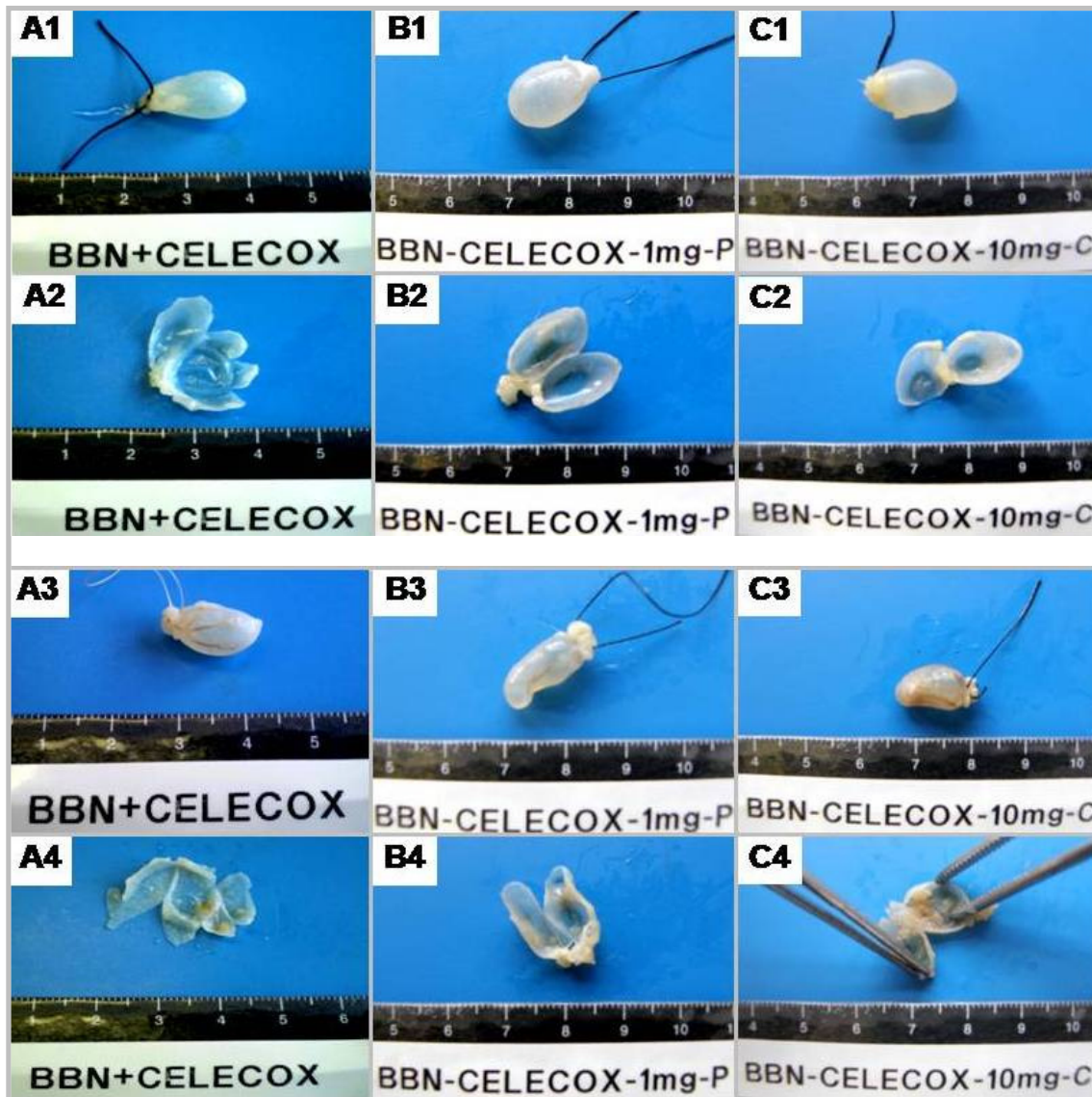


Figura 33 – Observações macroscópicas de bexigas representativas dos grupos BBN + CEL.

Legenda: As imagens A, B e C correspondem aos grupos celecoxib 10 mg preventivo, celecoxib 1 mg preventivo e celecoxib 10 mg curativo, respectivamente. Os números 1 e 3 de cada letra correspondem ao momento de recolha (forma de balão) e os 2 e 4, após aberta para se efectuar a análise mais detalhada.

No estudo em que se estudou o efeito preventivo do celecoxibe em alta dose, 87,5% dos ratos deste grupo não apresentaram qualquer tumor visível macroscopicamente (figura 33A2), o que foi posteriormente confirmado na microscopia. Os outros 12,5% que tinham massa tumoral, eram na verdade um só rato, de um grupo de 8, rato esse que apresentava quatro massas bem diferenciadas na bexiga,

RESULTADOS

com um volume tumoral total de 21 mm³ (figura 33A4). Perante este facto, uma evidência ressalta: o Celecoxib neste protocolo e dosagem provocou um efeito preventivo de desenvolvimento tumoral muito eficiente.

No grupo celecoxibe de baixa dose, os resultados foram idênticos, ou seja, 87,5% das bexigas não apresentaram formação de massa tumorais (figura 33B2). No entanto, nos outros 12,5% (que na verdade foi um rato em oito), ocorreu a formação de um só tumor de tamanho muito reduzido (<1 mm³) (figura 33B4).

Passando para a análise do efeito curativo do Celecoxibe constatou-se que, 78% destes ratos apresentaram massas tumorais bem definidas e muito semelhantes aos do grupo BBN que registou 65% de tumores. Uma das bexigas que não apresentou tumores, representativa de 22% das bexigas do grupo, está expressa na figura 33C2, enquanto a figura 33C4 se apresenta uma que representa a percentagem de 78% que apresentou cancro. Nesta última figura é bem visível o espessamento de vasos sanguíneos (angiogénese), que vão ser o suporte para o desenvolvimento tumoral. No que diz respeito aos estudos com o agente Celecoxibe, o volume das bexigas apresentavam as mesmas dimensões das registadas no grupo Controlo e também no grupo CEL.

Como ressalva, verifica-se que o celecoxibe actuou muito bem no campo da prevenção do tumor da bexiga (1 em 8: 12,5%), o que deixa em aberto boas perspectivas de utilização deste fármaco nesta aplicação. Porém, usado como curativo não se mostrou eficaz, pois a percentagem de ratos com tumor foi superior à do grupo BBN.

No estudo com AAS, verificou-se no grupo que tomou AAS em alta dose conjuntamente com o carcinogénico, grande inibição da formação tumoral, pois 75% dos animais não apresentaram tumor da bexiga (figura 34A2). Os outros 25% tinham tumores de dimensões reduzidas (<1 mm³) (figura 34A4). Já no grupo de baixa dosagem, os resultados não foram tão positivos. Assim, 62,5% apresentaram as bexigas completamente límpidas, sem massas tumorais (figura 34B2), enquanto os restantes 37,5% apresentou massas bem desenvolvidas, apesar do seu pequeno volume (figura 34B4). De forma idêntica ao descrito anteriormente, nestas bexigas que continham

RESULTADOS

tumores no seu interior, os vasos sanguíneos eram ligeiramente mais espessos que o normal, porém, não atingindo a grau evidenciado no grupo BBN.

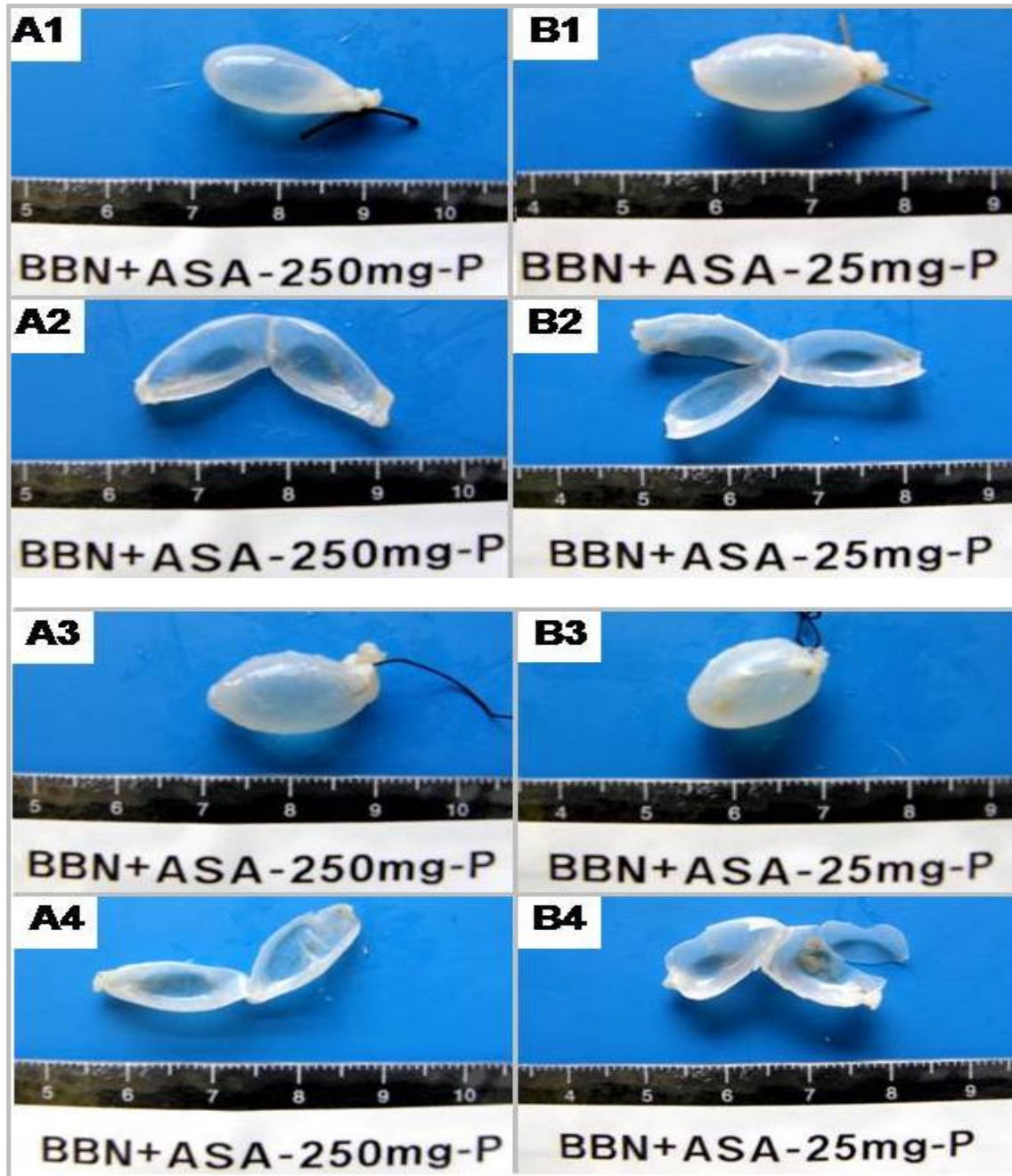


Figura 34– Observações macroscópicas da bexiga relativas aos grupos AAS alta e baixa dose.

Legenda: As imagens A e B correspondem aos grupos ácido acetilsalicílico 250 mg e ácido acetilsalicílico 25 mg, respectivamente. Os números 1 e 3 de cada letra correspondem ao momento de recolha (forma de balão) e os 2 e 4, após aberta para se efectuar a análise mais detalhada.

Em suma, verifica-se que o AAS em alta dosagem actuou muito bem no campo da prevenção do tumor da bexiga (2 em 8: 25%), o que deixa em aberto boas perspectivas de utilização deste fármaco. Porém, usado em menor dose, o seu papel de

RESULTADOS

.....
acção é mais discreto, uma vez que a percentagem de ratos com tumor foi superior, ainda que bastante inferior à verificada no grupo BBN.

As avaliações macroscópicas serão de seguida reforçadas através da análise microscópica, descrita em detalhe.

9.2. Avaliação quantitativa do tumor da bexiga

A avaliação do tumor da bexiga foi realizada através da quantificação da percentagem de ratos com tumor por grupo, do número de tumores por rato, complementadas com o volume tumoral (tabelas 7 e 8).

Da análise da tabela 7, de realçar a importância do BBN na indução do carcinoma da bexiga, com percentagens muito altas (65%), complementado com um volume tumoral elevado (720 mm³). Conforme esperado, os grupos Controlo e CEL não apresentaram quaisquer alterações neste capítulo. Nos estudos em que se estudou o efeito do celecoxib de forma preventiva, há a destacar as baixas percentagens de tumor por grupo (CEL-10 P – 12,5% e CEL-1 P – 25%), assim como dos volumes tumorais totais por grupo (21,2 mm³ e 0,5 mm³, respectivamente). Apenas de destacar que ambos os grupos apresentaram uma percentagem de ratos com tumor muito baixas, mas o efeito da baixa dose mostrou-se mais eficaz, pois só se gerou um tumor de dimensões muito reduzidas (e noutro rato, um ainda mais reduzido, detectado apenas microscopicamente), enquanto no grupo alta dose, apareceram quatro massas tumorais (também de dimensões reduzidas).

Porém, no grupo administrado com Celecoxibe na forma curativa, verificou-se uma percentagem de ratos com tumor superior ao BBN, apesar do volume tumoral total ser muito inferior a este grupo.

RESULTADOS

.....
Tabela 7 – Análise macroscópica para os grupos Controlo, BBN, CEL, CEL-10 P e CEL-1 P

Macroscopia	Controlo (n=8)	BBN (n=20)	CEL (n=4)	CEL-10 P (n=8)	CEL-1 P (n=8)	CEL-10 C (n=9)
<i>Número de tumores</i>						
% ratos com tumor	0	13 em 20 (65,0%)	0	1 em 8 (12,5%)	2 em 8 (12,5%)	7 em 9 (78%)
Nº tumores/grupo	0	0,8 ± 0,2 (16 em 20)	0	0,5 (4 em 8)	0,25 (2 em 8)	1,3 ± 0,6 (13 em 9)
Nº tumores/rato com tumor	0	1,2 ± 0,1 (16 em 13)	0	4,0 (4 em 1)	1,0 (2 em 2)	2,0 ± 0,8 (13 em 7)
<i>Volume tumoral (mm³)</i>						
Total (*média 8 ratos)	0	720,0*	0	21,2	0,5	319,3*
Média/rato com tumor	0	138,5 ± 7,5 (em 13)	0	21,2 (em 1)	0,25 (em 1)	59,8 ± 20,8 (em 6)
Média/tumor	0	112,5 ± 6,4 (em 16)	0	5,3 ± 0,4 (em 4)	1,0 (em 1)	35,9 ± 14,8 (em 12)

Em relação ao estudo do AAS, quando administrado sozinho não se verificou a existência de qualquer tumor. Já nos estudos preventivos, o que melhor inibiu a desenvolvimento tumoral, foi o de dose alta, pois só um em oito ratos desenvolveu cancro. Relativamente à baixa dose, três de oito ratos tinham tumor (37,5%), uma que representa um efeito preventivo, ainda que menor, destacando-se ainda a redução do volume tumoral, o que reforça o carácter benéfico na prevenção do desenvolvimento tumoral (tabela 8).

RESULTADOS

Tabela 8 - Análise macroscópica para os grupos Controlo, BBN, AAS, AAS-250 P e AAS-25 P.

Macroscopia	Controlo	BBN	AAS	AAS-250 P	AAS-25 P
<i>Número de tumores</i>					
% ratos com tumor	0	13 em 20 (65.0%)	0	2 em 8 (25%)	3 em 8 (37,5%)
Nº tumores/grupo	0	0.8 ± 0.2 (16 em 20)	0	0,25 (2 em 8)	0.5 (4 em 8)
Nº tumores/rato com tumor	0	1.2 ± 0.1 (16 em 13)	0	1.0 (2 em 2)	1.3 ± 0.3 (4 em 3)
<i>Volume tumoral (mm³)</i>					
Total (*média 8 ratos)	0	720,0*	0	0.26	7.9
Média/rato com tumor	0	138.5 ± 7.5 (em 13)	0	0.26 (em 2)	2.6 ± 1.4 (em 3)
Média/tumor	0	112.5 ± 6.4 (em 16)	0	0.26 (em 2)	2.0 ± 0.5 (em 4)

9.3. Avaliação do perfil microscópico

As observações microscópicas foram efectuadas após a realização de cortes longitudinais das bexigas dos ratos de cada grupo, tendo sido seleccionadas as imagens mais representativas de cada grupo. Naturalmente, nos grupos em que não se observaram quaisquer anormalidades apenas se descreve um número reduzido de cortes, procurando dar ênfase aos grupos em que se verificaram diferentes tipos de tumores e em diferentes fases de evolução.

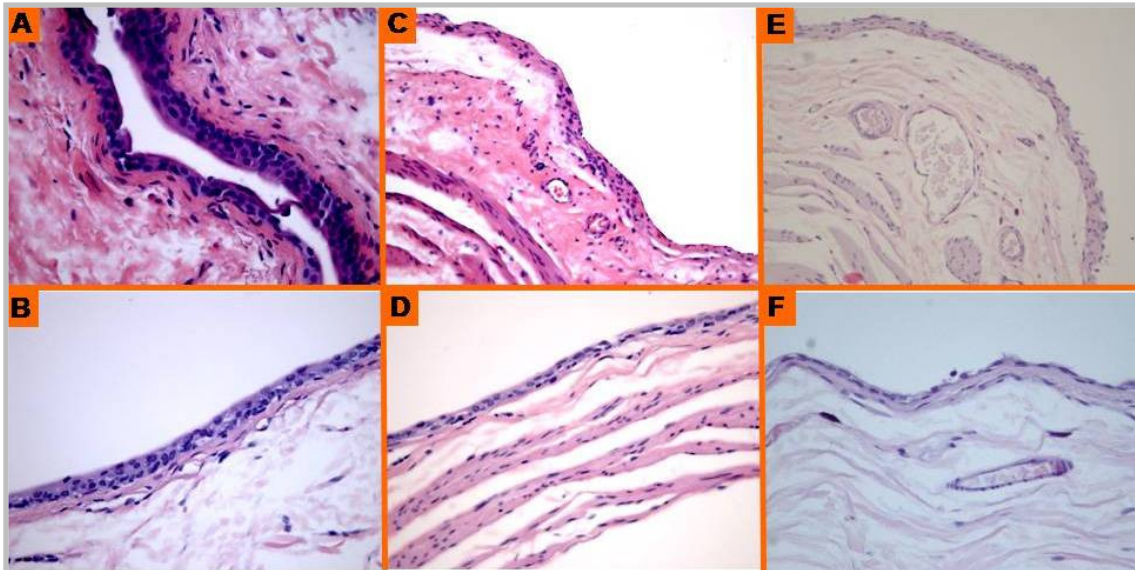


Figura 35 – Fotografias microscópicas das bexigas dos grupos Controlo (A e B), Celecoxib (C e D) e AAS (E e F).

