

Belmiro Ataíde da Costa Parada

Mecanismos Patológicos e Prevenção Farmacológica da Carcinogénese Urotelial: Estudo Experimental

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina

Orientada por Prof. Doutor Frederico José Teixeira e

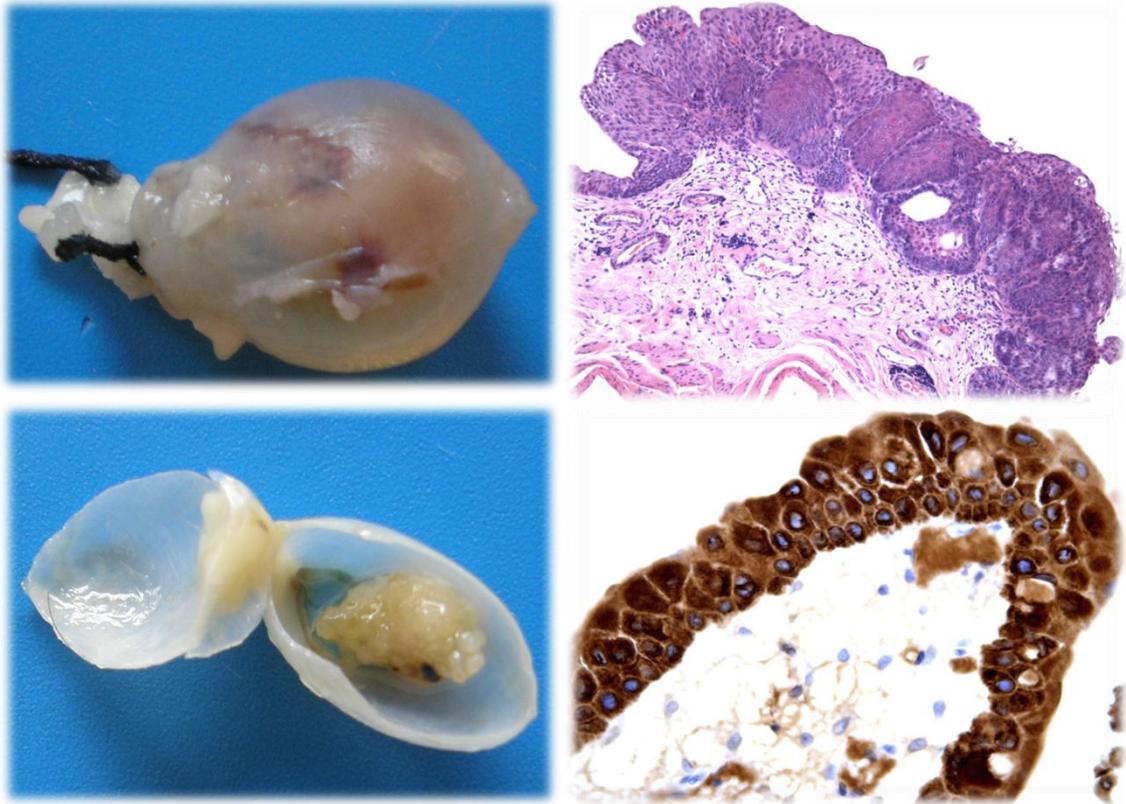
Prof. Doutor Arnaldo José de Castro Figueiredo

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Coimbra, 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Belmiro Ataíde da Costa Parada

Mecanismos Patológicos e Prevenção Farmacológica da Carcinogénese Urotelial: Estudo Experimental

Coimbra, 2014

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina.

Trabalho experimental realizado em:

1. Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2. Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

3. Serviço de Anatomia Patológica, Hospitais da Universidade de Coimbra.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer
responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, artigo 108 §
único).

Índice

Prefácio	1
Lista de Siglas e Abreviaturas	5
Publicações e Prémios no âmbito da Tese de Doutoramento	8
Resumo	13
Abstract	16
Capítulo I: Carcinoma da Bexiga – Problema de Saúde Pública	19
1. Epidemiologia	20
2. Factores de Risco	29
2.1. Factores de Risco Ambientais	29
1. Tabaco	29
2. Exposição ocupacional	31
3. Arsénio na água de consumo	32
2.2. História Médica	34
1. Infecção/Inflamação crónica	34
2. Schistosomíase	35
3. Radioterapia	35
4. Ciclofosfamida	35
5. Fármacos	36
2.3. Hábitos Dietéticos	36
1. Café	36
2. Adoçantes artificiais	36
3. Alimentação	36
2.4. Hereditariedade	37
3. Histopatologia	37
4. Fisiologia Urotelial	38
4.1. Urotélio “Normal”	38
4.2. Carcinogénese Urotelial	41
4.3. Multifocalidade Tumoral	46
5. Aspectos Clínicos	47
5.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico	47

Índice

5.2. Tratamento	49
6. Aspectos Económicos	53
7. Carcinoma Urotelial da Bexiga	55
7.1. Ponto da Situação	55
7.2. Propostas de Contributo Pessoal	57
Capítulo II: Carcinoma da Bexiga - Estudo Experimental	58
Introdução	59
Razões para as nossas opções de investigação	64
Objectivos	66
Material e Métodos	67
Animais e acondicionamento	67
Protocolo experimental	68
Colheita de sangue e órgãos	71
A. Bexiga	74
1. Histopatologia convencional	74
2. Imunohistoquímica	76
3. Expressão génica	77
B. Sangue e derivados	78
1. Hemograma	78
2. Parâmetros bioquímicos	78
3. Marcadores séricos	78
4. Marcadores de equilíbrio oxidativo	78
Análise Estatística	79
Resultados	80
I - Grupos Carcinogénio e Controlo	81
A. Bexiga	81
1. Anatomopatologia	81
1.1. Avaliação macroscópica	81
1.2. Avaliação histopatológica	83
2. Imunohistoquímica	94
3. Expressão génica	99
B. Sangue e derivados	100