Legenda: As imagens A e B representam cortes de diferentes bexigas de ratos usado o corante H&E e uma ampliação de 100x.

No que diz respeito ao grupo Controlo, observa-se nas imagens representativas deste grupo (figura 35A e B), a existência de qualquer tipo de anomalia, encontrando-se o urotélio no seu estado normal. As camadas celulares mantinham uma aparência de total regularidade, sem qualquer tipo de desarranjos ou anormalidades. Como consequência, pode inferir-se que o tratamento a que estes ratos foram sujeitos não promoveu qualquer alteração na morfologia das bexigas, traduzindo-se no resultado que já era totalmente esperado, uma vez que se trata do grupo controlo.

Relativamente ao grupo Celecoxib (figura 35C e D), é notório um edema da submucosa na imagem C enquanto na imagem D se verifica uma simples atrofia do urotélio. De referir que estas duas bexigas eram as que apresentavam maior alteração morfológica, sem no entanto qualquer delas apresentar carcinomas. Assim, é evidente

RESULTADOS

.....
que as outras bexigas se encontravam com um perfil histomorfológico muito idêntico às bexigas do grupo Controlo, ou seja, sem alterações microscópicas de relevo.

Relativamente ao estudo com AAS, verifica-se que esse composto sozinho provoca alterações no epitélio semelhantes ao Celecoxibe. Assim, na imagem E observa-se um edema, enquanto na imagem F está representada uma ligeira atrofia do urotélio, apesar de menor grau que no grupo Celecoxibe.

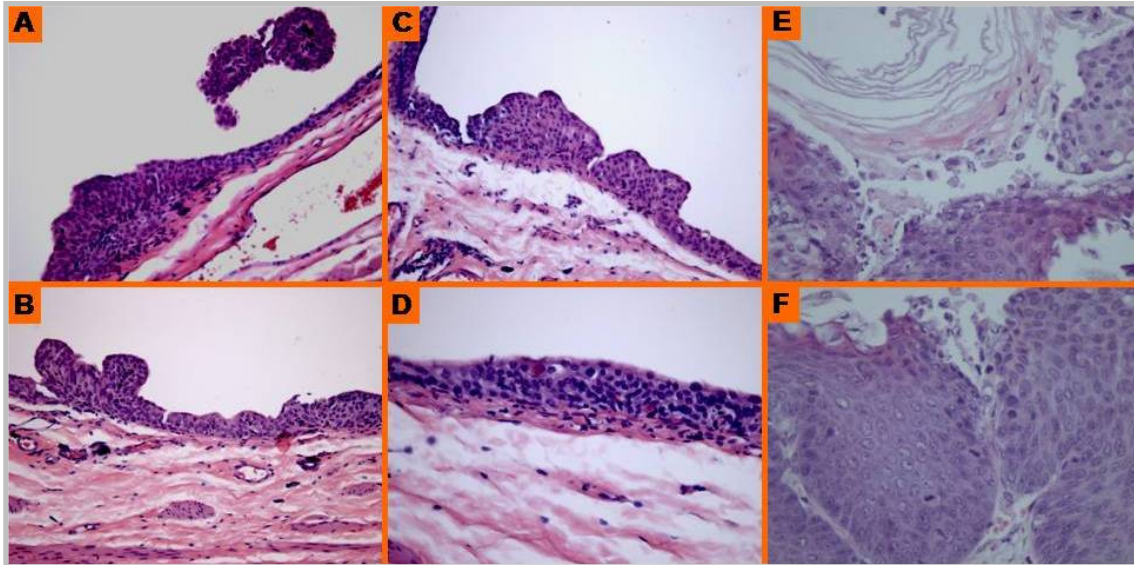


Figura 36 – Fotografias microscópicas representativas do grupo BBN.

Legenda: As imagens A, B e C, representam cortes de diferentes bexigas de ratos do grupo BBN, nas quais se utilizou a coloração H&E e uma ampliação de 100x. Na imagem D está expressa uma região ampliada (200x) da imagem B. Nas imagens E e F, estão representadas bexigas numa ampliação de 400x.

No que diz respeito ao grupo que tomou o agente cancerígeno (BBN), foram notórias alterações significativas ao nível das diferentes camadas que constituem a bexiga, em contraste com o observado no grupo Controlo (figura 36). Estes resultados indicam claramente a existência de urotélio com anormalidades profundas. Na imagem A contactou-se a existência de um pequeno carcinoma papilar bastante diferenciado no canto superior direito, ao mesmo tempo em que é notória uma hiperplasia de algumas camadas uroteliais, para além de atípia, isto é, displasia severa. Por seu lado, na imagem B é observada uma hiperplasia papilar com displasia moderada do urotélio. Na imagem C realça-se a existência de uma hiperplasia com displasia severa do urotélio, notoriamente bem mais evidente na imagem D, pois a sua ampliação é superior. Nas

RESULTADOS

.....
imagens E e F estão representados duas fases avançadas da tumorigênese, sendo elas a necrose com queratinização e células em mitose, respectivamente.

Em relação aos grupos em que se pretendeu avaliar o efeito do Celecoxib, os resultados estão apresentados na figura 37 e mais detalhadamente na tabela 5.

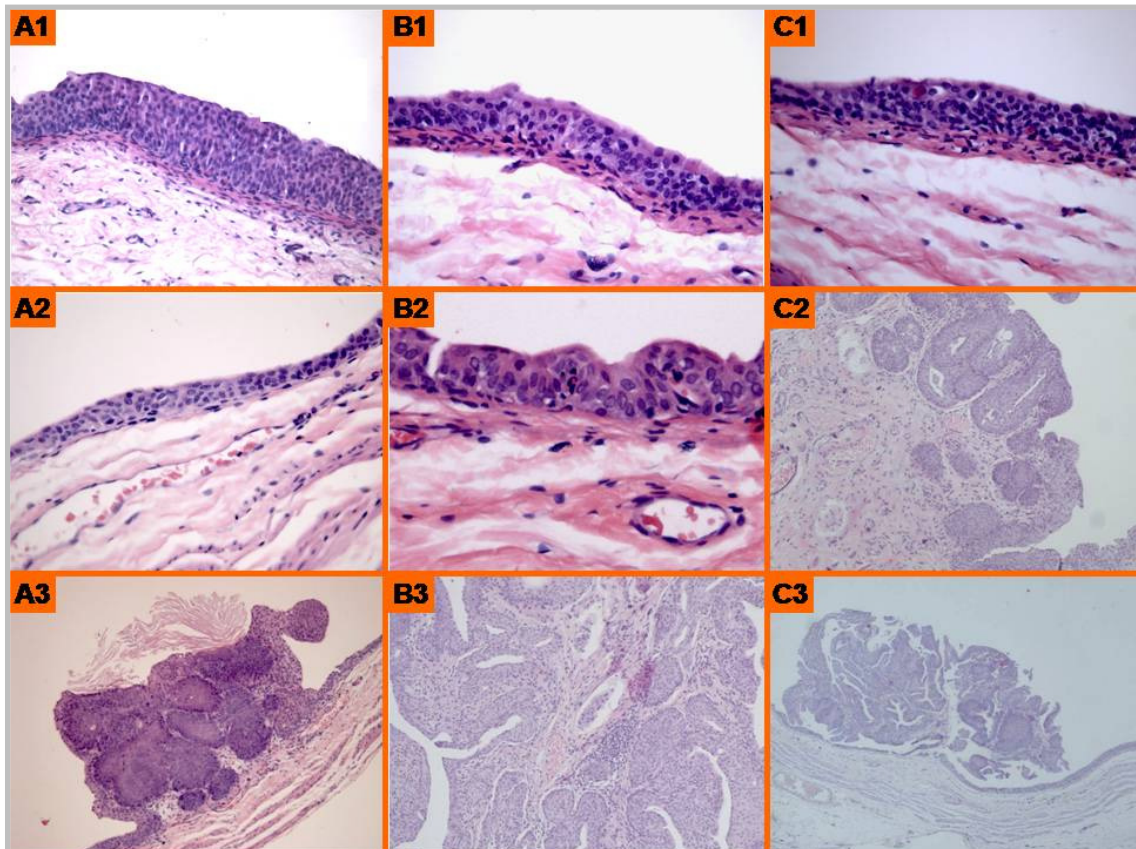


Figura 37 – Fotografias microscópicas representativas do estudo Celecoxibe.

Legenda: As imagens representam cortes de diferentes bexigas de ratos representativas dos grupos CEL-10 P, CEL-1 P e CEL-10 C, nas quais se utilizou a coloração H&E e ampliações de 40x (C3), de 100x (A1, A2, A3, B3, C2) e de 200x (B1, B2, C2).

No estudo com Celecoxibe preventivo (10 mg), verificaram-se estádios pouco avançados, maioritariamente atrofias e hiperplasias do urotélio (3 ratos – tabela 9), e um ou outro caso mais avançado, mas não representativos do grupo. Assim, na imagem A1 está apresentada uma bexiga com hiperplasia bem visível, enquanto a imagem A2 expressa um estadio de atrofia do urotélio. De referir que a imagem A3 diz respeito ao animal que apresentou tumor (o que fez com que este estudo não apresentasse uma eficácia total), sob a forma de tumores invertidos e sem invasão das camadas adjacentes.

RESULTADOS

.....
Contudo, reforça-se a ideia de que as restantes 7 bexigas apresentam ausência de tumores e características morfológicas muito pouco alteradas em relação à normalidade.

No estudo de Celecoxibe de baixa dose na forma preventiva (CEL-1 P), já se observou um maior número de bexigas com hiperplasia (63%) e displasias de baixo grau (imagem B1), assim como de tumores papilares (imagens B2 e B3). Este agravamento das fases de desenvolvimento tumoral foi acompanhado por um número ligeiramente superior de ratos com tumor da bexiga, especificamente, dois ratos em oito.

No estudo CEL-10 C, os resultados histomorfológicos foram ainda mais negativos, devido à percentagem de ratos com tumor ser inclusivamente superior à do grupo BBN. Este dado, reflete por si só, a incapacidade do farmaco em regredir as lesões que o agente cancerígeno provocou durante as oito semanas de administração antecedentes à administração do celecoxibe. Nas imagens C da figura 16 é bem notório um estadios mais avançado dos tumores (displasia severa, carcinoma invertido e carcinoma papilar, respectivamente).

De referir que todos os dados referentes à histomorfologia das bexigas, do estudo com o Celecoxibe se encontram descritos em pormenor na tabela 5.

Em suma, foram observadas diferentes características no mesmo grupo, o que dificulta uma análise mais sistematizada das suas características de cada grupo. Assim, a tabela 9 serve para elucidar os diferentes parâmetros avaliados nas bexigas, bem como a sua extensão nos diferentes grupos.

RESULTADOS

Tabela 9: Características histomorfológicas do urotélio no estudo do Celecoxibe.

Microscopy (qualitative)	Control (n=8)	BBN (n=20)		CEL (n=8)	CEL-10 P (n=8)		CEL-1 P (n=8)		CEL-10 C (n=9)	
		Com tumor	Total		Com tumor	Total	Com tumor	Total	Com Tumor	Total
		Hiperplasia	0		100 (13/13)	100 (20/20)	0	100 (1/1)	37.5 (3/8)	100 (2/2)
Displasia alto grau	0	100 (13/13)	75 (15/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)	0 (0/2)	0 (0/8)	14 (1/7)	11 (1/9)
Displasia baixo grau	0	0 (0/13)	25 (5/20)	0	100 (1/1)	12.5 (1/8)	100 (2/2)	62.5 (5/8)	100 (5/7)	66 (6/9)
Tumor papilar	0	100 (13/13)	65 (13/20)	0	100 (1/1)	12.5 (1/8)	100 (2/2)	25 (2/8)	100 (7/7)	77 (7/9)
Tumor infiltrativo	0	15 (2/13)	10 (2/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)	0 (0/2)	0 (0/8)	0 (0/7)	0 (0/8)
Carcinoma <i>In Situ</i>	0	31 (4/13)	20 (4/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)	0 (0/2)	0 (0/8)	0 (0/7)	0 (0/8)

Características dos grupos

BBN	Edema; metaplasia epidermóide; papilomas invertidos
CEL	Edema e atrofia do urotélio (muito menos intenso que com BBN)
CEL-10 P	Edema e atrofia do urotélio; crescimento invertido do urotélio
CEL-1 P	Edema e atrofia do urotélio; metaplasia epidermóide imatura; ninhos linfóides
CEL-10 C	Edema e atrofia do urotélio; metaplasia epidermóide

RESULTADOS

Em relação aos grupos em que se pretendeu avaliar o efeito do ácido acetilsalicílico, os resultados estão apresentados na figura 38 e, mais detalhadamente, na tabela 6.

No estudo com AAS de alta dose, a percentagem de ratos com tumores na bexiga foi baixa, correspondendo a estadios pouco avançados. Assim, somente duas bexigas apresentavam hiperplasia focal (A2), e as características mais evidentes foram a atrofia do urotélio e o edema da parede (imagem A1). As duas bexigas apresentavam tumores papilares de baixas dimensões (imagem A3).

Já no grupo administrado com AAS em baixa dose, a percentagem de ratos com tumor subiu ligeiramente, verificando-se também a eficiência do AAS em prevenir o desenvolvimento tumoral. A percentagem de hiperplasia subiu para os 50% (imagem B1), mas foi muito inferior à do BBN (100%). Foi também uma característica deste grupo o facto, nas bexigas que apresentaram tumor, aparecerem metaplasias epidermóides (imagem B2). De referir que todos os tumores eram papilares, ou seja, não evasivos (B3).

RESULTADOS

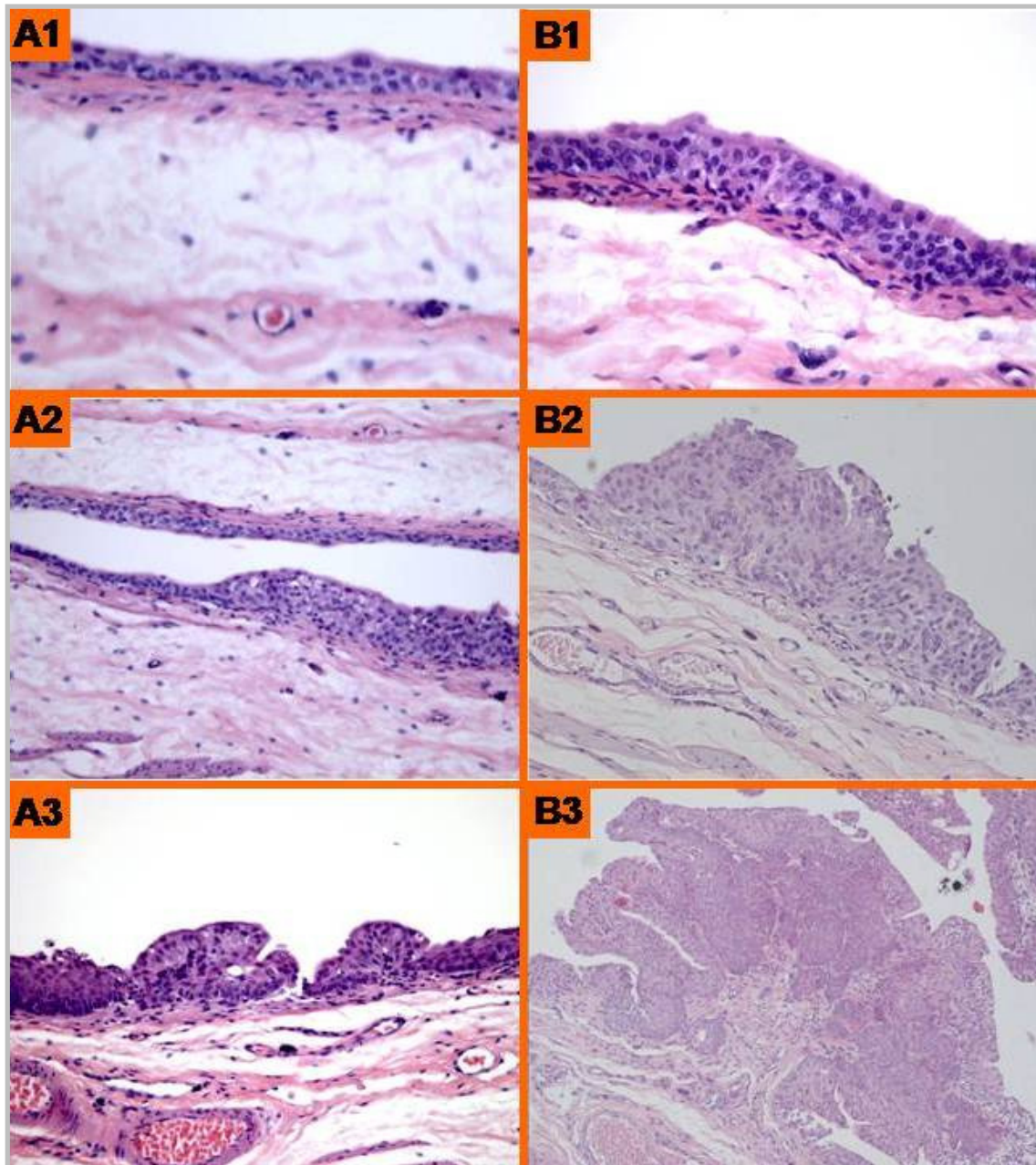


Figura 38 – Fotografias microscópicas representativas do estudo ácido acetilsalicílico.