Índice

1. Marcadores séricos	100
2. Marcadores de equilíbrio oxidativo	101
3. Hemograma	103
4. Parâmetros bioquímicos	103
C. Bebida Ingerida e Pesos Corporais	103
II - Fármacos Imunomoduladores (Sirolimus e Ciclosporina A)	105
A. Bexiga	106
1. Anatomopatologia	106
1.1. Avaliação macroscópica	106
1.2. Avaliação histopatológica	114
2. Imunohistoquímica	119
3. Expressão génica	124
B. Sangue e derivados	126
1. Marcadores séricos	126
2. Marcadores de equilíbrio oxidativo	128
3. Hemograma	130
4. Parâmetros bioquímicos	130
C. Bebida Ingerida e Pesos Corporais	131
III - Fármacos Inibidores da Cox (Celecoxib e AAS)	134
A. Bexiga	135
1. Anatomopatologia	135
1.1. Avaliação macroscópica	135
1.2. Avaliação histopatológica	140
2. Imunohistoquímica	145
3. Expressão génica	149
B. Sangue e derivados	151
1. Marcadores séricos	151
2. Marcadores de equilíbrio oxidativo	152
3. Hemograma	154
4. Parâmetros bioquímicos	154
C. Bebida Ingerida e Pesos Corporais	155
IV - Fármacos com Acções pleiotrópicas (Atorvastatina e Ácidos Gordos Ómega 3)	158
A. Bexiga	159

Índice

1. Anatomopatologia	159
1.1. Avaliação macroscópica	159
1.2. Avaliação histopatológica	164
2. Imunohistoquímica	167
3. Expressão génica	168
B. Sangue e derivados	170
1. Marcadores séricos	170
2. Marcadores de equilíbrio oxidativo	171
3. Hemograma	173
4. Parâmetros bioquímicos	173
C. Bebida Ingerida e Pesos Corporais	174
Discussão	176
I - Caracterização do Modelo Experimental	176
A. Escolha do modelo experimental	176
B. Grupo Controlo: histologia vesical similar à dos humanos	178
C. Grupo Carcinogénio: carcinogénese vesical	179
1. Anatomopatologia	179
2. Imunohistoquímica	181
3. Expressão génica	184
4. Sangue e derivados	185
4.1. Marcadores séricos	185
4.2. Marcadores de equilíbrio oxidativo	186
5. Perfil de segurança e bem-estar animal	186
II - Fármacos Imunomoduladores	187
A. Inibidor de <i>mTOR</i> : Sirolimus	187
B. Inibidor da Calcineurina: Ciclosporina A	193
III - Fármacos Inibidores das Ciclooxygenases	197
IV - Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"	203
A. Atorvastatina	203
B. Ácidos Ómega 3	207
Conclusões do Estudo Experimental	212
I - Modelo Experimental	212
II - Fármacos Imunomoduladores	213

Índice

A. Sirolimus	213
B. Ciclosporina A	214
III - Fármacos Inibidores das Ciclooxygenases	215
IV - Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"	216
A. Atorvastatina	216
B. Ácidos Ómega 3	217
Quadro Resumo	219
Conclusão Geral	220
Referências bibliográficas	222
Apêndices	260
1: Classificação TNM do cancro da bexiga	261
2: Classificação dos tumores uroteliais pela OMS	262
3: Processamento das amostras para estudo histológico	263
4: Protocolo de marcação imunohistoquímica	265
5: Protocolo para análise de expressão génica	267
6: Fundamento geral do método micro ELISA	269
7: Protocolo de doseamento dos marcadores de equilíbrio oxidativo	270
8: Resultados dos hemogramas e dos parâmetros bioquímicos	272
Informações Adicionais	286

.....
Médico

(latim: *medicus*)

1. Título obtido por quem possui o grau académico de licenciatura em medicina.
2. Pessoa que possui esse título e está inscrito na Ordem dos Médicos como membro efectivo; clínico.
3. *Figurado*: o que cura um mal físico ou moral.

Médico In Infopédia (Em linha). Porto: Porto Editora, 2003-2014.

Disponível a 04/02/2014 na www: <URL: <http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa-aa/m%C3%A9dico>>.

O que é um Médico? A sua definição num dicionário é demasiado redutora. Mais do que um título académico ou uma inscrição numa Ordem Profissional, é a função do Médico que melhor o caracteriza. Nesse sentido, talvez “o que cura um mal físico ou moral” se revele mais abrangente que as duas definições anteriores. Mas, nenhuma delas traduz de forma tão fiel a arte médica como os estatutos expressos no Juramento Hipocrático de 1771:

“Honrarei o professor que me ensinar esta arte...”

A partir de regras, lições e outros processos ensinarei o conhecimento global da medicina...

A vida que professar será para benefício dos doentes e para o meu próprio bem, nunca para prejuízo deles ou com malévolos propósitos...”

Transportada para os tempos actuais, a arte médica inclui três componentes fundamentais: clínica, investigação e ensino.

Embora, para muitos, a acção assistencial constitua a essência da actividade médica, ela seria, se isolada, demasiado limitada. A experiência adquirida com a prática clínica deve servir, não só para a formação inter-pares e de alunos, como também para a definição de estratégias de investigação que traduzam reais necessidades. Por sua vez, a investigação e o ensino, ao proporcionarem novas aprendizagens e a propagação do conhecimento, reforçam a qualidade da acção médica.

A possibilidade de participar de forma activa nos três componentes atrás referidos deveu-se, no meu caso, a um conjunto de circunstâncias diversas.

O facto de ter efectuado o meu Internato Complementar no Serviço de Urologia e Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de

.....
Coimbra deu-me a possibilidade de trabalhar num Serviço Universitário, referência Nacional e Internacional na área da Urologia e Transplantação, com grande tradição na formação pré e pós-graduada, para além da investigação, dirigido na altura pelo Prof. Doutor Linhares Furtado, um dos nomes maiores da Medicina Portuguesa do século XX.

"Honrarei o professor que me ensinar esta arte..."

Sempre tive o desejo, mesmo enquanto jovem médico interno em formação, de poder estar ligado ao ensino e a projectos de investigação na Faculdade de Medicina. Essa oportunidade foi-me dada pelo Prof. Doutor Frederico Teixeira quando, em Junho de 2002, me convidou para Assistente de Terapêutica Geral e Hidrologia. Conheci o Prof. Doutor Frederico Teixeira em 1995, como aluno da FMUC. Já na altura via nele um Professor exigente, competente e sério, virtudes que pude confirmar com um contacto mais próximo. Foi ele quem mais me incentivou a fazer o Doutoramento em Medicina. Durante este trajecto muito lhe agradeço as suas ideias e espírito crítico mas também todo o apoio e amizade que me dispensou, indispensáveis para o trabalho realizado.