Legenda: As imagens representam cortes de diferentes bexigas de ratos representativas dos grupos AAS-250 P e AAS-25 P, nas quais se utilizou a coloração HE e ampliações de 100x (A2, A3, B3) e de 200x (A1, B1, B2).

A tabela 10 sistematiza a informação recolhida para cada grupo em relação à análise das lesões no estudo do AAS.

RESULTADOS

Tabela 10: Características histomorfológicas do urotélio no estudo do ácido acetilsalicílico.

Microscopia (qualitativa)	Control (n=8)	BBN (n=20)		AAS (n=8)	AAS -250 P (n=8)		AAS -25 P (n=8)	
		Com tumor	Total		Com tumor	Total	Com tumor	Total
		Hiperplasia	0		100 (13/13)	100 (20/20)	0	0 (0/2)
Displasia alto grau	0	100 (13/13)	75 (15/20)	0	50 (1/2)	12.5 (1/8)	33 (1/3)	12.5 (1/8)
Displasia baixo grau	0	0 (0/13)	25 (5/20)	0	0 (0/2)	12.5 (1/8)	66 (2/6)	100 (8/8)
Tumor papilar	0	100 (13/13)	65 (13/20)	0	100 (2/2)	25 (2/8)	100 (3/3)	37.5 (3/8)
Tumor infiltrativo	0	15 (2/13)	10 (2/20)	0	0 (0/2)	0 (0/8)	0 (0/3)	0 (0/8)
Carcinoma <i>In Situ</i>	0	31 (4/13)	20 (4/20)	0	0 (0/2)	0 (0/8)	0 (0/3)	0 (0/8)

Características dos grupos

BBN	Edema; metaplasia epidermóide; papilomas invertidos
AAS	Edema e atrofia do urotélio (menos intenso que com BBN)
AAS-250 P	Edema e atrofia do urotélio
AAS-250 P	Edema e atrofia do urotélio; metaplasia epidermóide

Em suma, da análise das tabelas e figuras atrás mencionadas ressalta a clara noção de que o tratamento com CEL-10 P permitiu uma prevenção em larga escala do desenvolvimento tumoral, com uma redução significativa do número de tumores/grupo (12,5%), verificando-se apenas em um rato o desenvolvimento de tumores (4), de um total de 8 ratos do grupo. Ou seja, os resultados comprovam as apreciações macroscópicas, sugerindo um efeito altamente benéfico deste fármaco quando usado preventivamente no tumor da bexiga.

RESULTADOS

Mais ainda, numa dose mais baixa, ainda mostrou grande eficácia (apesar de ligeiramente menor – 25% de tumores). Contrariamente, a utilização curativa (CEL-10 C) é totalmente ineficaz na inibição dos tumores, parecendo mesmo algum agravamento. Em relação aos grupos AAS, ambas as doses apresentam algum efeito preventivo, mas inferior ao do Celecoxibe, e melhor para doses mais altas (25% vs 37,5%).

10. Marcadores tumorais e inflamatórios

Foram determinados em soro alguns marcadores tumorais (TGF- β 1 e TNF- α) e inflamatórios (PCR e IL-1 β) nos 9 grupos de ratos em estudo. Os resultados estão expressos sob a forma gráfica nas figuras 39 e 40, respectivamente.

10.1. Marcadores tumorais

Em relação ao TGF- β 1 em soro, os valores séricos no grupo BBN foram superiores em cerca de 15% em comparação com o grupo Controlo (figura 39A). No entanto, tomando como referência o BBN, verificou-se um decréscimo acentuado nos grupos CEL-1 P e CEL-10 C ($P < 0,01$) e também a prevenção do efeito BBN no grupo CEL-10 P, ainda que a redução tenha sido menos significativa. Em relação aos grupos administrados com AAS, o grupo AAS reduziu os valores de TGF- β 1 vs Controlo ($P < 0,01$), o mesmo se verificando no grupo AAS-250 P face ao grupo BBN ($P < 0,001$). No grupo de baixa dose registou-se também um decréscimo, mas menos acentuado que nos grupos anteriores ($P < 0,05$ vs BBN) (figura 39A).

RESULTADOS

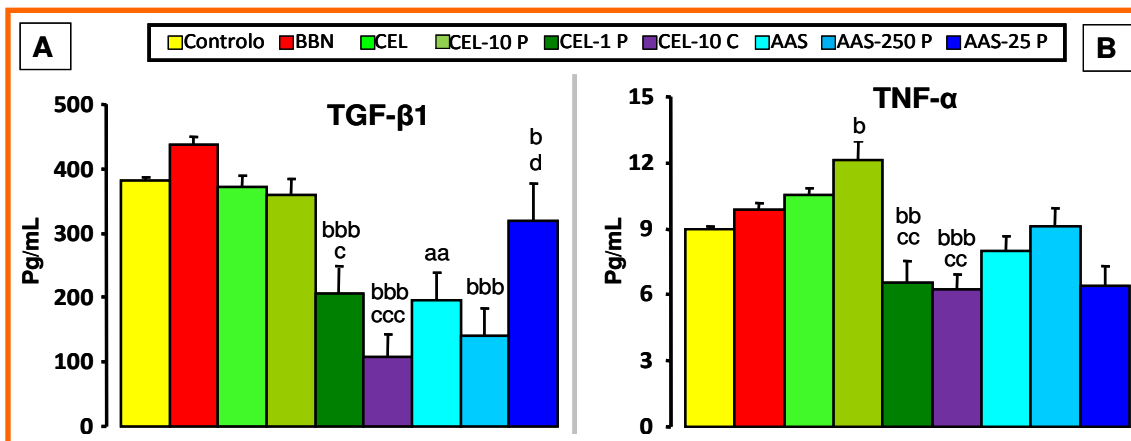


Figura 39 – Representação gráfica dos marcadores tumorais séricos: A – TGF-β e B – TNF-α.

Legenda: 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 por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN e c – vs CEL.

Os valores séricos de TNF- α (figura 18B), foram igualmente díspares de grupo para grupo. Não se verificaram diferenças de relevo entre o grupo BBN e o Controlo, apesar de um aumento tendencial. O grupo CEL-10 P foi o único a revelar um aumento significativo versus BBN ($P < 0,05$). Já no grupo CEL-1 P, observou-se uma diminuição dos valores ($P < 0,01$ vs BBN e CEL), com uma situação idêntica no grupo CEL-10 C ($P < 0,001$ vs BBN e $P < 0,01$ vs CEL). No estudo com AAS, não se registaram alterações significativas para nenhum dos grupos.

10.2. Marcadores de inflamação

Relativamente aos valores séricos da proteína C reactiva (PCR), verificou-se um acréscimo de cerca de 11% no valor do grupo BBN face ao Controlo ($P < 0,01$) (figura 40A). Nos grupos aos quais se administrou Celecoxib os índices decaíram drasticamente, com o Celecoxib sozinho a registar uma diferença para o grupo Controlo de aproximadamente 74% ($P < 0,001$). Quando se administraram os dois em conjunto (BBN+CEL 10 mg), a diferença foi muito inferior face ao grupo BBN ($P < 0,001$). Os grupos CEL-1 P e CEL-10 C, também revelam a enorme capacidade do Celecoxibe em diminuir os níveis desta proteína face ao grupo BBN ($P < 0,001$ para ambos) e CEL ($P < 0,001$ para ambos). Nos grupos administrados com AAS, verificou-se idêntica situação, com o grupo que só tomou AAS a revelar grande diminuição face ao grupo Controlo ($P < 0,001$). Seguindo na mesma linha, o facto de se administrar o agente

RESULTADOS

.....
cancerígeno ao AAS, não se traduziu num aumento da concentração sérica desta proteína, mantendo-se os níveis idênticos aos revelados pelo fármaco sozinho ($P < 0,001$ vs BBN). Assim, nestes grupos de ratos administrados com celecoxib e AAS, ficou patente a capacidade anti-inflamatória dos fármacos, pela diminuição drástica deste marcador (figura 40A).

De referir que a inflamação é um estado que pode conduzir à oncogénese, e a sua redução poderá ajudar a explicar a prevenção nos tumores da bexiga.

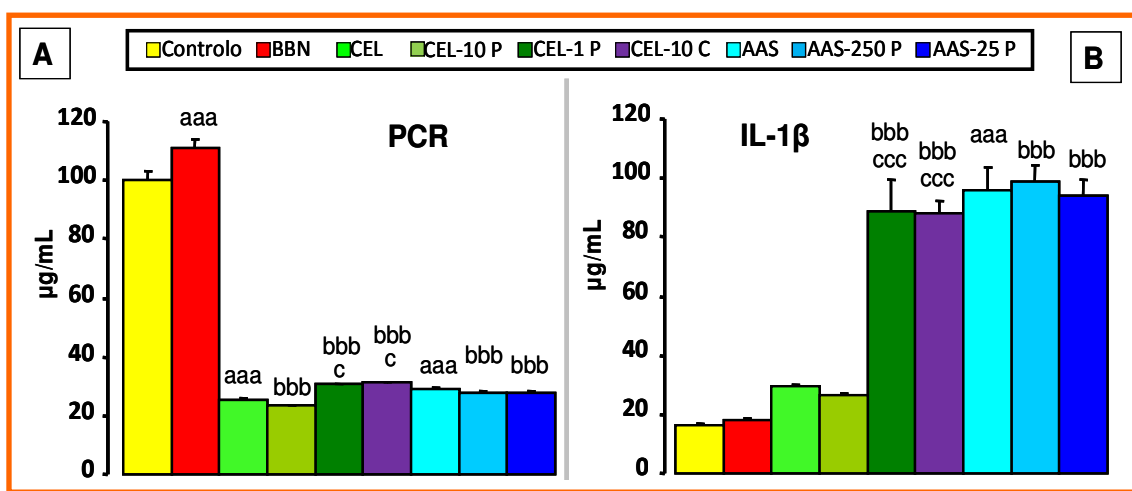


Figura 40 – Representação gráfica dos marcadores inflamatórios: A – PCR e B – IL-1β.

Legenda: 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 por uma, duas e três letras, respectivamente: a – vs Controlo; b – vs BBN e c – vs CEL.

No que concerne à concentração de interleucina-1β em soro (figura 18B), nos grupos BBN, CEL e CEL-10 P observou-se um ligeiro acréscimo em relação ao controlo, mas sem significado estatístico. Porém, no grupos Celecoxib de baixa dose e curativo (CEL-10 C), constata-se que os índices desta proteína inflamatória dispararam para níveis muito superiores face aos grupos BBN ($P < 0,001$) e CEL ($P < 0,001$). Há semelhança destes dois grupos, o AAS administrado sozinho também apresentou níveis altos ($P < 0,001$ vs Controlo), e que em conjunto com o BBN (ambas as doses), os níveis se mantiveram altos ($P < 0,001$ vs BBN). Estes dados parecem dar a informação que estes fármacos, apesar de serem anti-inflamatórios (como verificado nos valores de PCR no gráfico 18A), podem activar outras vias distintas dos mecanismos de inflamação.



E – DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em Portugal, o carcinoma vesical foi a décima causa de morte em 2005, com um total de 632 casos, num universo de 23.323 óbitos devido a tumores, representando 2,8% do total de óbitos por tumor (Puntoni e col., 2007). Nos últimos 25 anos a incidência cresceu 5%, mas o índice de mortalidade tem vindo a diminuir tanto nos homens como nas mulheres, e em todas as idades, podendo este dado dever-se à mudanças na detecção mais precoce e às melhorias na sobrevivência, particularmente devido aos avanços cirúrgicos (Voorzanger-Rousselot e col., 2007). Assim, a neoplasia da bexiga deverá ser considerada um problema de saúde pública devido à sua alta incidência e à frequência de recidivas de formas superficiais após o tratamento.

Os resultados obtidos até agora nas ciências químicas/biológicas em experiências de carcinogénese, de patologia e de epidemiologia, permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos básicos da quimioprevenção. Um exemplo muito bom deste mecanismo é a inibição da formação de nitrosaminas carcinogénicas através da vitamina C e E, solúveis em água, que obstruem a reacção entre aminas e nitritos secundários sob condições muito ácidas no estômago. A formação carcinogénica pode igualmente ser inibida impedindo a activação metabólica de pró-carcinogénios (Golijanin e col., 2006). Em 1985, Rehn verificou uma associação entre a exposição a aminas aromáticas e a neoplasia vesical em alguns trabalhadores de indústrias fabris. Mais associações foram identificadas posteriormente, tanto em modelos animais como em humanos que trabalhavam expostos a corantes artificiais (Lamm, 1998).

São diversos os oncogenes que parecem estar envolvidos no desenvolvimento do carcinoma urotelial, sendo vários os mecanismos que podem contribuir para o aparecimento da alteração genética, especialmente porque transfigura a célula de modo a fugir a mecanismos normais de controlo da proliferação celular. Os oncogenes frequentemente associados a esta patologia são os da família *ras*, especialmente o *p21ras*, que foi correlacionado com um grau histológico muito alto do carcinoma da bexiga. Os genes supressores de tumores têm como função proteger a célula de alterações genéticas e, assim, permitir a sua intercepção quando detectadas alterações no ADN. São descritos vários genes que promovem este controlo, como o gene do retinoblastoma, o p53, o p21, o INK4A/ARF e o PTEN.

Para além dos aspectos genéticos, eventualmente relevantes em alguns indivíduos, e de outros factores de risco já identificados (como o tabaco e a exposição a

DISCUSSÃO

carcinogénios), outros processos deverão estar envolvidos no aparecimento e/ou desenvolvimento do carcinoma da bexiga.

A carcinogénese pode ser considerada como uma desordem na transdução do sinal. Hormonas e factores de crescimento que regulam o crescimento, a proliferação e a diferenciação da célula comunicam entre si, através das membranas celulares, e de receptores (alguns receptores associados a enzimas). Os segundos mensageiros transportam a informação entre a membrana celular e o núcleo através do citoplasma. De entre os vários mensageiros, tem particular relevância a adenosina monofosfato cíclica (AMPC), o inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃), o diacilglicerol, as prostaglandinas e proteínas reguladoras como a proteína cinase activada por mitogénios (MAPK). As várias etapas de transdução do sinal podem ser locais alvo para acção de substâncias usadas na quimioprevenção, no sentido de restaurar o controle celular a índices normais.

No tecido humano, a COX-2 é expressa na displasia urotelial, no CIS e na maioria dos carcinomas de células transaccionais, independentemente da fase e do grau de desenvolvimento (Golijanin e col., 2006), sugerindo o envelhecimento de fenómenos inflamatórios neste processo. Para além disso, abre perspectivas interessantes quanto à utilização de fármacos inibidores da COX-2, como os AINEs e os inibidores selectivos da COX-2.

Os radicais de oxigénio, como o singlete oxigénio, o radical peróxido, o anião superóxido e radical hidroxilo, estão associados à carcinogénese e podem actuar em diferentes fases, como a iniciação, a promoção e a progressão tumoral. O stresse oxidativo, e a inflamação a ele associada, parecem estar intimamente associados ao desenvolvimento tumoral.

A ausência de clarificação em relação aos mecanismos fisiopatológicos precisos envolvidos no desenvolvimento de tumores da bexiga, assim como do envolvimento de agentes carcinogénicos no despoletar desta patologia, tem levado a comunidade médica e científica e incidir os seus esforços na descoberta de potenciais fármacos capazes de prevenir o desenvolvimento tumoral ou, quem sabe, reverter mesmo as neoplasias.

Devido à grande dificuldade de realizar estes estudos em humanos, recorre-se por diversas vezes aos estudos *in vitro* (órgãos e tecidos humanos) e em modelos animais *in vivo*. A utilização de modelos experimentais em animais tem conduzido as

DISCUSSÃO

.....
investigações no sentido da descoberta dos diferentes mecanismos fisiopatológicos eventualmente envolvidos no desenvolvimento tumoral. O animal mais usado tem sido o rato, pois apresenta grandes vantagens em relação a outros, como o facto de ser pequeno, de baixo custo e de fácil manutenção laboratorial. Para além disso, este animal possui muitas características morfológicas e funcionais semelhantes aos humanos.

O modelo de indução de carcinoma da bexiga em rato mais testado é o da administração de nitrosaminas (como O-BBN ou BBN). Porém, existem outros métodos e moléculas que também provocam resultados satisfatórios na indução do cancro na bexiga, como os derivados arsénicos (Bredfeldt, e col., 2006; Eblin e col., 2007). O tratamento de ratos com OH-BBN resulta no desenvolvimento de cancro da bexiga com células transicionais e escamosas, que têm marcadas semelhanças a nível histopatológico com a doença humana, tendendo a ser invasivos. Assim, este modelo tem sido usado para caracterizar o processo de desenvolvimento do cancro da bexiga e avaliar a eficácia de potenciais agentes preventivos (Grubbs e col., 2000).