Tive também a sorte de ter como Orientador de tese de Doutoramento, e também de Especialidade, o Prof. Doutor Arnaldo Figueiredo, um médico de excelência que sempre foi para mim uma referência e exemplo a seguir. As suas observações pertinentes e a sua capacidade de encontrar soluções, aparentemente simples, para a resolução de problemas, aparentemente complexos, foram essenciais para concluir este trabalho.

"A partir de regras, lições e outros processos ensinarei o conhecimento global da medicina..."

Do meu contacto com a Urologia Oncológica sempre achei que o cancro da bexiga colocava uma série de desafios que seria interessante investigar. Por outro lado, sempre quis que a realização de uma tese de Doutoramento englobasse a Urologia e a Terapêutica, duas áreas que me apaixonam e às quais estava ligado. Daí resultou a ideia de um estudo experimental de quimioprevenção farmacológica do cancro da bexiga, que incluísse um aprofundamento dos conhecimentos do processo de carcinogénese.

Quando iniciámos o projecto, no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, não havia qualquer experiência prévia em

.....
investigação experimental em cancro da bexiga. Tivemos que começar "do zero", mobilizando recursos humanos e meios logísticos. Tenho que destacar, neste contexto, a participação essencial do Doutor Flávio Reis. Sem a sua ajuda, persistência, ensinamentos, apoio e amizade, o projecto não teria tido sucesso.

Não vou aqui discutir os méritos ou deméritos dos resultados deste trabalho porque haverá outras oportunidades e locais para o fazer. Direi, contudo, que a sua realização, apesar das dificuldades que sempre surgem, foi muito positiva e me permitiu aprofundar o conhecimento em áreas com as quais não teria tido contacto de outra forma.

A investigação em cancro da bexiga evoluiu e a equipa cresceu. Estão em curso vários projectos de investigação básica e clínica, não incluídos nesta tese, dos quais destacamos:

- Estudo clínico de factores de prognóstico: caracterização citogenética do cancro da bexiga. Para além da equipa base e parcerias já presentes no projecto experimental, temos colaborações com o Instituto de Citogenética, Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina (Prof.^a Doutora Isabel Carreira).
- O papel das células *Natural Killer* na progressão e resposta à terapêutica do carcinoma da bexiga usando um modelo animal humanizado derivado de células estaminais cancerígenas, com a participação da Doutora Célia Gomes do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI).

Resta-me agradecer a todos aqueles que muito me ajudaram:

Aos elementos do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental que tiveram contacto directo com este projecto: a Edite Teixeira-Lemos, o José Sereno, a Patrícia Garrido, a Raquel Cerejo, o André Dias, a Filipa Pinto e a Sofia Baptista.

A todos os Colegas do Serviço de Urologia e Transplantação Renal, com destaque para o meu Director, Prof. Doutor Alfredo Mota, pelo incentivo constante e pelas oportunidades que sempre me proporcionou para a realização do projecto.

À Dr.^a Maria Fernanda Xavier da Cunha, Directora do Serviço de Anatomia Patológica, pelas horas infindáveis passadas a ver "lâminas" e por toda a orientação no estudo histopatológico; ao Dr. Vítor Leitão, responsável pelos estudos imunohistoquímicos e à Paula Neto, pela preparação técnica de todo material.

Ao Paulo Santos, responsável pelos estudos de expressão génica.

Prefácio

.....
A todos os outros não mencionados.

Finalmente,

Aos Meus: aos Meus Pais e Irmãos, essenciais na minha Vida; a toda a minha Família; aos Meus Amigos.

Coimbra, 2 de Fevereiro de 2014

Belmiro Parada

Lista de Siglas e Abreviaturas

AAS	Ácido acetilsalicílico
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
ASA	Acetylsalicylic acid
ASR	Incidência ajustada à idade por 100.000 pessoas/ano
Atorva	Atorvastatina
BBN	N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Casp	Caspase
CBC	Complete blood count
Celecox	Celecoxib
Cis	Carcinoma in situ
Cox	Ciclooxigenase
CsA	Ciclosporina A
CSC	Células estaminais cancerígenas
DHA	Ácido docosahexanóico
EGFr	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EP	Erro padrão
EPA	Ácido eicosapentanóico
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
GB	Glóbulos brancos
GRB	Growth factor receptor-bound protein
GST	Glutatioão-S transferase
GV	Glóbulos vermelhos
H&E	Hematoxilina e eosina
Hb	Hemoglobina

Lista de Siglas e Abreviaturas

HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-Coenzima A
Htc	Hematócrito
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	Interleucina
LDL	Low density lipoprotein
MDA	Malondialdeído
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAT	N-acetil transferase
3-NT	3-Nitrotirosina
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Polymerase chain reaction
PLT	Plaquetas
PNLMP	Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential
PP	Prevenção precoce
PT	Prevenção tardia
Rb	Retinoblastoma
RTU	Ressecção endoscópica transuretral
SCC	Carcinoma escamoso da bexiga
SELEBLAT	The Selenium and Bladder Cancer Trial
SELECT	Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
Sir	Sirolimus
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SREBP	Sterol-regulatory element binding protein
$t_{1/2}$	Semi-vida
TAS	Total antioxidant status
TBA	Tiobarbituric Acid
TBARS	Tiobarbituric Acid Reactive Substances
TCC	Tumores de células de transição (Tumores uroteliais)
TGF	Tumor growth factor
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica

Lista de Siglas e Abreviaturas

.....

TNF	Tumour necrosis factor
TPBPM	Tumor papilar de baixo potencial de malignidade
TV	Tumor vesical
VEGF	Vascular endothelial growth factor
\bar{x}	Média
\$	Dólar
€	Euro

.....
i) Publicações:

Alguns dos resultados apresentados nesta tese estão incluídos nas seguintes publicações:

a) Artigos Completos:

a.1) Revistas Internacionais Indexadas:

1. **Parada B**, Reis F, Cerejo R, Garrido P, Sereno J, Xavier-Cunha M, Neto P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Omega-3 Fatty Acids Inhibit Tumor Growth in a Rat Model of Bladder Cancer. *BioMed Research International* 2013; 2013: 1-11.
doi:10.1155/2013/368178.

2. **Parada B**, Reis F, Pinto A, Sereno J, Xavier-Cunha M, Neto P, Rocha Pereira P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Chemopreventive Efficacy Of Atorvastatin against Nitrosamine-Induced Rat Bladder Cancer: Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Properties. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13 (7): 8482-8499.
doi:10.3390/ijms13078482.

3. **Parada B**, Reis F, Figueiredo A, Nunes P, Teixeira-Lemos E, Garrido P, Sereno J, Pinto R, Xavier-Cunha M, Neto P, Santos P, Velada I, Mota A, Teixeira F. Inhibition of bladder tumour growth by sirolimus in an experimental carcinogenesis model. *BJU International* 2011; 107 (1): 135-143.
doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09326.x

4. Sereno J, **Parada B**, Reis F, Xavier-Cunha M, Teixeira-Lemos E, Garrido P, Pinto R, Rocha-Pereira P, Neto P, Ruivo J, Rodrigues-Santos P, Nunes S, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Preventive but Not Curative Efficacy of Celecoxib on Bladder Carcinogenesis in a Rat Model. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010: 1-11.
doi:10.1155/2010/380937.

5. **Parada B**, Sereno J, Reis F, Teixeira-Lemos E, Garrido P; Pinto F, Cunha, Xavier-Cunha, Pinto R, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective

.....
cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis. *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8 (17): 1615-1622.
doi:10.4161/cbt.8.17.9199

a.2) Revistas Nacionais, com arbitragem:

1. **Parada B**, Campos L, Reis F, Sereno J, Nunes P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Eficácia da atorvastatina na quimioprevenção da carcinogénese vesical num modelo experimental: Propriedades anti-oxidantes, anti-proliferativas e anti-inflamatórias. *Acta Urológica* 2013; 30 (1): 29-38.

2. **Parada B**, Eufrásio P, Nunes P, Reis F, Campos L, Xavier-Cunha M, Figueiredo A, Mota A, Teixeira F. Efeito Preventivo do Celecoxib na Carcinogénese Vesical num Modelo Experimental de Rato. *Acta Urológica* 2011; 28 (3): 14-22.

b) Resumos:

b.1) Revistas Internacionais Indexadas:

1. **Parada B**, Figueiredo A, Reis F, Nunes P, Campos L, Antunes P, Teixeira F. Bladder cancer: Could statins be part of the solution? Evidences from an experimental study. *European Urology Supplements* 2012; 11 (1): e667-e667a.

2. **Parada B**, Figueiredo A, Reis F, Nunes P, Eufrásio P, Campos L, Xavier-Cunha M, Mota A, Teixeira F. Use of selective and non-selective cox-2 inhibitors in rat model of bladder cancer: changes in histological, immunohistochemical, inflammatory and gene expression profiles. *European Urology Supplements* 2011; 10 (2): 80-80.

3. **Parada B**, Figueiredo A, Nunes P, Reis, F, Mota A, Teixeira F. Antitumoral properties of a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents on rat urinary bladder carcinogenesis. *The Journal of Urology* 2010; 183 (4): e447-e448.

4. **Parada B**, Reis F; Teixeira-Lemos E, Sereno J, Garrido P, Piloto N, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Inhibition of bladder tumor growth

.....
by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents in an experimental study. Proceedings EACPT 2009; 2009: s173-s176.

5. **Parada B**, Reis F, Figueiredo A, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Nunes P, Mota A, Teixeira. Inhibition of bladder tumor growth by immunosuppression agents: experimental study. TRANSPLANT INTERNATIONAL 2009; 22 (suppl 2): 129-130.

6. **B Parada**, F Reis, E Teixeira-Lemos, J Sereno, P Garrido, N Piloto, MF Cunha, P Rocha-Pereira, R Pinto, A Mota, A Figueiredo, F Teixeira. Inhibition of bladder tumor growth by a cyclooxygenase-2 inhibitor and immunosuppression agents in an experimental study . BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY 2009; 105 (suppl 1): 147-147.

7. **Parada B**, Figueiredo A, Reis F, Mota A, Teixeira F. Antitumoral Properties of a Cyclooxygenase-2 Inhibitor and Immunosuppression Agents on Rat Urinary Bladder Carcinogenesis. Urology 2009; 74 (suppl 4A): S103-S104.

8. **Parada B**, Reis F, Figueiredo A, Nunes P, Teixeira F, Mota A. Efeitos do sirolimus num modelo de carcinogénese vesical em ratos. Actas Urológicas Espanolas 2008; 32 (6): 13-13.

9. **Parada B**, Figueiredo A, Reis F, Dias A, Nunes P, Teixeira-Lemos E, Dinis H, Eufrásio P, Batista S, Teixeira F, Mota A. Effects of sirolimus on rat urinary bladder carcinogenesis. European Urology Supplements 2008; 7 (3): 211-211.

b.2) Revistas Nacionais, com arbitragem:

1. Antunes H, **Parada B**, Campos L, Reis F, Nunes P, Mota A, Teixeira F, Figueiredo A. Eficácia da atorvastatina na quimioprevenção da carcinogénese vesical num modelo experimental: Propriedades anti-oxidantes, anti-proliferativas e anti-inflamatórias. Acta Urológica 2013; 30 (Suplemento 1): 101.

2. Antunes H, **Parada B**, Campos L, Reis F, Nunes P, Mota A, Teixeira F, Figueiredo A. Ácidos gordos OMEGA-3 inibem o crescimento tumoral em modelo experimental de carcinoma da bexiga. Acta Urológica 2013; 30 (Suplemento 1): 101.

-
3. Campos L, **Parada B**, Reis F, Nunes P, Eufrásio P, Figueiredo A, Teixeira F, Mota A. Uso de inibidores selectivos e não selectivos da Cox-2 em modelo experimental de carcinogénese vesical: alterações histológicas, imunohistoquímicas, inflamatórias e de expressão génica. Acta Urológica 2011; 28 (Suplemento 1): 38.
 4. **Parada B**, Reis F, Sereno J, Nunes P, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Carcinoma da bexiga: prevenção farmacológica num modelo de experimentação animal. Bioanálise 2010; 3(1): 35.
 5. Cerejo R, Reis F, **Parada B**, Teixeira-Lemos E, Sereno J, Garrido P, Cunha MF, Neto P, Pinto R, Mota A, Figueiredo A, Teixeira F. Omega-3 fatty acids therapy for prevention of nitrosamine-induced bladder cancer in a rat model. Revista Portuguesa de Farmácia 2010; LIII(4): 83.

ii) Prémios:

Da apresentação de trabalhos científicos no âmbito desta teste de Doutoramento resultaram os seguintes prémios:

1. **2013: Prémio Melhor Trabalho de Investigação do Congresso da APU 2013:** Eficácia da atorvastatina na quimioprevenção da carcinogénese vesical num modelo experimental: Propriedades anti-oxidantes, anti-proliferativas e anti-inflamatórias.
Associação Portuguesa de Urologia.
2. **2012: Travel Award for oral presentation at the 20th Meeting of the EAU Section of Urological Research, Strasbourg, France:** Atorvastatin, Omega-3 fatty acids and Salicylic Acid in the prevention of bladder cancer in a carcinogenesis experimental model.
European Association of Urology - Section of Urological Research.
3. **2009: 1º Prémio do 17º Congresso Português de Aterosclerose:** Pleiotropic effect of atorvastatin in bladder cancer prevention - implications to a recommendation for an earlier use to promote dual prevention in dyslipidaemic patients.
Sociedade Portuguesa de Aterosclerose.