Por estas razões, neste trabalho foi usada esta nitrosamina como agente indutor do cancro da bexiga para servir de suporte ao estudo dos efeitos do fármaco na quimioprevenção do tumor. Escolhidos o agente carcinogénico mais fiável, o modelo animal e o fármaco a testar (um inibidor da COX-2 e um AINE), construiu-se então um protocolo experimental para alcançar os seguintes objectivos principais:

- i) Caracterização e validação do modelo de indução de carcinoma vesical, comparando animais sujeitos ao agente cancerígeno (BBN) com ratos Controlo;
- ii) Avaliação do potencial efeito preventivo e curativo do Celecoxibe (em dose alta e baixa) no desenvolvimento de carcinoma vesical, comparando com o grupo administrado somente com o BBN.
- iii) Avaliação do potencial efeito preventivo do ácido acetilsalicílico no desenvolvimento de carcinoma vesical, comparando os grupos que tomaram BBN e AAS (em alta dose e baixa dose), com o grupo administrado somente com BBN.

i) Caracterização e validação do modelo de indução de carcinoma vesical

O rol de resultados obtidos, descritos no capítulo anterior, permite discutir agora, com mais pormenor, os parâmetros que revelaram maior importância na caracterização deste modelo de indução de tumores da bexiga. Assim, relativamente à análise histomorfológica, e mais especificamente à macroscopia, foi notória a eficácia do BBN no desenvolvimento de carcinomas, numa elevada percentagem (cerca de 65% num total de 20 ratos), com volumes tumorais muito significativos (em média cerca de 112 mm³). Esta primeira síntese permite não só verificar o aparecimento de carcinomas, como verificar a importância do BBN na progressão do tumor. Para comprovar esse facto, Gofrit e col. (2006) administraram BBN (a 0,05%) durante 35 semanas fêmeas Wistar para observar o desenvolvimento tumoral e obtiveram resultados em muito idênticos aos aqui revelados. Ou seja, o protocolo de 20 semanas (com 8 de administração de BBN e mais 12 de expressão tumoral) foi adequado, mostrando-se ser suficiente para a indução de uma elevada percentagem tumoral.

Numa análise mais minuciosa, as observações microscópicas revelaram que o BBN proporcionou o desenvolvimento de diferentes tipos de carcinomas ao nível da mucosa vesical, atingindo-se um número de tumores por rato de $1,2 \pm 0,1$. Após uma análise mais descritiva das bexigas do grupo BBN, foi possível elaborar a tabela 9 que expressa as diferentes características avaliadas. De entre elas, é de realçar uma hiperplasia severa seguida de um grau acentuado de displasia em algumas bexigas, havendo mesmo 4 casos de carcinoma *in situ*. De referir que estes dados vêm de encontro ao descrito na literatura por Bidinotto (2006) com a administração de BBN (0,05%) durante 18 semanas, apresentando todos os ratos hiperplasia como início do desenvolvimento tumoral no urotélio. Foi também notória a presença de papilomas invasivos (10%) de forma moderada. Segundo Klein e col. (2005), o estado de hiperplasia surge a partir de um aumento de proliferação celular e uma diminuição da apoptose, podendo conduzir a situações mais severas. Um outro factor que explica a passagem do urotélio normal para um fase de hiperplasia é explicado por Shiina e col. (2001). Estes autores formulam que o BBN (também a 0,05%) provoca alteração nas cateninas alfa e beta nas membranas celulares, levando a criar situações de ruptura entre células até se poder chegar a um estado de displasia. No nosso estudo o BBN revelou influência directa na progressão tumores, verificou-se um marcado desenvolvimento até estadios moderados, com massas tumorais de elevado volume (volume médio por rato

DISCUSSÃO

.....
com tumor de 138,5 mm³). Assim, fica reforçada a ideia de que a escolha do agente carcinogénico foi de encontro ao esperado.

A fim de verificar possíveis alterações nas propriedades bioquímicas, a nível celular e molecular, foram avaliados parâmetros séricos que complementam a análise microscópica. Os dados obtidos em relação ao equilíbrio oxidativo sugerem que a produção de espécies reactivas não é o factor determinante no desenvolvimento tumoral, uma vez que a razão MDA/TAS e a concentração de 3-NT não sofreram variação significativa relativamente ao Controlo. Só uma avaliação mais aprofundada de outros radicais e antioxidantes poderá confirmar esta sugestão. Contudo, os resultados mostraram um aumento das concentrações séricas de TGF- β e de TNF- α no grupo administrado com BBN em relação ao Controlo, apresentando o TGF- β um maior aumento. Estes dados, juntamente com a macro e microscopia, são reveladores de que a acção do BBN foi fundamental para o desenvolvimento tumoral, conduzindo a um estado de crescimento celular e de proliferação tumoral.

Foi ainda avaliada a influência de parâmetros da inflamação, através da quantificação sérica de PCR e de IL-1 β . Os resultados verificados são indicadores de que o BBN provoca um estado de inflamação no organismo do animal, com os valores da PCR e revelarem grande significância em relação ao Controlo. É sabido que o aumento significativo da concentração de PCR no soro é um sinal inequívoco da existência de um processo inflamatório em evolução. Esta proteína de fase aguda é produzida no fígado por estimulação da IL-6 (citocina pró-inflamatória), e é responsável pela activação da cascata do complemento que regula o processo inflamatório.

Em relação aos parâmetros de foro bioquímico e hemodinâmico, designadamente indicadores de função cardíaca, de perfil lipídico, de função renal e hepática e do hemograma, foram verificadas algumas alterações, sendo apenas descritas as mais relevantes.

O BBN originou um aumento das pressões arteriais sistólica, diastólica e média, sem alterar a frequência cardíaca. O único indicador de trofismo que sofreu alteração foi a massa cardíaca, verificando-se um ligeiro acréscimo. Ao nível da função renal constatou-se somente um aumento do ácido úrico, mas sem alteração do valor de creatinina e azoto ureico, nem da massa renal. Ou seja, parece não haver grande afectação da função renal. Em relação à função hepática, os indicadores bioquímicos

(TGO e TGP) revelaram um acréscimo considerável que também se verificou no aumento da massa do fígado. Este aumento poderá ficar a dever-se à metabolização hepática do BBN com as consequentes alterações.

De forma resumida, concluída a primeira etapa do estudo é possível afirmar que este modelo experimental escolhido é consistente, como já havia sido sugerido por outros investigadores com condições experimentais similares. Também é notório que o tempo de exposição ao BBN, o tempo de duração total do estudo e a dose de BBN administrada, foram os adequados para os objectivos traçados. A eficiência do BBN foi tão notável que algumas bexigas dos animais continham mais que um tumor, aleatoriamente enquadrados em diferentes estadios de diferenciação.

Na literatura é descrito que a expressão da COX-2 aumenta com o grau tumoral em TCC (Wadhwa e col., 2005). Testada a eficiência do BBN na indução tumoral, passou-se para a avaliação da eficácia do Celecoxibe (inibidor selectivo da COX-2) na prevenção do efeito carcinogénico do BBN.

ii) Avaliação do potencial efeito preventivo e/ou curativo do Celecoxibe no desenvolvimento de carcinoma vesical

A COX-2 é tida como um importante mediador na carcinogénese por via da proliferação celular, inibição da morte celular, indução da angiogénese e facilitação da invasão (Eblin e col., 2006).

O celecoxibe é um fármaco selectivo para a COX-2 que evidencia acções anti-inflamatórias, analgésicas e actividade antipirética em modelos animais. O mecanismo de acção é a inibição da síntese das prostaglandinas, primariamente pela via da inibição da COX-2, e que em concentrações terapêuticas em humanos não inibe a isoenzima Ciclooxygenase-1 (COX-1).

O celecoxibe é um anti-inflamatório que nos últimos anos tem sido testado por varias equipas de investigação na área da carcinogénese. Este facto resulta do facto da COX-2 ser uma enzima que poderá participar na iniciação de tumores. Segundo a literatura, a inflamação faz parte da carcinogénese, mas até ao momento não se decifrou

DISCUSSÃO

.....
se é a partir de um estado inflamatório que se poderá despoletar o desenvolvimento tumoral, ou se a inflamação é secundária às alterações primárias a nível genético. O aumento da expressão da COX-2 poderá ser suficiente para causar hiperplasia e carcinomas na bexiga. Assim, a inibição da COX-2 poderá ser proposta como um potencial alvo quimiopreventivo, e uma possível estratégia terapêutica de prevenção do desenvolvimento tumoral (Klein e col., 2005).

A COX-2 está relacionada com a regulação tumoral, associando-se à angiogénese, modulação do sistema imunitário, regulação da migração/invasão celular e inibição da apoptose. Existem outros produtos da via da COX-2, como o malondialdeído, que directamente forma aductos no ADN, resultando em mutações que podem dar início a um processo carcinogénico. Todos estes efeitos estimulam a progressão tumoral e ajudam a explicar o papel pró-neoplásico da COX-2 (Young e col., 2007).

Para além do uso clínico do Celecoxibe como anti-inflamatório, este fármaco tem sido testado na última década na área da carcinogénese com resultados satisfatórios na prevenção de certas linhas celulares (*in vitro*) e *in vivo* (modelos animais e humanos) (Pyrko e col., 2007; Smalley e col., 1997; Fujita e col., 1998; Liu e col., 1996; Fosslein, 2000; Koga e col., 1999; Buckman e col., 1998; Zimmermann e col., 1999; Tucker e col., 1999; Alhan e col., 2004).

Assim, e com base em mecanismos de actuação intracelular ao nível da proliferação celular e do processo de inflamação, decidiu-se testar o Celecoxibe como agente preventivo no carcinoma da bexiga.

Relativamente ao grupo administrado isoladamente com Celecoxibe, a partir do qual se poderiam avaliar os efeitos do fármaco por si só, sem possível interferência dos mecanismos de carcinogénese, verificou-se que não originava desenvolvimento de carcinoma da bexiga. De referir ainda que não apresentou alterações de ordem maior ao nível da microscopia (apenas um caso de atrofia do urotélio). Este resultado comprova a observação a “*olho nu*” de um estado de total limpidez das bexigas, com imagens semelhantes às do grupo Controlo.

Em relação à pressão arterial (sistólica, diastólica e média) constatou-se um aumento significativo em relação ao Controlo. De referir que as prostaglandinas têm um

DISCUSSÃO

papel importante na inflamação, manutenção da integridade da mucosa intestinal, na hemodinâmica microvascular renal, libertação de renina, absorção tubular de sais e água (Gupta e col., 2007). Assim, é notório o aumento da pressão arterial dos animais com a administração do Celecoxibe.

Em relação à função renal e hepática, e contrariamente ao que a literatura indica, não se constataram alterações em relação ao grupo Controlo. Gupta e col. (2007), demonstraram que os níveis de creatinina e ureia em ratos Wistar que tomaram celecoxibe eram superiores ao grupo controlo. Assim, concluíram que a dose de celecoxibe administrada (30 mg/kg/dia – três vezes superior à dose deste estudo), levava a danos na função renal, conduzindo a nefrite tubulointerstitial moderada. Num outro estudo prévio verificou-se que a administração de celecoxibe leva a alterações morfológicas pela diminuição intersticial de macrófagos e aumento da cápsula de Bowman (Ozturk e col., 2002). Contudo, Gupta e col. (2007) não observaram estas alterações, explicando que podem estar associadas à diferente dosagem e modelo apresentado. Alhan (2004) afirmava que o celecoxibe (administrado na mesma dosagem que neste estudo) não originava alterações na função renal. Já Angélico (2006) vai mais longe ao afirmar que o envolvimento das prostaglandinas no reflexo urinário é um factor que provoca o relaxamento muscular da bexiga e que o Celecoxibe consegue corrigir esse relaxamento por inibição da COX-2.

Em relação à função hepática, os parâmetros séricos não registam alterações, mas é de realçar o decréscimo na massa do fígado.

No que concerne aos índices aterogénicos, os resultados dão a ideia de o fármaco ser deslipidémico. Nos parâmetros do equilíbrio oxidativo, apenas de realçar o decréscimo do malondialdeído no soro e nos tecidos. Esta queda na produção de malondialdeído concorda com a ausência de tumores neste grupo, pois segundo o descrito na página anterior, as espécies reactivas formam directamente aductos no ADN, resultando em mutações que podem dar início a um processo carcinogénico. Os estudos de Gupta (2007), relativamente a este dado não foram concordantes com os nossos. O autor afirma que num estado agudo de toma do celecoxibe (6 horas) o valor de MDA é superior ao controlo, sendo ainda mais elevados em efeito mais prolongado (7 dias. Porém, o nosso valor do TAS é em muito similar ao do Controlo, prevalecendo uma melhor razão MDA/TAS, traduzindo-se num melhor capacidade antioxidante total.

DISCUSSÃO

Quanto aos valores tumorais e inflamatórios, apenas de realçar o acréscimo de TNF- α e de IL-1 β . De acrescentar que a principal função da interleucina-1, de modo semelhante do TNF- α , é servir como um mediador da resposta inflamatória do hospedeiro às infecções ou outros estímulos inflamatórios. A IL-1 funciona em conjunto com o TNF- α na imunidade inata e na inflamação, sendo a sua principal origem os fagócitos monoclonados activados. A maioria da IL-1 encontrada na circulação é a IL-1 β . Segundo alguns autores o TNF- α deve ser visto também como um marcador de inflamação, além de marcador tumoral. O PCR é um claro sinal de que o fármaco (é um anti-inflamatório) actuou da forma esperada, bloqueando a formação das prostaglandinas por inibição da COX-2.

Em relação aos grupos tratados com Celecoxibe e BBN (da forma preventiva e curativa), por comparação com o grupo administrado isoladamente com o agente carcinogénico (BBN), os resultados foram muito promissores para a compreensão de possíveis mecanismos terapêuticos. Os resultados obtidos neste grupo eram o principal objectivo deste estudo, e a grande expectativa deste trabalho. Com efeito, 87,5% dos ratos do grupo CEL-10 P não apresentou qualquer tumor visível macroscopicamente. Os outros 12,5% que tinham massa tumoral eram na verdade apenas um só rato, de um grupo de 8, rato esse que apresentava quatro massas bem diferenciadas na bexiga (apesar de dimensões reduzidas), com um volume tumoral total de 21 mm³. Perante este facto, uma evidência é certa: o Celecoxibe, nesta dose, provocou efeitos benéficos (neste caso, e como pretendido, efeitos preventivos). A eficácia só não foi total porque uma das bexigas deste grupo apresentou massas cancerígenas com notório espessamento dos vasos sanguíneos, sugerindo a ocorrência de angiogénese. Grubbs (2000) efectuou um tratamento em ratos com celecoxibe em condições análogas às nossas, mas com concentrações de Celecoxibe muito superiores (200, 500 e 1250 mg/kg). Nesse protocolo conseguiu reduzir a incidência de cancro em 65%. Os nossos resultados, com uma dose significativamente mais baixa, são bastante promissores.

Resultados igualmente inequívocos, foram os da dose baixa de Celecoxibe (1 mg/Kg/dia), que originou uma percentagem igualmente pequena (25%). Já no estudo em que se pretendeu avaliar o efeito do Celecoxibe na forma curativo, os resultados não são nada favoráveis à sua aplicação. Isto porque a incidência de cancro neste grupo teve um aumento (78% versus os 65% do grupo BBN). Estes dados parecem apontar claramente para o envolvimento de fenómenos inflamatórios no desenvolvimento

DISCUSSÃO

tumoral, sendo fármaco eficaz se for capaz de inibir o início do processo, mas totalmente ineficaz quando usado para reverter a inflamação já instituída.

Numa análise histomorfológica mais pormenorizada, os resultados evidenciam grandes avanços nos grupos preventivos comparando com o grupo BBN. O nível de hiperplasia diminuiu muito no grupo alta dose e menos acentuado no grupo de baixa dose, comparativamente aos 100% do grupo BBN. Mais ainda, o estado de displasia severa, não foi evidente em nenhum dos dois grupos preventivos, enquanto no BBN atingiu os 100% nos ratos que apresentavam tumor. Em relação às lesões neoplásicas, há a destacar a ausência de carcinomas *in situ* e de tumores invasivos nos dois grupos preventivos. Mais ainda, os tumores presentes nas bexigas que apresentavam tumor eram apenas papilares de fase TaG1 ou TaG2. Finalmente, e em comentário, alguns ratos apresentavam atrofia do urotélio e edema da mucosa, ambos num estado moderado. Assim, e de um modo global, as observações microscópicas revelaram-se concordantes com os dados macroscópicos e com a avaliação quantitativa, corroborando a eficácia preventiva do fármaco testado. Quanto à eficácia curativa deste agente, uma vez que a percentagem de tumores foi superior ao BBN, apenas há a destacar a redução do volume tumoral para metade, acompanhado da redução da média por tumor para cerca de um terço face ao grupo BBN. Estes dados parecem transmitir a ideia que o fármaco, através do seu efeito anti-inflamatório, inibe o aumento da inflamação que se gera com o desenvolvimento tumoral, não conseguindo, por seu lado, regredir as lesões que já estariam subjacentes à toma de BBN nas anteriores oito semanas. A histologia acompanha a tendência de que os estádios dos tumores formados não são tão graves, pois não existe a formação de tumores *in situ* nem de carcinomas infiltrativos. Porém, a percentagem de tumores papilares mantém-se inalterada comparativamente ao grupo BBN

Os marcadores tumorais e inflamatórios ainda vieram reforçar a ideia da eficácia do fármaco na prevenção tumoral. O TGF- β 1 tem como principal acção a inibição da proliferação e diferenciação das células T e a activação dos macrófagos. Porém, o TGF- β 1 tem muitas acções diversas fora do sistema imunitário, como o controlo na inibição da proliferação de alguns tipos celulares ou a estimulação de outras células. Os resultados registados no grupo CEL-10 P revelaram níveis de TGF- β 1 inferiores ao grupo BBN, prevalecendo a ideia de maior controlo no desenvolvimento celular. Essa ideia parece ser apoiada pelo resultado do TNF- α , pois a subida deste parâmetro face ao

DISCUSSÃO

.....
grupo BBN indica claramente a intenção do organismo em realizar um controlo mais apertado no desenvolvimento celular, com um maior número de células a serem eliminadas (por necrose). Já no grupo CEL-1 P, não se verificou tão apertado controlo, pois os níveis de TGF- β 1 e TNF- α decaíram bruscamente, daí a percentagem de tumores neste grupo ser superior ao de alta dose. Ainda mais assinalável é o decréscimo no grupo CEL-10 C, com os valores destes dois parâmetros a serem ainda mais baixos.

Em relação aos parâmetros inflamatórios, os níveis de PCR foram os previstos para todos os grupos administrados com Celecoxibe, pois são muito baixos face ao BBN, evidenciando a acção do fármaco. O facto da IL-1 β actuar como mediador da inflamação pode ser a explicação para o valor obtido ser superior ao BBN. Dos parâmetros aqui analisados, segundo a literatura, o TNF- α , o TGF- β 1 e a IL-1 β são factores que estando aumentados traduzem um aumento da COX-2 (Pruthi e col., 2004). Porém, só o valor de TGF- β 1 é concordante com o referido anteriormente, ou seja, os outros factores permaneceram altos, mas o número de tumores foi diminuto, sugerindo outras contribuições destes factores dentro do processo inflamatório.

Nos restantes parâmetros complementares da acção do organismo, há que ressaltar o acréscimo da glicose na corrente sanguínea no grupo CEL-10 P, o que não se regista nos restantes grupos. No controlo do peso dos animais é visível o menor desenvolvimento dos animais em que foi administrado Celecoxibe. Contudo, Reddy (2000) afirma que o fármaco não interfere com o desenvolvimento animal, o que é contrastante com os nossos dados. Ao nível da função cardíaca, neste grupo também é notória a proximidade dos valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média com o grupo BBN. Este estado de hipertensão é descrito na literatura, tanto pela acção do BBN, como pelo fármaco usado. Contudo, depois da toma dos agentes, esse aumento vai-se dissipando com o tempo.

No que concerne à função renal, destaca-se apenas um agravamento no grupo CEL-10 P, pelo aumento do azoto ureico, complementado com um ligeiro aumento da creatinina e um acréscimo acentuado dos níveis de ácido úrico. Estes dados não estão em concordância com os descritos na literatura. Com efeito, Alhan (2004) usou a mesma dose de celecoxibe (10 mg/kg/dia), mas conclui que não originava alterações na função renal. Nos restantes dois grupos (CEL-1 P e CEL-10 C) não se verificam alterações nesta função.

DISCUSSÃO

Em relação à função hepática apenas há a registar o agravamento no grupo curativo, não havendo alteração metabólica nos grupos preventivos. Na função lipídica apenas a destacar o índice aterogénico LDL/HDL (nos grupos CEL-1 P e CEL-10 C) a sofrer um acréscimo significativo que se traduz num maior factor de risco cardiovascular, o que também é aceite face ao fármaco em questão (inibidor selectivo da COX-2).

No que respeita ao equilíbrio oxidativo, os valores de MDA no fígado, rim e soro são muito idênticos. Porém, só há a enaltecer o enorme aumento no grupo curativo. De referir que estes valores estão aumentados três vezes mais que no grupo BBN. Nos grupos preventivos foi verificado um efeito protector do celecoxibe contra a formação tumoral, pois a formação de radicais livres é um dos processos que poderá conduzir ao desenvolvimento cancerígeno. O valor de MDA/TAS confirma esta noção, pois o grupo que menos tumores apresenta (CEL-10 P) tem um melhor balanço MDA/TAS, enquanto o grupo CEL-1 P (também eficaz na prevenção tumoral) já apresenta um ligeiro agravamento nesta razão. O grupo curativo, por sua vez, apresenta muitos tumores, acompanhados de um aumento da razão MDA/TAS. Num estudo realizado por Cimen (2007), em humanos em tratamento com 200 mg/dia de celecoxibe, os valores de MDA do grupo que tomou o fármaco foram muito idênticos aos do controlo. Em outro estudo, o autor refere que o índice de MDA em humanos com TCC aumenta em função do grau tumoral (Yaçin e col., 2004), o que também se confirmou no nosso trabalho. Em relação ao 3-NT (um indicador da formação de peroxinitrito), os valores não são favoráveis ao Celecoxibe, pois existe um aumento significativo nos grupos preventivos (maior no grupo de baixa dose), havendo ainda maior aumento no grupo curativo. Estes dados são passíveis de concluir que, apesar da peroxidação ser corrigida com o Celecoxibe nos grupos preventivos, o mesmo não sucede no controlo deste produto 3-NT, podendo este ser uma das vias que leva ao desenvolvimento tumoral.

No que respeita a possíveis mecanismos que possam levar ao desenvolvimento/prevenção do cancro da bexiga, existem diferentes pontos de vista. Por exemplo, o celecoxibe tem o efeito da indução de apoptose nas linhas celulares, com a redução da expressão da proteína Bcl₂. No entanto, estas alterações ocorrem independentemente da expressão da COX-2, sugerindo a presença de uma via independente para a COX-2 e a Bcl₂ (Gee J e col., 2006). O mesmo autor refere a inibição do crescimento celular (em 100%) como um efeito do celecoxibe em diferentes

doses e uma inibição da PGE₂ para valores superiores a 90%. Suleyman (2007) testou o efeito do celecoxibe na inibição da COX-2 e associou o decréscimo da inflamação à não expressão dos PPARs que controlam a expressão da COX-2. O nosso estudo sugere igualmente a redução da inflamação como um facto determinante na prevenção do desenvolvimento tumoral.

iii) Avaliação do potencial efeito preventivo do ácido acetilsalicílico no desenvolvimento de carcinoma vesical

O AAS é um composto inibidor da COX-1, mas que em altas doses modula a COX-2, levando à sua inibição. Tem evidenciado acções anti-inflamatórias, analgésicas e actividade antipirética em modelos animais. O mecanismo de acção é a inibição maioritária da síntese dos tromboxanos e, quando aplicado em doses superiores, inibe a síntese das prostaglandinas. O possível efeito anti-tumoral do AAS tem sido atribuído à directa inibição da COX-2. Contudo, a actividade ant-proliferativa do AAS não está correlacionada exclusivamente com a actividade inibitória da COX-2. O AAS pode induzir apoptose em células com reduzida expressão de COX-2 (Luciani e col., 2007). Porém, uma dose administrada que permite atingir concentrações séricas de 0,5 mM, é o suficiente para inibir a COX-1 e a COX-2. Mais ainda, segundo este mesmo autor, *in vivo*, quando o AAS é ingerido, o estomago é exposto a altas concentrações (600 mg), resulta em concentrações nos fluidos de aproximadamente 30 mM (Borthwick e col., 2006).

Neste estudo, o AAS evidenciou propriedades anti-cancerígenas no tumor da bexiga, pois ambas as doses testadas (250 mg e 25 mg) foram bem sucedidas neste modelo animal. Gee e col. (2008), testaram o AAS em doses baixas (100 mg) em humanos com carcinoma da bexiga de alto grau não invasivo, e relataram uma correlação entre os efeitos cardioprotectivos e a uma diminuição na taxa de recorrência do carcinoma da bexiga.

Numa análise mais detalhada, a macroscopia, complementada com os dados microscópicos, mostraram que a percentagem de tumores no grupo de alta dose foi muito baixa (25% - 2 ratos em 8), e que no grupo de baixa dose foi ligeiramente superior ao anterior (38% - 3 ratos em 8). Mais ainda, o volume tumoral nestes dois

DISCUSSÃO

.....
grupos foi muito inferior ao do BBN, assim como o volume médio de cada tumor. O grupo de alta dose apenas mostrou dois tumores de dimensões reduzidas em duas bexigas, enquanto no grupo de baixa dosagem, apareceram quatro tumores em três bexigas. Num estudo similar a este (Klän e col., 1993), em que foi administrado BBN durante nove semanas (em vinte semanas) a 29 ratos Wistar, apenas 8 apresentaram tumor (27,5%). No estudo preventivo com AAS a 0,1%, apenas um rato apresentou tumor. Comparativamente ao nosso estudo, nota-se que o nosso modelo indutor de carcinoma foi mais agressivo (com a mesma concentração), mostrando por outro lado o grande efeito do AAS na prevenção tumoral. Rao e col. (1996), num modelo animal induzido também por BBN para o desenvolvimento de tumores da bexiga, não obtiveram qualquer redução na incidência com duas doses de AAS (800 mg e 400 mg).

As lâminas microscópicas das bexigas vieram confirmar a eficácia do fármaco testado. Assim, contrariamente aos 100% de hiperplasia nas bexigas do grupo BBN, o grupo de alta dose apresentou apenas 25%, enquanto o grupo de baixa dose mostrou 50%. De referir que nestes dois grupos o número de bexigas com displasia severa foi muito baixo (25% em ambos). Quanto a lesões neoplásicas, todos os tumores evidenciados nas bexigas eram do tipo papilar, não havendo carcinomas *in situ* e invasivos.

O marcador tumoral TGF- β 1, mostra-se inferior em todos os grupos administrados com AAS, comparativamente com o grupo BBN. Tal dado é ainda mais significativo quando o grupo que apresenta menos tumores, apresenta também menor índice de TGF- β 1, passando para valores muito superiores quando se fala do grupo de baixa dose (apesar de mostrar eficácia anti-tumoral). Já o TNF- α não mostrou dados muito significativos para estes grupos, não se notando grande efeito do AAS.

O marcador de inflamação de fase aguda (PCR), mostra que o fármaco administrado actuou em conformidade com a sua característica – é um anti-inflamatório. Os níveis desta proteína caíram para valores muito baixos. Contudo, o outro marcador da inflamação – IL-1 β – não se mostrou tão favorável a inibição tumoral. Antes pelo contrário, nota-se que esta via inflamatória se encontra bem activa (ambos os grupos apresentam valores muito altos), podendo ser uma das vias que potencia o desenvolvimento tumoral nas bexigas que apresentaram tumor. Ou, em alternativa,

DISCUSSÃO

.....
poderá ser um mecanismo distinto que contribuiu para o efeito anti-tumoral. A sua contribuição deverá ser posteriormente confirmada.

No que respeita ao equilíbrio oxidativo, os valores de MDA no fígado, rim e soro, são muito idênticos e não apresentam qualquer alteração com o grupo Contolo. De referir que o mesmo se verifica para o marcador antioxidante TAS, ou seja, não existe alterações em nenhum grupo administrado com o AAS, não devendo advir daqui qualquer lesão que conduza à formação tumoral evidenciada anteriormente. A não alteração da razão MDA/TAS vem confirmar estes dados. Em relação à concentração de 3-NT em soro, os valores são muito favoráveis ao AAS, pois existe uma diminuição abrupta em todos os grupos. Estes dados permitem concluir que o AAS tem um enorme poder de inibição desta via oxidativa, e que não é por ela que surge o desenvolvimento tumoral. Já Luciani (2007) afirma, na sequência de um estudo realizado *in vitro*, que o AAS não afecta a produção de espécies reactivas de oxigénio.

No que respeita a possíveis mecanismos que possam levar ao desenvolvimento/prevenção do cancro pelo AAS, existem diferentes pontos de vista. No início desta década, a via de sinalização NF- κ B foi previamente identificada como um alvo para efeitos anti-inflamatórios de AINEs, como o AAS. De referir que genes regulatórios do crescimento celular, como o c-myc, p53 e a COX-2, são regulados pelo NF- κ B (Stark e col., 2001). Já Yeh e col. (1999) relatam que as principais acções do AAS passam por reduzir a actividade da N-acetiltransferase (NAT) e da formação de aductos de DNA em células humanas com tumor da bexiga, podendo ser uma das explicações para estes resultados muito encorajadores que obtivemos.

Nos restantes parâmetros complementares da acção do organismo, há a ressaltar a diferença de peso dos animais em que foi administrado Celecoxibe, não havendo nada na literatura que enalteça essa característica do composto. Ao nível da função cardíaca, neste grupo também é notória a proximidade dos valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média com o grupo BBN. Este estado de hipertensão é descrito na literatura, tanto pela acção do BBN, como pelo fármaco usado. Contudo, depois da toma dos agentes, esse aumento vai-se dissipando com o tempo. Porém, este fármaco é indicado como cardioprotectivo, uma vez que além dos efeitos comuns como anti-inflamatório, previne o enfarte de miocárdio através da inibição irreversível da COX-1 plaquetar, resultando na inibição da formação de tromboxano A₂ (Amann e col., 2002).

DISCUSSÃO

No que concerne à função renal, destaca-se apenas um ligeiro aumento do ácido úrico no grupo somente administrado com AAS, enquanto os grupos preventivos apresentam valores inferiores ao do BBN. Nos restantes parâmetros (ureia e creatinina), não existem alterações que possam ser indicativas do agravamento da função renal.

Em relação à função hepática apenas há um ligeiro agravamento no grupo preventivo de alta dose. Na função lipídica apenas a destacar o índice aterogénico LDL/HDL a sofrer um acréscimo significativo que se traduz num maior factor de risco cardiovascular.

Nos valores de hemograma há a registar a diminuição acentuada do número de plaquetas e do plaquetócrito nos dois grupos AAS preventivos versus o grupo BBN. Estes resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que o AAS está prescrito como anti-trombótico.

iv) Comentários finais

A tabela 11 resume as principais alterações encontradas nos diferentes grupos.

Em relação ao desenvolvimento tumoral (a sua prevenção ou regressão), constatou-se que o Celecoxibe promove uma excelente eficácia preventiva (em ambas as doses), mas não curativa ou regressiva. Este dado sugere que uma vez presente o tumor, a inibição da inflamação já não é suficiente para fazer regredir o mesmo. Ou seja, o tumor cresce (“alimenta-se”) de mecanismos inflamatórios, ligados à COX-2, mas não regride por inibição da COX-2.

No que diz respeito ao AAS, ambas as doses apresentaram um bom comportamento anti-tumoral, sendo a dose mais elevada mais eficaz, eventualmente por inibir mais eficazmente a COX-2. Lembra-se que o AAS inibe a COX-1 mas pode inibir também a COX-2 a doses mais elevadas.

DISCUSSÃO

Tabela 3 – Principais resultados.

	Carcinogénio (BBN)	Celecoxibe			AAS	
		Preventivo		Curativo	Preventivo	
		Alta dose	Baixa dose	Alta dose	Alta dose	Baixa dose
Desenvolvimento tumoral						
% Tumores	65	12,5	25	78	25	37,5
Vol. Tumoral total	720	21,2	0,5	319,3	0,26	7,9
Malignidade	Médio e alto grau	Baixo grau	Baixo e médio grau	Médio e alto grau	Baixo grau	Baixo e médio grau
Inflamação / proliferação						
TGF- β 1						
TNF- α						
PCR						
IL-1 β						
Stresse oxidativo						
MDA/TAS						
3-NT						

Legenda:

	 Muito benéfico	 Benéfico	 Sem efeito
	 Agrava moderadamente	 Agrava muito	

Trabalhos futuros deverão confirmar se a utilização do AAS com carácter curativo pode ser eficaz na regressão do tumor, ou se o resultado é idêntico ao encontrado pelo Celecoxibe curativo, ou seja, ineficaz.

No que concerne aos mecanismos eventualmente envolvidos no crescimento tumoral e na eficácia anti-tumoral dos fármacos, confirma-se que a inflamação terá um papel relevante, acompanhada de aspectos proliferativos (TGF- β 1). Trabalhos posteriores deverão esclarecer a contribuição da IL-1 β para estes processos, uma vez que aparece aumentada em grupos aos quais ocorreu prevenção do crescimento do tumor.

DISCUSSÃO

Por fim, a geração de espécies reactivas e o conseqüente stresse oxidativo, parecem não ser tão decisivos para o desenvolvimento do tumor. Contudo, um melhor perfil anti-oxidante nos grupos Celecoxibe preventivo poderá explicar um bom perfil anti-tumoral, em contraste com o agravamento do stresse oxidativo no grupo curativo, que se associa a um perfil anti-tumoral menos promissor.

Em suma, o tumor cresce com expressão ou actividade aumentada da COX-2. A sua inibição parece ser uma estratégia promissora para a prevenção, mas não regressão, do desenvolvimento tumoral.



F – CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

As conclusões do presente estudo prendem-se com três partes fundamentais: (1) análise global da indução do cancro, (2) efeito do Celecoxibe em tratamento preventivo e curativo e (3) efeito do AAS em tratamento preventivo no desenvolvimento do carcinoma da bexiga.

Em relação à análise da indução tumoral, fase na qual se pretendia proceder há validação de um modelo de **indução de carcinoma vesical**, pode concluir-se que:

- i) O protocolo elaborado, desde a escolha do agente cancerígeno (BBN), dose usada (0,05%), tempo de exposição (8 semanas de ingestão e 12 de indução tumoral), foi apropriado para a indução de carcinoma da bexiga. Os resultados comprovam isso mesmo, com uma percentagem de ratos com tumor bastante elevada (65%), o número de tumores por rato na ordem de 1,3 e um volume tumoral médio de 112 mm³.
- ii) A caracterização histomorfológica das lesões tumorais demonstrou a existência de tumores em diversas fases de desenvolvimento (hiperplasia severa, displasia moderada, metaplasia epidermóide num estado inicial, papilomas, atrofia do urotélio e proliferação pseudopapilar).
- iii) Os estudos histomorfológicos foram complementados por algumas determinações bioquímicas de marcadores de lesão tumoral e inflamação. Foi notório um aumento significativo de TGF- β e tendencial de TNF- α . Foram ainda patentes alterações nos marcadores inflamatórios, com níveis superiores (tendenciais) de PCR, bem como de IL-1 β .
- iv) O stresse oxidativo (com a formação de espécies reactivas) parece ter aqui um papel menos relevante que o processo inflamatório.