.....
4. **2009: 1º Prémio Pfizer para melhor trabalho de investigação na área da Urologia Oncológica:** Efeitos de imunossuppressores num modelo de carcinogénese vesical em ratos.

Grupo Português Génito-Urinário da European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC).

5. **2008: Menção Honrosa Bolsa de Investigação APU 2008:** Tumores da bexiga - estudo clínico de factores de prognóstico e prevenção e tratamento farmacológico experimental.

Associação Portuguesa de Urologia.

6. **2004: Bolsa de Investigação APU 2004:** Modelo experimental de carcinoma da bexiga e da avaliação da eficácia farmacológica preventiva e curativa.

Associação Portuguesa de Urologia.

Resumo

Introdução: O carcinoma da bexiga é um dos tumores mais prevalentes no Mundo Ocidental. A natureza recidivante das suas formas não músculo-invasivas, que constituem 75 a 80% de todos os tumores, associada à frequente progressão a formas invasivas e agressivas, tornam-no num dos cancros com mais elevados custos pessoais, sociais e financeiros. Várias características fazem dele um tumor adequado para a adopção de estratégias de quimioprevenção mas, apesar dos resultados promissores de várias substâncias, nenhum estudo cientificamente sólido permite, de momento, recomendar o seu uso.

Objectivos: Os objectivos principais desta dissertação foram: 1. Aprofundar o conhecimento fisiopatológico da carcinogénese vesical; 2. Avaliar a capacidade de quimioprevenção de alguns fármacos de uso corrente em diversas patologias relativamente frequentes através da utilização de um modelo experimental; 3. Caracterizar os putativos mecanismos de acção anticancerígena desses fármacos.

Materiais e Métodos: Foram utilizados ratos Wistar machos num modelo experimental de carcinogénese vesical, dividido em duas fases: 1. Administração do carcinogénio BBN 0,05% na água da bebida, entre as semanas um e oito, para indução tumoral; 2. Sem administração de BBN, entre as semanas nove e vinte, para manifestação das lesões tumorais. Os fármacos e doses (mg/kg/dia) em estudo foram os seguintes: Imunomoduladores (Sirolimus 1 e 2; Ciclosporina 5); Inibidores da COX-2 (Celecoxib 1 e 10; AAS 25 e 250); Fármacos com "Acções Pleiotrópicas" (Atorvastatina 3 e 30; Ácidos gordos Ómega-3 600). Formaram-se vários grupos:

Controlo (C): sem administração de BBN ou fármacos; Carcinogénio (BBN): BBN entre as semanas um e oito, sem fármacos; Controlo do Fármaco: administração do fármaco na fase 1 ou fase 2, sem BBN; Prevenção Precoce: BBN e fármaco entre as semanas um e oito; Prevenção Tardia: BBN entre as semanas um e oito; fármaco entre as semanas nove e vinte.

No final da 20.^a semana os animais foram sacrificados. Foi colhida a bexiga para estudo histopatológico, imunohistoquímico e de expressão génica. Foi colhido sangue para hemograma, alguns parâmetros bioquímicos, marcadores séricos e de equilíbrio oxidativo. Foram avaliados o bem-estar e a segurança animal.

Resultados: No grupo Carcinogénio a incidência de neoplasias uroteliais foi de 68%, lesões maioritariamente papilares e exofíticas,

.....
de dimensões variáveis. A histopatologia mostrou hiperplasia urotelial em 100% das bexigas, displasia de alto grau em 96% e *Cis* em 52%. Dos carcinomas, quatro eram TPBPM, 11 de baixo grau e 10 de alto grau histológico. A marcação imunohistoquímica de *p53*, *Ki67* e *CD31* nas lesões pré-malignas ou malignas foi mais acentuada e extensa. A expressão gênica de *p53*, *Bcl-2*, *Hras*, *Cox-2* e *VEGF* foi superior à do grupo Controlo, ao contrário do gene *Rb1*. Também se verificou uma elevação de *TGF-β*, *TNF-α* e de marcadores inflamatórios.

A utilização de Sirolimus na primeira fase do estudo, na dose de 1 e de 2 mg/kg/dia, levou a um aumento da incidência tumoral para 75% e 80%, respectivamente. Ao invés, a administração de Sirolimus 2 mg/kg/dia a partir da 9.^a semana levou a um decréscimo para 37,5%, associada a redução do número e volume tumoral, das lesões pré-neoplásicas, diminuição de *TGF-β* e um perfil oxidativo mais favorável. Relativamente à Ciclosporina A, a incidência tumoral de 62,5% na sua utilização precoce e de 50% na mais tardia não diferiu de forma significativa da do grupo carcinogénico, apesar da redução do número e volume tumoral e de algumas lesões hiperplásicas, displásicas e papilares.

O Celecoxib na primeira fase do estudo, nas doses de 1 e 10 mg/kg/dia, levou a uma menor incidência (12,5%), número e volume tumoral. A utilização do fármaco na segunda fase não trouxe qualquer benefício. Quanto ao AAS, usado apenas na primeira fase, a dose de mais alta teve uma redução mais significativa na incidência de neoplasias (12,5 vs 37,5%) e também no número e volume tumoral. Houve ainda uma redução das lesões uroteliais hiperplásicas, pré-neoplásicas e da agressividade dos carcinomas, de *TGF-β* e dos marcadores inflamatórios.

A Atorvastatina, usada nas primeiras oito semanas, reduziu a incidência de carcinomas para 12,5% na dose de 3 mg/kg/dia e para 25% na dose de 30 mg/kg/dia, bem como do número, do volume e da agressividade histológica. Apesar da diminuição da displasia de alto grau e do *Cis* com os Ácidos gordos Ómega 3 na primeira fase do modelo carcinogénico, tal não se traduziu numa menor incidência de carcinomas (62,5%) ou do número de tumores, mas apenas numa redução dos volumes. Houve com estes dois fármacos uma diminuição dos marcadores inflamatórios e um perfil oxidativo mais favorável.

Nos grupos em que foi conseguida a quimioprevenção tumoral, as investigações complementares mostraram uma marcação imunohistoquímica para *p53*, *Ki67*, *CD31* e *Cox-2* (nos inibidores da Cox) mais localizada e ligeira e nos estudos de expressão gênica houve uma menor expressão de proto-oncogenes e de genes anti-apoptose.

.....
Conclusões: A incidência de carcinoma urotelial no nosso modelo foi de 68%. A carcinogénese vesical, que reproduz a verificada no humano, incluiu desregulação do ciclo e da proliferação celular, da imunovigilância tumoral, inibição da apoptose, aumento da angiogénese e uma acção pró-inflamatória.

Os inibidores selectivos e não selectivos da Cox-2 e a Atorvastatina foram os fármacos que demonstraram maior eficácia. Com excepção do Sirolimus, a prevenção farmacológica do carcinoma da bexiga foi mais eficaz quando instituída precocemente.

A prevenção neoplásica deveu-se à conjugação de múltiplos mecanismos de acção farmacológica, que permitiram o reequilíbrio das vias alteradas do processo carcinogénico.

.....
Abstract

Introduction: Bladder cancer is one of the most prevalent tumours in the Western World. The recurrent nature of its non-muscle invasive forms, which are 75 to 80% of all bladder tumours, together with the frequent progression to invasive and more aggressive neoplasms, makes it one of the cancers with the highest personal, social and financial costs.

Several characteristics make it suitable for the adoption of chemoprevention strategies but, despite the promising results of several substances, no scientifically relevant study currently recommends their use.

Objectives: The main objectives of this work were: 1. To improve the knowledge of the pathophysiology of bladder carcinogenesis; 2. To evaluate the chemopreventive capacity of some agents currently used, in an experimental model; 3. To characterize the putative anticancer mechanisms of action of these drugs.

Materials and Methods: Male Wistar rats were used in an experimental model of bladder carcinogenesis divided into two phases: 1. Administration of the carcinogen BBN 0.05% in the drinking water for tumour induction, between weeks one and eight; 2. No administration of BBN, between weeks nine and twenty, for the manifestation of tumour lesions.

The drugs and doses (mg/kg/day) in study were immunomodulators (Sirolimus 1 and 2; Cyclosporin 5), COX-2 inhibitors (Celecoxib 1 and 10, ASA 25 and 250), drugs with "pleiotropic actions" (Atorvastatin 3 and 30; Omega-3 fatty acids 600), divided in several groups:

Control (C): no BBN or drug administration; Carcinogen (BBN): BBN between weeks one and eight, no drug; Drug Control: administration of drug in the first or second phase without BBN; Early Prevention: BBN and drug between weeks one and eight; Late Prevention: BBN between weeks one and eight and drug between weeks nine and twenty.

At the end of week 20 the animals were sacrificed. The bladder was harvested for histopathological, immunohistochemical and gene expression studies. Blood for CBC, some biochemical parameters and serum markers of oxidative balance was collected. Welfare and animal safety were evaluated.

Results: In the Carcinogen group the incidence of urothelial cancer was 68%, mostly papillary and exophytic lesions of variable dimensions. Histopathology showed urothelial hyperplasia in 100% of

.....
the bladders, high-grade dysplasia in 96% and Cis in 52%. Four of the neoplasms were PNLMP, 11 low grade and 10 high grade carcinomas. The immunohistochemical staining for *p53*, *Ki67* and *CD31* in premalignant and malignant lesions was more pronounced and extensive. The gene expression for *p53*, *Bcl-2*, *HRAS*, *COX-2* and *VEGF* was higher than in the control group unlike the *Rb1* gene. An increase of *TGF-β*, *TNF-α* and inflammatory markers was also seen.

The use of Sirolimus in the first phase of the study, at a dose of 1 and 2 mg/kg/day led to an increase in tumour incidence to 75% and 80%, respectively. On the contrary, the administration of Sirolimus 2 mg/kg/day after week nine lowered the incidence to 37.5% together with a reduction in the volume and tumour number, of pre-neoplastic lesions, *TGF-β* and a more favourable oxidative profile. Regarding Cyclosporin A, tumour incidence of 62.5% in its early use and 50% in the later did not differ significantly from the Carcinogen group, despite a reduction in tumour number and volume and some hyperplastic, dysplastic papillary lesions.

The use of Celecoxib in the first phase of the study, 1 and 10 mg/kg/day resulted in a lower incidence (12.5%), tumor volume and number. Its use in the second stage did not bring any benefit. As for ASA, used in the first phase, the highest dose had a greater reduction in the incidence of cancers (12.5 vs 37.5%) and also in tumor volume and number. There was also a reduction in hyperplastic and pre-neoplastic urothelial lesions, and in the aggressiveness of carcinomas, *TGF-β* and inflammatory markers.

Atorvastatin, used in the first eight weeks, reduced the incidence of carcinomas to 12.5% at a dose of 3 mg/kg/day and to 25% at a dose of 30 mg/kg/day, and also their number, volume and histological aggressiveness. Despite the reduction in high-grade dysplasia and Cis with Omega 3 fatty acids in the first phase of the carcinogenic model, a lower incidence of carcinomas (62.5%) or number of tumours were not achieved, although a reduction in tumoral volumes was obtained. With these two drugs there was a decline of inflammatory markers and a more favorable oxidative profile.

In the groups in which chemoprevention was achieved, immunohistochemical staining for *p53*, *Ki67*, *CD31* and *Cox-2* was more localized and less intense. There was less expression of proto-oncogenes and anti-apoptotic genes.

Conclusions: The incidence of urothelial carcinoma in our model was 68%. The bladder carcinogenesis pathway includes an imbalance of the cell cycle and proliferation, inhibition of apoptosis, increased

Abstract

.....
angiogenesis, disruption of tumor immunosurveillance and a pro-inflammatory state.