Em suma, confirma-se a alta eficácia deste protocolo no desenvolvimento tumoral (com o agente cancerígeno BBN) em estadios de diferenciação moderados, acompanhado por factores de crescimento, proliferação celular e processo inflamatório a contribuírem para a formação dos tumores.

CONCLUSÕES

Em relação à segunda parte que motivou a realização deste estudo: **prevenção ou regressão do tumor da bexiga por acção de um fármaco – o Celecoxibe**, inibidor selectivo da COX-2 – as principais conclusões foram:

- v) O fármaco mostrou uma grande eficácia na prevenção do desenvolvimento tumoral, reduzindo a incidência de 65% (BBN) para 13% (alta dose) e 25% (baixa dose). Assim, nas condições de estudo (em conjunto com o BBN – a que produz tumores similares aos encontrados em humanos), nas doses administradas (10 mg/kg/dia e 1 mg/kg/dia), no tempo testado (8 semanas mais 12 de instigação), foi eficaz na prevenção da indução de carcinoma da bexiga. Essa conclusão é retirada pela substancialmente menor percentagem de ratos com tumores, pelo reduzido número de tumores e pelo baixo volume tumoral médio (5,3 mm³ e 1 mm³, respectivamente) em comparação com o obtido pela acção do BBN (112,5 mm³). De acrescentar que o Celecoxibe usado no modelo curativo testado não apresentou resultados benéficos, pois a percentagem de ratos com tumor foi inclusivamente superior à do grupo BBN, apesar de uma redução de volume tumoral.
- vi) A análise histomorfológica das lesões corroboraram os dados apresentados anteriormente, ou seja, o grupo tratado com alta dose apresentou menos lesões pré-neoplásicas (hiperplasia, displasia alto e baixo grau) que o grupo de baixa dose. Em relação às lesões neoplásicas, verificou-se que, apesar da diminuta percentagem em ambos os grupos (com menor presença no grupo de alta dose), todas eram tumores papilares. Ou seja, o fármaco preveniu o aparecimento de carcinomas da bexiga, para valores muito significativos.
- vii) Esta conclusão foi ainda coadjuvada pelos marcadores bioquímicos de especificidade tumoral e inflamatória. Assim, foram encontrados valores de TGF- β e TNF- α concordantes com a acção do fármaco na prevenção tumoral (diminuição de TGF- β 1 e aumento de TNF- α) no grupo de alta dose. Por seu turno, no grupo de baixa dose a diminuição de TGF- β 1 ainda foi superior, enquanto a concentração sérica de TNF- α reduziu. No entanto, a redução drástica da concentração sérica de PCR certifica a eficácia do celecoxibe (nos dois grupos) na inibição da produção de prostaglandinas que controlam a inflamação. A IL-1 β , teve um aumento drástico no grupo de baixa dose, assim como o grupo curativo,

CONCLUSÕES

podendo ser este um factor que explica o maior número de tumores nestes dois grupos.

- viii) No equilíbrio oxidativo, o grupo de alta dose apresenta melhor perfil, enquanto no grupo de baixa dose não ocorreram alterações. Quanto ao grupo curativo, este apresentou um balanço muito negativo na relação MDA/TAS.

Em suma, confirma-se a alta eficácia do Celecoxibe na prevenção do desenvolvimento tumoral, por indução tumoral do agente químico BBN, revelando melhorias histomorfológicas (quantitativas e qualitativas), atenuação de factores de crescimento, melhoria do controlo do ciclo celular/proliferação celular na eliminação de células duvidosas e redução do estado inflamatório, que parece ser um dos factores essenciais ao desenvolvimento tumoral. Estes resultados recomendam e encorajam a continuação de estudos mais abrangentes de confirmação desta eficácia e de elucidação dos mecanismos celulares e moleculares precisos envolvidos neste efeito preventivo. No capítulo curativo, o Celecoxibe não é eficaz.

Em relação à terceira parte do estudo – verificação da **eficácia preventiva do AAS** – podem-se relatar as seguintes conclusões:

- ix) O fármaco mostrou uma grande eficácia na prevenção do desenvolvimento tumoral, reduzindo a incidência de 65% (BBN) para 25% (alta dose) e 38% (baixa dose). Assim, nas condições de estudo e nas doses administradas (250 mg/kg/dia e 15 mg/kg/dia), foi eficaz na prevenção da indução de carcinoma da bexiga. Essa conclusão é retirada pela notória menor percentagem de ratos com tumores, pelo reduzido número de tumores e pelo baixo volume tumoral médio (0,26 e 2,0 mm³, respectivamente), em comparação com o BBN (112,5 mm³).
- x) Na análise histomorfológica, comparando com as lesões apresentadas anteriormente, o grupo tratado com alta dose apresentou menos lesões pré-neoplásicas (hiperplasia, displasia alto e baixo grau) que o grupo de baixa dose. Em relação às lesões neoplásicas, verificou-se que, apesar da diminuta percentagem em ambos os grupos (com menor presença no grupo de alta dose),

CONCLUSÕES

todas eram tumores papilares. Ou seja, o fármaco preveniu o aparecimento de carcinomas da bexiga, para valores muito significativos.

- xi) Nos marcadores bioquímicos de especificidade tumoral e inflamatória, os resultados vieram coadjuvar os bons resultados verificados anteriormente. Assim, foram encontrados valores de TGF- β e TNF- α concordantes com a acção preventiva (diminuição de TGF- β 1 e aumento de TNF- α) no grupo de alta dose. Por seu turno, no grupo de baixa dose a diminuição de TGF- β 1 foi pouco significativa, enquanto a concentração sérica de TNF- α reduziu. No entanto, a redução drástica da concentração sérica de PCR certifica a eficácia do AAS (nos dois grupos) na inibição da produção de prostaglandinas que controlam a inflamação. A IL-1 β teve um aumento drástico no grupo de baixa dose, podendo ser este um factor que poderá explicar a presença de tumores.
- xii) No equilíbrio oxidativo, ambos os grupos não apresentam alterações. Porém, o AAS apresenta uma enorme acção positiva na inibição da formação de peroxinitrito, pois os valores de 3-NT registados foram muito baixos, mas com maior incidência no grupo de baixa dose.

Em suma, confirma-se a alta eficácia do AAS na prevenção do desenvolvimento tumoral, revelando melhorias histomorfológicas (quantitativas e qualitativas), com atenuação de factores de crescimento e melhoria do controlo do ciclo celular/proliferação celular. Assim, confirma-se que inflamação é um dos factores essenciais ao desenvolvimento tumoral. Acoplado a estes dados, aparece a enorme capacidade do AAS como inibidor da formação de peroxinitrito, fazendo que com que esta via não esteja associada pouco desenvolvimento tumoral.



**G – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

A

- ☞ **Alastair J.J. Wood**, The Coxibes, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. Drug Therapy. **2001**. vol 345. 6:433-442.
- ☞ **Alhan E**, Kalyoncu NI, Ercin C, Kural BV. Effects of the Celecoxibe on the acute necrotizing pancreatitis in rats. Inflammation. **2004**. 28:303-309.
- ☞ **Al-Sukhun S**, Hussain M. Molecular biology of transitional cell carcinoma. Clinical reviews in Oncology/Hematology. **2003**. 47:181-193.
- ☞ **Amann R**, Peskar B. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. European Journal of Pharmacology 2002. 447: 1-9.
- ☞ **Angelico P**, Guarneri L, Velasco C, Cova R, Leonardi A, Clarke DE, Testa R. Effect of cyclooxygenase inhibitors on the micturation reflex in rats: correlation with inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. BJU International. **2006**. 97:837-846.

B

- ☞ **Bartsch H**, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. Langenbecks Arch Surg. **2006**. 391:499-510.
- ☞ **Basler JW**, Piazza GA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective inhibitors for prostate cancer chemopreventive. The Journal of Urology. **2004**. Vol, 171: S59-S63.
- ☞ **Batu OS**, Erol K. The effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on experimental induced gastric ulcers in rats. Inflammopharmacology. **2007**. 15:260-265.
- ☞ **Betteridge DJ**. What is oxidative stress?. Metabolism. **2000**. 49:3-8.
- ☞ **Bhuiyan J**, Akhter J, O’Kane DJ. Performance characteristics of multiple urinary tumor markers and sample collection techniques in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. Clin Chim Acta. **2003**. 331:69-77.
- ☞ **Bidinotto LT**, Spinardi-Barbisan ALT, Rocha NS, Salvadori DMF, Barbisan LF. Effects of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on DNA damage and development of urothelial tumors in a mouse bladder carcinogenesis model. Environmental and molecular mutagenesis. **2006**. 47:624-630.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Borgono CA**, Fracchioli S, Yousef GM. Favorable prognostic value of tissue human kallikrein 11 (hK11) in patients with ovarian carcinoma. *Int J Cancer* **2003**. 106:605-610.
- ☞ **Borthwick GM**, Johnson AS, Partington M, Burn J, Wilson R, Arthur HM. Therapeutic levels of aspirin and salicylate directly inhibit a model of angiogenesis through a Cox-independent mechanism. *FASEB J* 2006. 20(12):2009-16.
- ☞ **Bredfeldt TG**, Jagadish B, Eblin, KE. Monomethylarsonous acid induces transformation of human bladder cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2006**. 216:69-79.
- ☞ **Buckman SY**, Gresham A, Hale P, et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. **1998**. 19:723-729.

C

- ☞ **Caine GJ**, Kehoe ST, Lip GY. The role of aspirin in carcinogenesis. *Br J Cancer* 2002. 87(11):1337-8.
- ☞ **Celik-Ozenci C**, Ustunel I, Erdogru T, Seval Y, Korgun ET, Baykara M, Demir R. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of rat uroepithelial cell junctions after partial bladder outlet obstruction and selective COX-2 inhibitor treatment. *Acta histochemica*. **2006**. 107:443—451.
- ☞ **Chakraborty S**, Roy K, Sengupta C. Exploring effects of different nonsteroidal antiinflammatory drugs on lipid peroxidation. Part II. 4-HNE profile. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. **2007**. 64:211-216.
- ☞ **Chan AT**, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005. 294(8):914-23.
- ☞ **Chan AT**, Giovannucci EL, Schernhammer ES, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, Fuchs CS. A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma. *Ann Intern Med* 2004. 140(3):157-66.
- ☞ **Chandrasekharan NV**, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, and Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci*. **2002**. 99: 13926-13931.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Chen F**, Sun S, Kuhn DC, et al. Involvement of NF-kappaB in silica-induced cyclooxygenase II gene expression in rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* **1997.** 272:779-786.
- ☞ **Cheng L**, Darson M, Cheville JC, Neumman RM, Zincke H, Nehra A, Bostwick DG. Urothelial papilloma of the bladder. Clinical and biologic implications *Cancer* **1999.** 86:2098-2101.
- ☞ **Cheng L**, Neumman RM, Bostwick DG. Papillary urothelial neoplasms of low malignant potencial. Clinical and biologic implications *Cancer* **1999.** 86:2102-2108.
- ☞ **Chyka PA**, Erdman AR, Christianson G, Wax PM, Booze LL, Manoguerra AS, CaravatiEM, Nelson LS, Olson KR, Cobaugh DJ, Scharman EJ, Woolf AD, Troutman WG. Salicylate poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila)* **2007.** 45(2):95-131.
- ☞ **Ciler Celik-Ozenci**, Ismail Ustunel, Tibet Erdogru, Yasemin Seval, Emin Turkey Korgun, Mehmet Baykara, Ramazan Demir. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of rat epithelial cell junctions after partial bladder outlet obstruction and selective COX-2 inhibitor treatment. *Acta Histochemica.* **2006.** 107: 443-451.
- ☞ **Cimen MYB**, Cimen OB, Eskandari G, Sahin G, Erdoğan C , Atik U. In Vivo Effects of Meloxicam, Celecoxibe, and Ibuprofen on Free Radical Metabolism in Human Erythrocytes. *Drug and Chemical Toxicology.* **2003.** 26:169-176.
- ☞ **Cordon-Cardo C**, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1992.** 84:1251-1256.
- ☞ **Czerniak B**, Herz F, Wersto RP, Koss LG. Assymmetric distribution of oncogene products at mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.***1992.** 89:4860-4963.

D

- ☞ **D'Ancona CA**, Cavaller AR, Ferreira U, Augusto V, Leitão SS, Pedro RN, Netto NRJr. Continent urinary diversion in patients with pelvic irradiation: an alternative utilizing transverse colon reservoir. *Int Urol Nephrol* **2005.** 37(3):499-500.
- ☞ **Dhawan D**, Jeffreys AB, Zheng R, Stewart JC, Knapp DW. Cyclooxygenase-2 dependent and independent antitumor affects induced by celecoxibe in urinary bladder cancr cells. *Mol Cancer Ther.* **2008.** 7:897-904.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Dovedi Sj**, Kirby JA, Davies BR, Leung H, Kelly JD. Celecoxibe has potent antitumor effects as a single agent and in combination with BCG immunotherapy in a model of urothelial cell carcinoma. *European Urology*. **2008**. Article in press.
- ☞ **Droller MJ**. Bladder Cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin*. **1998**. 48(5): 269-284.

E

- ☞ **Eblin KE**, Bredfeldt TG, Buffington S, Gandolfi AJ. Mitogenic signal transduction caused by monomethylarsonous acid in human bladder cells: role in arsenic-induced carcinogenesis. *Toxicological Sciences*. **2007**. 95:321-330.
- ☞ **Ejarque MJ**, Vicente M, Bernues M, Oliver A, Vicente J, Capella G, Lluís F, Chechile G. Restriction fragment length polymorphism of the L-myc gene is not a prognostic factor in bladder cancer patients. *Br J Cancer*. **1999**. 79:1855-1858.
- ☞ **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.

F

- ☞ **Fantappiè O**, Solazzo M, Lasagna N, Platini F, Tossitore L, Mazzanti R. P-glicoprotein mediates celecoxibe-induced apoptosis in multiple drug-resistance cell lines. *Cancer Res*. **2007**. 67:4915-4923.
- ☞ **Federico A**, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. **2007**. 121:2381-2386.
- ☞ **Ferguson RK**, Boutros AR. Death following self-poisoning with aspirin. *Journal of the American Medical Association* 1970. 213(7):1186-1188.
- ☞ **Finkel T**, Holbrook NJ. Oxidants. Oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000. 408:239-247.
- ☞ **Fosslein E**. Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Clinical reviews in clinical laboratory sciences*. **2000**. 37:431-502.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Fosslien E.** Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci.* **2000.** 30:3-21.
- ☞ **Fujita T,** Matsui M, Takaku K, et al. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res.* **1998.** 58: 4823-48236.
- ☞ **Fukui Y,** Samma S, Fujimoto K, Akiyama T, Yamaguchi A, Hirayama A. Screening methods in the detection of bladder cancer: comparison of nuclear matrix protein-22, bladder tumor antigen and cytological examinations. *Hinyokika Kiyo.* **2001.** 47:311–314.

G

- ☞ **Gardner B,** Zhu LX, Sharma S, Tashkin DP, Dubinett SM Methanandamide increases COX-2 expression and tumor growth in murine lung cancer. *FASEB J.* **2003.**17:2157–2159.
- ☞ **Gazzaniga P,** Gandini O, Giuliani L, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood: a new marker of circulating neoplastic cells in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* **2001.** 7:577–583.
- ☞ **Gee J,** Lee IL, Jendiroba D, Fischer SM, Grossman HB, Sabichi AL. Selective cyclooxygenase inhibitors growth and induce apoptosis of bladder cancer. *Oncology Reports.* **2006.** 15:471-477.
- ☞ **Gee JR,** Jarrard DF, Bruskewitz RC, Moon TD, Hedican SP, Levenson GE, Nakada SY, Messing EM. Reduced bladder cancer recurrence rate with cardioprotective aspirin after intravesical bacille Calmette-Guérin. *BJU Int* 2009. 103(6):736-9.
- ☞ **Giannopoulos A,** Manousakas T, Gounari A, Constantinides C, Choremi-Papadopoulou H, Dimopoulos C. Comparative evaluation of the diagnostic performance of the BTA stat test, NMP22 and urinary bladder cancer antigen for primary and recurrent bladder tumors. *J Urol.* **2001.** 166:470–475.
- ☞ **Gofrit ON,** Birman T, Ayesh S, Ohana P, Hochberg A. Chemically induced bladder cancer-A sonographic and morphologic description. *Urology.* **2006.** 68:231-235.
- ☞ **Golijanin DJ,** Kakiashvili D, Madeb RR, Messing EM, Lerner SP. Chemoprevention of bladder cancer. *World J Urol.* **2006.** 24:445-472.
- ☞ **Grubbs C,** Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steele VE, Kelloff GJ, Hill DL, Seibert K. Celecoxibe inhibits N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- induced urinary bladder cancers in Male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *Cancer research*. **2000**. 60:5599-5602.
- ☞ **Gupta S**, Sarotra P, Aggarwal R, Dutta N, Agnihotri N. Role of Oxidative Stress in Celecoxibe-Induced Renal Damage in Wistar Rats. *Dig Dis Sci*. **2007**. 52:3092-3098.
- ☞ **Gupta S**, Srivastava M, Ahmad N, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*. **2000**. 42:73-78.
- ☞ **Gutierrez Banos JL**, del Henar Rebollo Rodrigo M, Antolin Juarez FM, Garcia BM. Usefulness of the BTA STAT Test for the diagnosis of bladder cancer. *Urology* **2001**. 57:685-689.
- ☞ **Gutierrez Banos JL**, Rebollo Rodrigo MH, Antolin Juarez FM, Martin Garcia B. NMP 22, BTA stat test and cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Urol Int*. **2001**. 66:185–190.