COX-2 inhibitors (both selective and non-selective) and atorvastatin have shown the greatest efficacy among the studied drugs. With the exception of Sirolimus, pharmacological prevention of bladder carcinoma was more effective when started earlier.

Neoplastic prevention was due to the combination of multiple mechanisms of pharmacological action, which allowed the rebalancing of altered pathways in the carcinogenic process.

CAPÍTULO I

CARCINOMA DA BEXIGA:

***"UM PROBLEMA DE SAÚDE
PÚBLICA"***

Carcinoma da Bexiga: Um problema de Saúde Pública

1. Epidemiologia

O carcinoma da bexiga é a 7.^a neoplasia mais frequente no sexo masculino na população mundial, com uma incidência ajustada à idade de 8,9 por 100.000 pessoas/ano (ASR). No sexo feminino, a incidência é menor, ocupando a 18.^a posição, com uma ASR de 2,2. Globalmente, em 2008, foram identificados 382 660 novos casos de neoplasia vesical (Ferlay et al. 2010, Bray et al. 2012).

A incidência desta neoplasia apresenta importantes variações geográficas (Figura 1 e Quadro 1). É mais frequente nas regiões desenvolvidas, sendo na América do Norte e na União Europeia a quarta neoplasia mais comum no sexo masculino, a seguir aos câncros da próstata, do pulmão e colo-rectal, constituindo mais de 6% de todos os tumores (Ferlay et al. 2010, Bray et al. 2012).

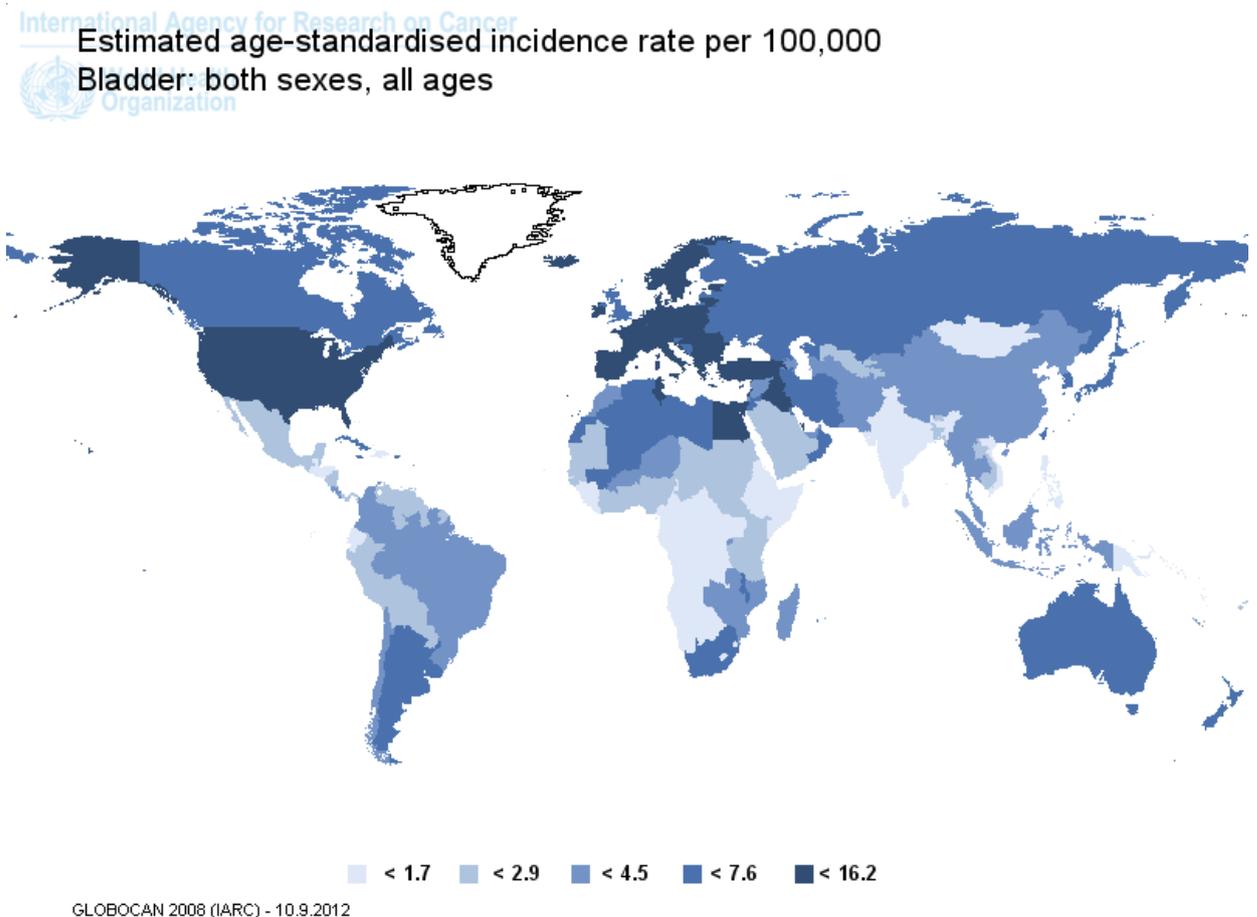


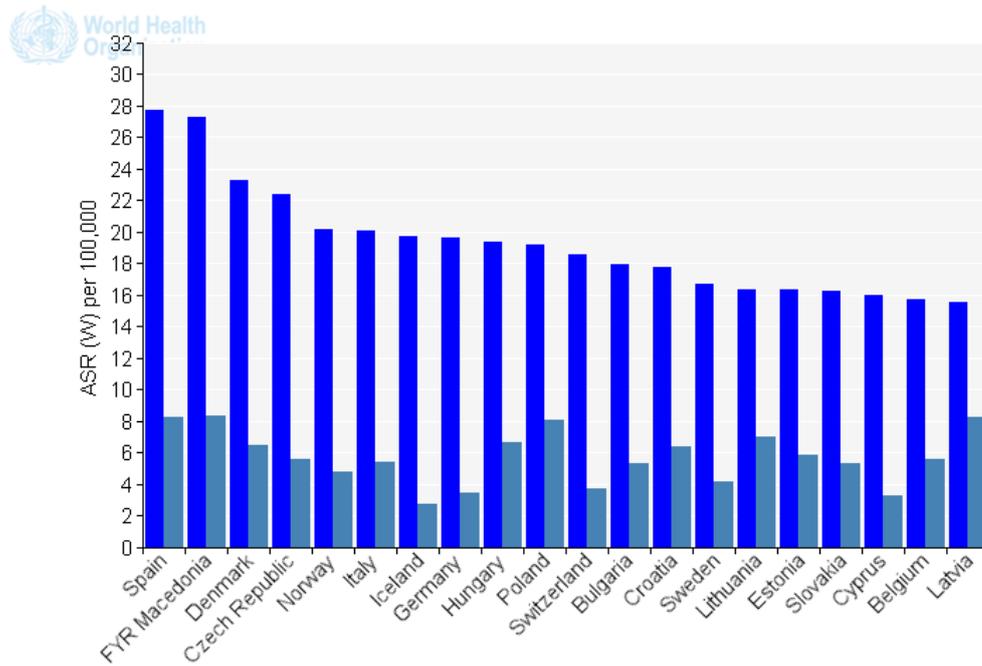
Figura 1: Mapa mundial mostrando a incidência ajustada à idade por 100.000 pessoas/ano, em ambos os sexos (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>).