H

- ☞ **Halliwell B**. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*. **1994**. 344:721-724.
- ☞ **Hamberg M**, Samuelsson B. On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. *J Biol Chem*. **1967**. 242:5336-5343.
- ☞ **Hartwig-Otto H**. Pharmacokinetic considerations of common analgesics and antipyretics. *Am J Med* 1983. 75(5A):30-37.
- ☞ **Holtzman MJ**, Turk J, and Shornick LP. Identification of a pharmacologically distinct prostaglandin H synthase in cultured epithelial cells. *J Biol Chem*. **1992**. 267:21438-21445.

I

- ☞ **Imaeda AB**, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, Flavell RA, Mehal WZ. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 2009. 119(2):305-14.

J

- ☞ **Jung I**, Messing E. Molecular Mechanisms and Pathways in Bladder Cancer Development and Progression. *Cancer Control*. **2000**. 7:325-334.
- ☞ **Jung K**, Lein M, Stephan C, et al. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int J Cancer*. **2004**. 111:783-791.

K

- ☞ **Kamai T**, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI. Decreasing of p27 (Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer*. **2001**.84:1242-1251.
- ☞ **Kigure T**, Wakayama Y, Satoh Y, Fujieda N, Yoshida K, Harada T. Urinary basic fetoprotein in the diagnosis and follow-up of patients with urothelial carcinoma. *Cancer* **1996**. 77:1529–1534.
- ☞ **Kishi K**, Hirota T, Matsumoto K, Kakizoe T, Murase T, Fujita J. Carcinoma of the bladder: a clinical and pathological analysis of 87 autopsy cases. *JUrol*. 1981. 125(1): 36-9.
- ☞ **Klän R**, Knispel HH, Meier T. Acetylsalicylic acid inhibition of n-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1993;119(8):482-5.
- ☞ **Klein RD**, Van Pelt CS, Sabichi AL, Cerda JD, Fisher SM, Furstenberger G, Muller-Decker K. Transitional cell hyperplasia and carcinomas in urinary bladders of transgenic mice with keratin 5 promoter-driven cyclooxygenase-2 overexpression. *Cancer Research*. **2005**. 65:1808-1813.
- ☞ **Koga H**, Sakisaka S, Ohishi M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology*. **1999**. 29 688-696.
- ☞ **Konety BR**, Nguyen TS, Brenes G, Sholder A, Lewis N, Bastacky S, et al. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol*. **2000**. 164:634–639.
- ☞ **Konety BR**, Nguyen TS, Dhir R, et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res*. **2000**. 6:2618–2625.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Koss LG**. Tumors of the urinary bladder. In: Atlas of tumor pathology, 2nd series, fascicle 11. Armed Forces Institute of Pathology, **1975**.
- ☞ **Kozak KR**, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, Jakobsson PJ, Marnett LJ. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem*. **2002**. 277: 44877–44885.
- ☞ **Kozak KR**, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry*. **2003**. 42: 9041–9049.
- ☞ **Kurumbail RG**, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature (Lond)*. **1996**. 384: 644-648.

L

- ☞ **Lamm DL**. Bladder cancer: twenty years of progress and the challenges that remains. *CA Cancer J Clin*. **1998**. 48(5): 263-268.
- ☞ **Landman J**, Chang Y, Kavalier E, Droller MJ, Liu BC. Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* **1998**. 52: 398–402.
- ☞ **Larsson SC**, Giovannucci E, Bergkvist L, Wolk A. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006. 15(12):2561-4.
- ☞ **Ledro Cano D**, Gomez Rodriguez BJ, Torres Dominguez Y. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selectivity in gastroenterology. *Rev Esp Enferm Dig*. **1999**. 91:305–309.
- ☞ **Lekili M**, Sener E, Demir MA, Temeltas G, Muezzinoglu T, Buyuksu C. Comparison of the nuclear matrix protein 22 with voided urine cytology in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Res*. **2003**. 32:124–8.
- ☞ **Levy G**, Tsuchiya T. Salicylate accumulation kinetics in man. *New England Journal of Medicine* 1972. 287(9):430–432.
- ☞ **Lewis HD**, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *The New England journal of medicine* **1983**. 309(7): 396–403.
- ☞ **Liu XH**, Rose DP. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **1996**. 56:5125-5127.
- ☞ **Luciani MG**, Campregher C, Gasche C. Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis* 2007. 28(10): 2207-17.
- ☞ **Luong C**, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, and Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol.* **1996**. 3: 927-933.

M

- ☞ **Masferrer JL**, Grubbs C, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, , Steele VE, Kelloff GJ, Hill DL, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research.* **2000**. 60:1306-1311.
- ☞ **Masick JM**, Levin RM, Hass MA. The effect of partial outlet obstruction on prostaglandin generation in the rabbit urinary bladder. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2001**. 66:211–9.
- ☞ **Menezes RJ**, Swede H, Niles R, Moysich KB. Regular use of aspirin and prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2006. 17(3):251-6.
- ☞ **Meran JG**, Kudlacek S, Beke D. Onkologische Therapie des Harnblasenkarzinoms. *Wien Med Wochenschr.* **2007**. 157:157–161.
- ☞ **Mohammed SI**, Dhawan D, Abraham S, Snyder PW, Waters DJ, Craig BA, Lu M, Wu L, Zheng R, Stewart J, Knapp DW. Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* **2006**. 5:329-335.
- ☞ **Mukherjee D**. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochemical Pharmacology.* **2002**. 63:817-821.

N

- ☞ **Neal DE**, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*. **1990**. 65:1619-1625.
- ☞ **Nisman B**, Barak V, Shapiro A, Golijanin D, Peretz T, Pode D. Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer*. **2002**. 94:2914–2922.
- ☞ **Nuttal SL**, Kendall MJ, Martin U. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *Q J Med*. **1999**. 92:239-244.

O

- ☞ **Ozturk H**, Ozdemir E, Otcu S, Buyukbayram H, Ihsan DA. Renal effects on a solitary kidney of specific inhibition of cyclooxygenase-2 after 24 hr of complete ureteric obstruction. *Urol Res*. **2002**. 30:223-226.

P

- ☞ **Percival M**. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. **1998**. 31:1-4.
- ☞ **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(1): 72-81.
- ☞ **Pokutta S**, Weis WI. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell*. **2000**. 5:533–43.
- ☞ **Potter E**, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin–catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev*. **1999**. 20:207–39.
- ☞ **Pruthi RS**, Derksen E, Gaston K, Wallen EM. Rationale for use of cyclooxygenase inhibitors in prevention and treatment of bladder cancer. *Urology*. **2004**. 64:637-642.
- ☞ **Pyrko P**, Kardosh A, Schonthal AH. Celecoxib transiently inhibits cellular protein synthesis. *Biochemical Pharmacology*. **2007**.

R

- ☞ **Rahman I**, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *European Respiratory Journal*. **2000**. 16:534-554.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Rajakaiar R**, Yaqoob MM, Gilroy DW. COX-2 in inflammation and resolution. *Molecular interventions*. **2006**. 6:199-205.
- ☞ **Ramer R**, Weinzierl U, Schwind B, Brune K, and Hinz B Ceramide is involved in r(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol*. **2003**. 64:1189–1198.
- ☞ **Rao KV**, Detrisac CJ, Steele VE, Hawk ET, Kelloff GJ, McCormick DL. Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder. *Carcinogenesis*. **1996**. 17(7): 1435-8.
- ☞ **Reddy BS**, Hirose Y, Lubet R, Stelle V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, Celecoxibe, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Research*. **2000**. 60:293-297.
- ☞ **Rieke CJ**, Mulichak AM, Garavito RM, and Smith WL. The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem*. **1999**. 274:17109-17114.
- ☞ **Sanchez-Carbayo M**, Herrero E, Megias J, Mira A, Soria F. Comparative sensitivity of urinary CYFRA 21-1, urinary bladder cancer antigen, tissue polypeptide antigen, tissue polypeptide antigen and NMP22 to detect bladder cancer. *J Urol*. **1999**. 162:1951–1956.

S

- ☞ **Sanchez-Carbayo M**, Herrero E, Megias J, Mira A, Soria F. Initial evaluation of the new urinary bladder cancer rapid test in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. **1999**. 54:656–561.
- ☞ **Sanchez-Carbayo M**, Urrutia M, Silva JM, et al. Urinary tissue polypeptide-specific antigen for the diagnosis of bladder cancer. *Urology*. **2000**. 55:526-532.
- ☞ **Sardi I**, Bartoletti R, Occhini I, Piazzini M, Travaglini F, Guazzelli R, Montali E. Microsatellite alterations in superficial and locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* **1999**. 6:901-905.
- ☞ **Sarkis AS**, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, Herr HW, Reuter VE. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*. **1994**. 152:1384-1390.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Sarkis AS**, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst.* **1993**.85:53-59.
- ☞ **Schernhammer ES**, Kang JH, Chan AT, Michaud DS, Skinner HG, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS. A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 2004. 96(1):22-8.
- ☞ **Schmetter BS**, Habicht KK, Lamm DL, et al. A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol.* **1997**. 158:801–805.
- ☞ **Schneider C**, Boeglin WE, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Marnett LJ, Samel N, and Brash AR. Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenase-1 and -2. A critical role for serine 530 and valine 349. *J Biol Chem.* **2002**. 277:478-485.
- ☞ **Sellers WE**, Kaelin WG, Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* **1997**. 15:3301-3312.
- ☞ **Shabana A**, Onsrud M. Tissue polypeptide-specific antigen and CA 125 as serum tumor markers in ovarian carcinoma. *Tumour Biol.* **1994**.15:361-367.
- ☞ **Shiina H**, Ygawa M, Urakami S, Ghigeno K, Yoneda T, Terashima M, Deguchi M, Ribeiro-Filho L, Dahiya R. Alterations of β - α -Catenin in N-butyl-N-(-4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced murine bladder câncer. *Câncer Research.* **2001**. 6:7101-7109-
- ☞ **Simmons DL**. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb Res.* **2003**. 110: 265–268.
- ☞ **Simmons DL**, Botting RM, Tothy H. Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews.* **2004**. 56: 387-437.
- ☞ **Simon R**, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ, Bocker W. Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. *Int J Oncol.* **2000**.17:1025-1029.
- ☞ **Smalley WE**, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *AdvPharmacol.* **1997**. 39: 1-20.
- ☞ **Stark LA**, Din FV, Zwacka RM, Dunlop MG. Aspirin-induced activation of the NF-kappaB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *FASEB J* 2001. 15(7):1273-5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ **Stein JP**, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, et al. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1998.** 90:1072-1079.
- ☞ **Stratta P**, Canavese C, Dogliani M, Mazzucco G, Monga G, Vercellone. A The role of free radicals in the progression of renal disease. *Am J Kidney Dis.* **1991.** 17:33-37.
- ☞ **Suleyman H**, Demircan B, Karagoz Y. Anti.inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports.* **2007.** 59:247-258.

T

- ☞ **Takahashi R**, Hashimoto T, Xu HJ, Hu SX, Matsui T, Miki T, Bigo-Marshall, et al. The retinoblastoma gene functions as a growth and tumor suppressor in human bladder carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1991.** 88:5257-5261.
- ☞ **Tesei A**, Zoli W, Fabbri F, Leonetti C, Rosetti M, Bolla M, Amadori D, Silvestrini R. NCX 4040, an NO-donating acetylsalicylic acid derivative: efficacy and mechanisms of action in cancer cells. *Nitric Oxide* 2008. 19(2):225-36.
- ☞ **Thun MJ**, Namboodiri MM, Heath CW. "Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer". *N Engl J Med* 1991. 325(23): 1593–6.
- ☞ **Thureson ED**, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, Mulichak AM, Malkowski MG, Garavito RM, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the function of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem.* **2001.** 276:10347-10358.
- ☞ **Tohgi H**, Konno S, Tamura K, Kimura B, Kawano K. Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A2 and prostacyclin. *Stroke* 1992. 23(10):1400-3.
- ☞ **Tsuji M**, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997.** 94:3336-3340.
- ☞ **Tsuji M**, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* **1998.** 93:705-716.
- ☞ **Tucker ON**, Dannenberg AJ, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* **1999.** 59:987-990.

U

- ☞ **Utting M**, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor ADN in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* **2002.** 8:35–40.

V

- ☞ **Van Dyke AL**, Cote ML, Prysak G, Claeys GB, Wenzlaff AS, Schwartz AG. Regular adult aspirin use decreases the risk of non-small cell lung cancer among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008. 17(1):148-57.
- ☞ **Vane JR**. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* **1971.** 231:232-235.
- ☞ **Voorzanger-Rousselot N**, Garnero P. Biochemical markers in oncology. PartI: Molecular basis. Part II: Clinical uses. *Cncr Treatment Reviews.* **2007.** 33:230-283.

W

- ☞ **Wadhwa P**, Goswami AK, Joshi K, Sharma SK. Cyclooxygenase-2 expression increases with the stage and grade in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *International Urology and nephrology.* **2005.** 37:47-53.
- ☞ **Warner TD**, Mitchell JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci USA* 2002. 99(21):13371-3.
- ☞ **William F. Hood**, James K. Gierse, Peter C. Isakson, James R. Kiefer, Ravi G. Kurubail, Karen Seibert, Joseph B. Monahan. Characterization of Celecoxibe and Valdecoxib Binding to Cyclooxygenase. *Mol Pharmacol.* **2003.** 63: 870–877.
- ☞ **Williams C**, Shattuck-Brandt RI, DuBois RN. The role of COX-2 I intestinal cancer. *Ann NY Acad Sci.* **1999.** 889:72-83.
- ☞ **Wolfe MM**, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl F Med.* **1999.** 340:1888-1899.
- ☞ **Wolff H**, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998. 58(22):4997-5001.
- ☞ **Wu AH**, Sell S. Markers for hepatocellular carcinoma. *Immunol Ser.* **1990.** 53:403-422.

X

- ☞ **Xang X**, Colby JK, Yang P, Fisher SM, Newman RA, Klein RD. The resistance to the tumor suppressive effects of COX inhibitors and COX-2 gene disruption in TRAMP mice is associated with the loss of COX expression in prostate tissue. **2007**

Y

- ☞ **Yaçin O**, Karatas F, Erulas FA, Ozdemir E. The levels of glutathione peroxidase, vitamin A, E, C and lipid peroxidation in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU International*. **2004**. 93:863-866.
- ☞ **Yeh CC**, Chung JG, Wu HC, Chang HL, Yeh FT, Hung CF. Effects of aspirin on arylamine N -acetyltransferase activity and DNA adducts in human bladder tumour cells. *J Appl Toxicol*. 1999 Nov-Dec;19(6):389-94.
- ☞ **Young I**, Cha, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med*. **2007**.58:239-252.
- ☞ **Yousef GM**, Scorilas A, Jung K, Ashworth LK, Diamandis EP. Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15). Up-regulation in prostate cancer. *J Biol Chem*. **2001**.276:53-61.

Z

- ☞ **Zimmermann KC**, Sarbia M, Weber AA, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res*. 1999. 59:198-204. Stark LA, Din FVN, Zwacka RM, Dunlop MG. Aspirin-induced activation of the NF- κ B signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *The FASEB Journal* **2001**. 15(7): 1273-5.



H – ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

β -caro – β -carotenos

β FGF – “Fibroblast growth factor Beta”, factor crescimento de fibroblastos beta

$\cdot\text{O}_2^-$ – Anião superóxido

$\cdot\text{O}_2$ – Radical superóxido

15RHETE – 15-R-hidroieicosotetraenoico

AA – ácido araquidónico

aa – aminoácido(s)

AAS – ácido acetilsalicílico

Ác. Lip – Ácido lipóico

ADN – “desoxirribonucleic acid”, ácido desoxirribonucleico

AJCC – “American Joint Committee of Cancer”

ARF – “Alternate Reading Frame”

AUC – “Area Under the Curve”, área abaixo da curva

BBN – N-Butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina

BTA – “Bladder Tumor Antigen”, antigénio tumoral da bexiga

CAT – Catalase

CD80 / CD86 – co-estimuladores para activação dos linfócitos T

CDK – ciclina dependente de quinase

CDKI – inibidor da ciclina dependente de cinase

CK – “Cytokeratins”, citoqueratinas

cMYC – marcador de prognóstico tumoral

CoQ10 – Co-enzima Q 10

COX – Ciclooxygenase

ABREVIATURAS

COX-1 – Ciclooxygenase-1

COX-2 – Ciclooxygenase-2

COX-3 – Ciclooxygenase-3

Coxibes – refere-se a todos os elementos do grupo coxib.

COXs - ciclooxygenases

e⁻ - Electrão

EGFR – “epidermal growth factor receptor”, receptor do factor de crescimento epidermal

EP receptor – receptor da PGE₂

ESR – “endoplasmic reticulum stress response”, resposta ao stresse no retículo endoplasmático

ET-1 – endotelina-1

FDP – “Fibrin/fibrinogen degradation product”, produto da degradação fibrina/fibrinogénio

Flav – Flavonóides

Glut – Glutathione

GPx – Glutathione peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HER-2 – “human epidermal growth factor receptor 2”, receptor 2 do factor crescimento epidermal humano

HGF – “hepatocyte growth factor”, factor crescimento de hepatócitos

HO⁻ - Anião hidroxilo

HO[•] – Radical hidróxilo

HOH – Água

ABREVIATURAS

HOX – hidroperoxidase

HSP – “heat shock protein”, Proteína de choque ao calor

ICAM-1 / VCAM-1 –

IFN –interferão

IFs – filamentos intermediários

IHC – imunohistoquímica

IL-2 – interleucina-2

INE – Instituto Nacional de Estatística

INK4a – “cyclin-dependent kinase inhibitor”, inibidor cinase dependente de ciclina

kD – kilo-Dalton

LOH – “loss of heterozygosity”, perda de heterozigocidade

MMP – “matrix metalloproteinase”, metaloproteinase de matriz

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótida Fosfato (forma reduzida)

NMP-22 – “Nuclear matrix protein-22”, proteína 22 da matriz nuclear

NO[•] – Radical óxido de azoto

NO₂[•] – Radical dióxido de azoto

NO_x – óxidos nítricos

NSAID's – “Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs”, drogas anti-inflamatórias não esteróides

O₂ – Oxigénio

ONOO⁻ – Peroxinitrito

PAP – “prostatic acid phosphatase”, fosfatase ácida prostática

PBOO – “partial bladder outlet obstruction”, bloqueio parcial na saída da bexiga

ABREVIATURAS

Per. Lipídica – Peróxidação lipídica

PG – prostaglandina

PGE₂ – prostaglandina E₂

PGG₂ – prostaglandina G₂

PGHS – prostaglandina G/H sintase

PGs – prostaglandinas

PPAR δ – “peroxisome proliferator-activated receptor”, receptor activado de proliferação peroxissomal

PTEN – “Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten”

Raios UV – Raios ultravioleta

Rb – retinoblastoma

RE – retículo endoplasmático

RO[•] – Conjugação de elementos com o oxigénio

ROS – “Reactive oxygen species”, espécies reactivas de oxigénio

SIADH – “Síndrome inapropiada ADH”, síndrome inapropiada da hormona anti-diurética

SOD – “superoxide dismutase”, superóxido dismutase

Src – “nonreceptor tyrosine kinase”, receptor não tirosina cinase

TCC – “transitional cell carcinoma”, carcinoma de células transicionais

TNM – sistema classificação de cancro (tumor, nódulo, metástases)

TPA – “Tissue polypeptide antigen”, Antígeno de polipéptido de tecido

TPS – “Tissue polypeptide specific antigen”, Antígeno de polipéptido específico de tecido

TSP – “Thrombospondin”, trombospondina

ABREVIATURAS

TxB₂ – tromboxano B₂

UBC – “Urinary bladder câncer antigen”, Antígeno do cancro urinário da bexiga

UICC – União Internacional Contra o Cancro

UPA – “Urokinase-type plasminogen activator”, Activador plasminogénico tipo uroquinase

uQui – ubiQuinona

UV – raios ultravioleta

VEGF – “vascular endothelial growth factor”, Factor crescimento endotelial vascular

Vit C, E – Vitamina C e E



I – PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

.....
Publicações e comunicações científicas resultantes de trabalhos nos quais colaborou durante o período de realização do estágio científico de licenciatura.

Trabalhos apresentados em Congressos científicos:

2009

Inhibition of bladder tumor growth by immunosuppression agents: experimental study

Parada B, Reis F, Nunes P, Teixeira-Lemos E, Garrido P, **Sereno J**, Pinto R, Cunha MF, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F.

14th Congress of the European Society for Organ Transplantation, a realizar de 30 de Agosto a 2 de Setembro, Paris, França.

Pathophysiological mechanisms underlying the cardiovascular side-effects of sirolimus versus cyclosporine.

Parada B, Reis F, Nunes P, Teixeira-Lemos E, Garrido P, **Sereno J**, Pinto R, Cunha MF, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F.

14th Congress of the European Society for Organ Transplantation a realizar de 30 de Agosto a 2 de Setembro, Paris, França.

Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model

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

9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 a15 Julho, Edimburgo, Escócia.

Recombinant human erythropoietin therapy has beneficial cardio-renal effects on moderate stages of chronic renal failure in the rat

P Garrido, F Reis, E Teixeira-Lemos, E Costa, B Parada, N Piloto, **J Sereno**, A Figueiredo, R Alves, P Rocha-Pereira, L Belo, A Santos-Silva, F Teixeira

9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 a 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents in an experimental study

B Parada B, F Reis, E Teixeira-Lemos, **J Sereno**, P Garrido, N Piloto, MF Cunha, P Rocha-Pereira, R Pinto, A Mota, A Figueiredo, F Teixeira

9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 a 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, **J Sereno**, L Ferreira, AF Pinto, F Teixeira

9th Congresso da EACPT (European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics), 12 a 15 Julho, Edimburgo, Escócia.

Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor agent induced by a nitrosamine: experimental study.

Sereno J, Parada B, Reis F, Teixeira-Lemos E, Garrido P, Ferreira L, Cunha MF, Rocha-Pereira P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F.

IV Annual CICS Symposium. 7 de Julho, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

Effects of recombinant human erythropoietin therapy on moderate stages of cardio-renal anaemia syndrome using an experimental model

P Garrido, F Reis, E Costa, B Parada, E Teixeira-Lemos, N Piloto, **J Sereno**, R Alves, CA Tavares, CA Ferrer-Antunes, A Figueiredo, L Carvalho, P Rocha-Pereira, L Belo, A Santos-Silva, F Teixeira

International BioIron Society Meeting, 7 a 11 de Junho, Porto.

Recombinant human erythropoietin doping in an experimental model of chronic aerobic exercise training

N Piloto, F Reis, HM Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, E Costa, **J Sereno**, R Alves, R Pinto, M Lourenço M, CA Tavares, CA Ferrer-Antunes, P Rocha-Pereira, L Carvalho, L Belo, A Santos-Silva, F Teixeira

International BioIron Society Meeting, 7 a 11 de Junho, Porto

Adiponectin circulating levels as an emerging biomarker of cardiovascular risk in the portuguese population - a preliminary study

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, A Dias, N Piloto, P Garrido, **J Sereno**, F Teixeira.

18th IFCC – EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
National Congress of the Austrian Society of Laboratory Medicine and Clinical Chemistry, 7-11 de Junho, Innsbruck, Austria.

Erythropoietin doping as cause of sudden death in athletes – an experimental study

Piloto N, Teixeira HM, Reis F, Teixeira de Lemos E, Parada B, Garrido P, **Sereno J**, Costa E, Pinto R, Santos-Silva A, Couceiro P, Neto P, Carvalho L, Xavier F, Teixeira F
XXI Congresso da IALM (International Academy of Legal Medicine), 28 a 30 Maio, Lisboa

Toxicological effects of recombinant human erythropoietin doping – chronic versus acute aerobic exercise

N Piloto, HM Teixeira, F Reis, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, **J Sereno**, E Costa, R Alves, M Lourenço M, CA Tavares, CA Ferrer-Antunes, A Santos-Silva, F Teixeira

XXI Congresso da IALM (International Academy of Legal Medicine), 28 a 30 Maio, Lisboa

2008

Effects of rh erythropoietin treatment in an experimental model of moderate renal failure – haematological, biochemical, oxidative and inflammatory profiles.

Garrido P, Reis F, Costa E, Teixeira-Lemos E, Parada B, Piloto N, **Sereno J**, Couceiro P, Pinto R, Rocha-Pereira P, Alves R, Carvalho L, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F
XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXVI Reunião de Farmacologia Clínica e VIII Reunião de Toxicologia, 3 a 5 Dezembro, Lisboa.

Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents: Experimental study.

Parada B, Reis F, **Sereno J**, Teixeira-Lemos E, Garrido P, Piloto N, Cunha MF, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F

XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXVI Reunião de Farmacologia Clínica e VIII Reunião de Toxicologia, 3 a 5 Dezembro, Lisboa.

Cardiovascular effects of rh erythropoietin treatment in an experimental model of sports doping.

Piloto N, Reis F, Teixeira HM, Teixeira de Lemos E, Parada B, Garrido P, Costa E, **Sereno J**, Couceiro P, Pinto R, Rocha-Pereira P, Carvalho L, Santos-Silva A, F Teixeira
XXXIX Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXVI Reunião de Farmacologia Clínica e VIII Reunião de Toxicologia. 3 a 5 Dezembro, Lisboa.

Complicações cardiovasculares do doping continuado com eritropoietina recombinante humana.

N Piloto, F Reis, H.M.Teixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, E Costa, **J Sereno**, R Alves, P Couceiro, C Tavares, CA Ferrer-Antunes, P Rocha-Pereira, L Carvalho, A Santos-Silva, F Teixeira

7º Congresso Nacional de Medicina Legal. 7 a 8 Novembro, Tomar.

Doping com rhEPO e risco cardiometabólico- treino crónico versus sessão extenuante.

N Piloto, F Reis, HMTeixeira, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, E Costa, **J Sereno**, R Alves, P Couceiro, C Tavares, CA Ferrer-Antunes, P Rocha-Pereira, L Carvalho, A Santos-Silva, F Teixeira.

7º Congresso Nacional de Medicina Legal. 7 a 8 Novembro, Tomar.

Effect of recombinant human erythropoietin therapy on the cardio-renal anaemia syndrome in an animal model of moderate renal failure

Reis F, Garrido P, Costa E, Teixeira-Lemos E, Parada B, Piloto N, Dias A, **Sereno J**, Silva R, Couceiro P, Craveiro T, Pinto R, Figueiredo A, Rocha-Pereira P, Alves R, Carvalho L, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F

16º Congresso Português de Aterosclerose e 10º Congresso da SILAT, 23 a 25 Outubro, Vilamoura

Effects of recombinant human erythropoietin therapy on haematological, biochemical, oxidative and inflammatory profiles in an experimental model of renal failure.

Garrido P, Reis F, Costa E, Parada B, Lemos E, Piloto N, Dias A, **Sereno J**, Alves R, Tavares CA, Ferrer-Antunes CA, Silva R, Couceiro P, Craveiro T, Figueiredo A, Carvalho L, Rocha-Pereira P, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F

XVI Congresso Nacional de Bioquímica. 22 a 25 Outubro 2008, Pta. Delgada, Açores

Cardiovascular effects of recombinant human erythropoietin treatment on a rat experimental animal model of sports doping

Piloto N, Reis F, Teixeira HM, Teixeira de Lemos E, Parada B, Garrido P, Costa E, **Sereno J**, Dias A, Alves R, Pinto R, Couceiro P, Lourenço M, Tavares CA, Ferrer-Antunes CA, Rocha-Pereira P, Carvalho L, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F

XVI Congresso Nacional de Bioquímica. 22 a 25 Outubro 2008, Pta. Delgada, Açores

Contribution of adiponectin to low-grade inflammatory state as expressed by circulating C-reactive protein in a Portuguese population: a preliminary study.

E Teixeira-Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, A Dias, N Piloto, P Garrido, **J Sereno**, P Rocha-Pereira, F Teixeira

XVI Congresso Nacional de Bioquímica. 22 a 25 Outubro 2008, Pta. Delgada, Açores.

Impairment of antioxidant paraoxonase activity and HDL-c protection in dyslipidaemic/obese patients.

Reis F, Teixeira de Lemos E, Espinhaço L, Parada B, Pinto R, Garrido P, Dias A, Piloto N, **Sereno J**, Baptista S, Rocha-Pereira P, Teixeira F

XVI Congresso Nacional de Bioquímica. 22 a 25 Outubro 2008, Pta. Delgada, Açores

Pathophysiological mechanisms underlying the cardiovascular side-effects of sirolimus versus cyclosporine.

Reis F, Parada B, Teixeira-Lemos E, Dias A, Garrido P, Piloto N, **Sereno J**, Baptista S, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Tavares CA, Ferrer-Antunes CA, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F

XVI Congresso Nacional de Bioquímica. 22 a 25 Outubro, Pta. Delgada, Açores

Hypertension induced by immunosuppressive drugs – comparative analysis between sirolimus and cyclosporine.

Reis F, Parada B, Teixeira-Lemos E, Dias A, Garrido P, Piloto N, Baptista S, **Sereno J**, Petronila-Rocha-Pereira, Alice Santos-Silva, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F

VII Congresso Luso Brasileiro de Transplantação, 1 a 4 Outubro, Algarve

Effects of immunosuppression on a bladder carcinogenesis model in rats.

Belmiro Parada, Arnaldo Figueiredo, Frederico Teixeira, F Xavier Cunha, **José Sereno**, Nuno Piloto, Patrícia Garrido, André Dias, Teixeira Lemos E, Pedro Eufrásio, Pedro Nunes, Flávio Reis, Alfredo Mota

VII Congresso Luso Brasileiro de Transplantação. 1 a 4 Outubro, Algarve.

Publicações científicas:

Sob a forma de resumo

Recombinant human erythropoietin therapy has beneficial cardio-renal effects on moderate stages of chronic renal failure in the rat

P Garrido, F Reis, E Teixeira-Lemos, E Costa, B Parada, N Piloto, **J Sereno**, A Figueiredo, R Alves, P Rocha-Pereira, L Belo, A Santos-Silva, F Teixeira

Basic & Clin Pharmacol & Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 147

Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model

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

Basic & Clin Pharmacol & Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 147

Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, **J Sereno**, F Melo, L Ferreira, AF Pinto, F Teixeira
Basic & Clin Pharmacol & Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 146

Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents in an experimental study

B Parada B, F Reis, E Teixeira-Lemos, **J Sereno**, P Garrido, N Piloto, MF Cunha, P Rocha-Pereira, R Pinto, A Mota, A Figueiredo, F Teixeira
Basic & Clin Pharmacol & Toxicol 2009; 105(Suppl. 1): 147

Adiponectin circulating levels as an emerging biomarker of cardiovascular risk in the portuguese population - a preliminary study

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinhaço, S Baptista, R Pinto, B Parada, A Dias, N Piloto, P Garrido, **J Sereno**, F Teixeira.
Clin Chem Lab Med 2009; 47: S 388

Sob a forma de artigo completo

Hypertension induced by immunosuppressive drugs – a comparative analysis between Sirolimus and cyclosporine

Reis F, Parada B, Teixeira de Lemos E, Garrido P, Dias A, Piloto N, Baptista S, **Sereno J**, Eufrásio P, Costa E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F.
Transplant Proc 2009; 41(3):868-73.

Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis

B Parada, **J Sereno**, F Reis, E Teixeira-Lemos, P Garrido, AF Pinto, MF Cunha, R Pinto, A Mota, A Figueiredo, F Teixeira
Cancer Biol & Ther 2009; 8(17) (in press)

Sympathetic activity, inflammation and oxidative stress in a rat model of moderate renal failure

Garrido P, Reis F, Costa E, Teixeira-Lemos E, Parada B, Alves R, Piloto N, **Sereno J**, Figueiredo A, Carvalho L, Rocha-Pereira P, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F
Renal Failure 2009; 31 (in press)

Effect of recombinant human erythropoietin in a rat model of moderate chronic renal failure – focus on inflammation, oxidative stress and function/renoprotection

Garrido P, Reis F, Costa E, Almeida A, Parada B, Teixeira-Lemos E, Santos P, Alves R, **Sereno J**, Pinto R, Tavares CA, Figueiredo A, Rocha-Pereira P, Belo L, Santos-Silva A, Teixeira F
The Open Drug Discovery Journal 2009 (in press)

Recombinant human erythropoietin therapy has beneficial cardio-renal effects on moderate stages of chronic renal failure in the rat

P Garrido, F Reis, E Teixeira-Lemos, E Costa, B Parada, N Piloto, **J Sereno**, A Figueiredo, R Alves, P Rocha-Pereira, L Belo, A Santos-Silva, F Teixeira
Proc Eur Assoc Clin Pharmacol & Ther 2009 (in press)

Recombinant human erythropoietin doping in sports – cardiovascular effects in chronic and acute aerobic exercise in an animal model

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
Proc Eur Assoc Clin Pharmacol & Ther 2009 (in press)

Low adiponectin levels and paraoxonase activity as markers of oxidative stress and inflammation in atherosclerosis – study in a portuguese population

E Teixeira de Lemos, F Reis, L Espinheiro, S Baptista, R Pinto, B Parada, P Garrido, **J Sereno**, F Melo, L Ferreira, AF Pinto, F Teixeira
Proc Eur Assoc Clin Pharmacol & Ther 2009 (in press)

Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents in an experimental study

B Parada B, F Reis, E Teixeira-Lemos, **J Sereno**, P Garrido, N Piloto, MF Cunha, P Rocha-Pereira, R Pinto, A Mota, A Figueiredo, F Teixeira
Proc Eur Assoc Clin Pharmacol & Ther 2009 (in press)

Toxicological effects of recombinant human erythropoietin doping – chronic versus acute aerobic exercise

N Piloto, HM Teixeira, F Reis, E Teixeira-Lemos, B Parada, P Garrido, **J Sereno**, E Costa, R Alves, M Lourenço M, CA Tavares, CA Ferrer-Antunes, A Santos-Silva, F Teixeira
Proceedings IALM 2009 (in press)

Erythropoietin doping as cause of sudden death in athletes – an experimental study

Piloto N, Teixeira HM, Reis F, Teixeira de Lemos E, Parada B, Garrido P, **Sereno J**, Costa E, Pinto R, Santos-Silva A, Couceiro P, Neto P, Carvalho L, Xavier F, Teixeira F
Proceedings IALM 2009 (in press)

Preventive selective cyclooxygenase-2 inhibition, in opposition to curative, promotes efficient chemoprevention on bladder cancer development in an experimental model

José Sereno, Belmiro Parada, Flávio Reis, Fernanda X. Cunha, Edite Teixeira-Lemos, Rui Pinto, Patrícia Garrido, Liliana Ferreira, Paula Neto, Petronila Rocha-Pereira, Alfredo Mota, Arnaldo Figueiredo, Frederico Teixeira
European Journal of Cancer Prevention (submitted 2009)

Early recombinant human erythropoietin treatment promotes beneficial cardiovascular and kidney anti-apoptotic effects in a rat model of moderate chronic kidney disease

Garrido P, Reis F, Almeida A, Santos P, Costa E, Teixeira-Lemos E, Parada B, **Sereno J**, Figueiredo A, Belo L, Santos-Silva A, Alves R, Teixeira F
Kidney International (submitted 2009)

Inhibition of Bladder Tumour Growth by Sirolimus in an Experimental Carcinogenesis Model

Parada B, Reis F, Nunes P, Teixeira-Lemos E, Garrido P, **Sereno J**, Pinto R, Cunha MF, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F.
BJU (submitted 2009)