População	N. os Absolutos	ASR	Risco cumulativo
Mundo	382 660	5,3	0,60
Regiões mais desenvolvidas	227 526	9,1	1,07
Regiões menos desenvolvidas	155 134	3,3	0,38
África	22 053	4,0	0,49
Egipto	7967	13,5	1,67
Américas	92 122	7,8	0,91
América do Norte	73 235	12,0	1,44
EUA	68 812	12,7	1,52
América Central	2 854	2,2	0,26
América do Sul	14 244	3,7	0,42
Ásia	131 600	3,3	0,38
China	54 927	3,5	0,40
Austrália/Nova Zelândia	3 085	6,3	0,71
Europa	133 696	9,0	1,06
União Europeia (EU-27)	107 419	10,0	1,18
Europa do Norte	17 635	8,2	0,95
Reino Unido	9 966	7,1	0,79
Dinamarca	1 641	14,5	1,77
Noruega	1 163	12,3	1,48
Europa do Sul	37 062	11,2	1,31
Itália	15 816	11,0	1,30
Espanha	13 008	14,4	1,70
Portugal	1 935	8,5	0,99
Europa Ocidental	42 225	9,8	1,15
Alemanha	23 203	11,6	1,34
França	10 668	7,7	0,91
Europa Central e Leste	36 774	7,2	0,90
Rússia	13 002	5,6	0,70
Polónia	6 931	10,4	1,31

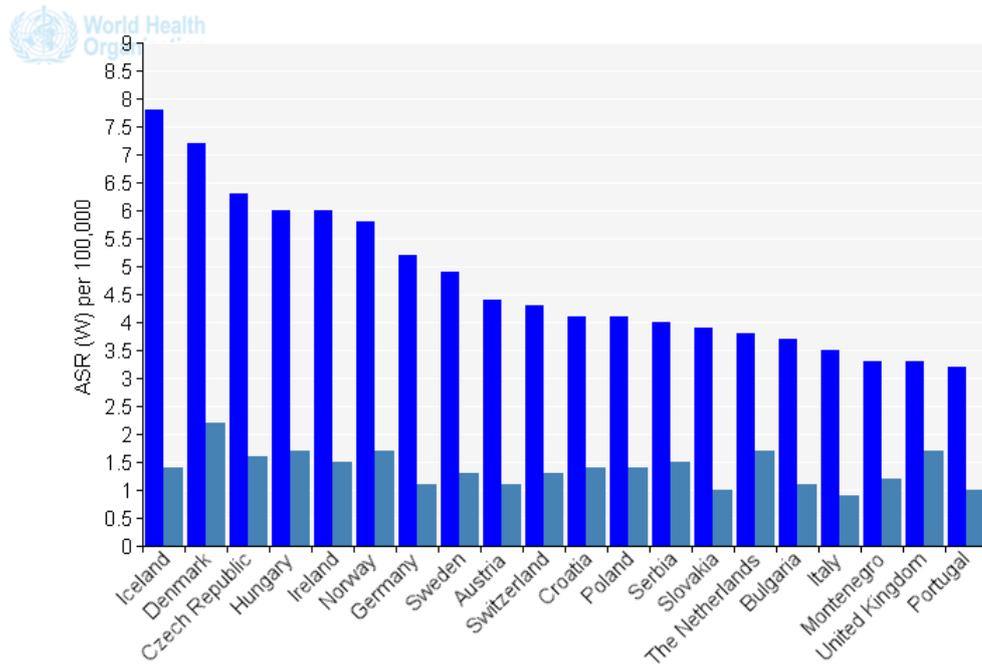
Quadro 1: Incidência do cancro da bexiga, em números absolutos e ajustada à idade por 100.000 pessoas/ano (ASR), e risco cumulativo em várias populações mundiais, em ambos os sexos (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>)

As diferenças na incidência são visíveis mesmo entre os países Europeus (Figura 2). Algumas das variações são causadas por diferenças no diagnóstico ou no registo, o que dificulta as comparações (Hankey et al. 1991, Lynch et al. 1991, Kirkali et al. 2005). Por exemplo, no Reino Unido o *Carcinoma in situ (Cis)* e os tumores confinados à mucosa (Estádio Ta) não são referidos nas estatísticas, ao contrário dos Estados Unidos (Crow and Ritchie 2003). De realçar a elevada incidência no Egipto, em parte devido à infecção epidémica por *Schistosoma haematobium* (Bedwani et al. 1998).

International Agency for Research on C Bladder: male, all ages



International Agency for Research on C Bladder: female, all ages



■ Incidence
■ Mortality

GLOBOCAN 2008 (IARC) (21.10.2012)

Figura 2: Incidência e mortalidade ajustadas à idade por 100.000 pessoas/ano (ASR), em função do sexo, nos vinte países Europeus com valores mais elevados (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>).

O cancro da bexiga é mais comum no sexo masculino, numa proporção para o sexo feminino que vai de 1,89 no Leste Africano a 6,27 na Europa do Sul (Figura 3). Isso deve-se essencialmente à maior exposição dos homens ao tabaco e às aminas aromáticas, os dois maiores factores de risco ambiental conhecidos (Negri and La Vecchia 2001, Pelucchi et al. 2006). Apesar disso, foi sugerido que a sobrevivência ajustada ao estágio da doença é pior nas mulheres do que nos homens (Mungan et al. 2000).

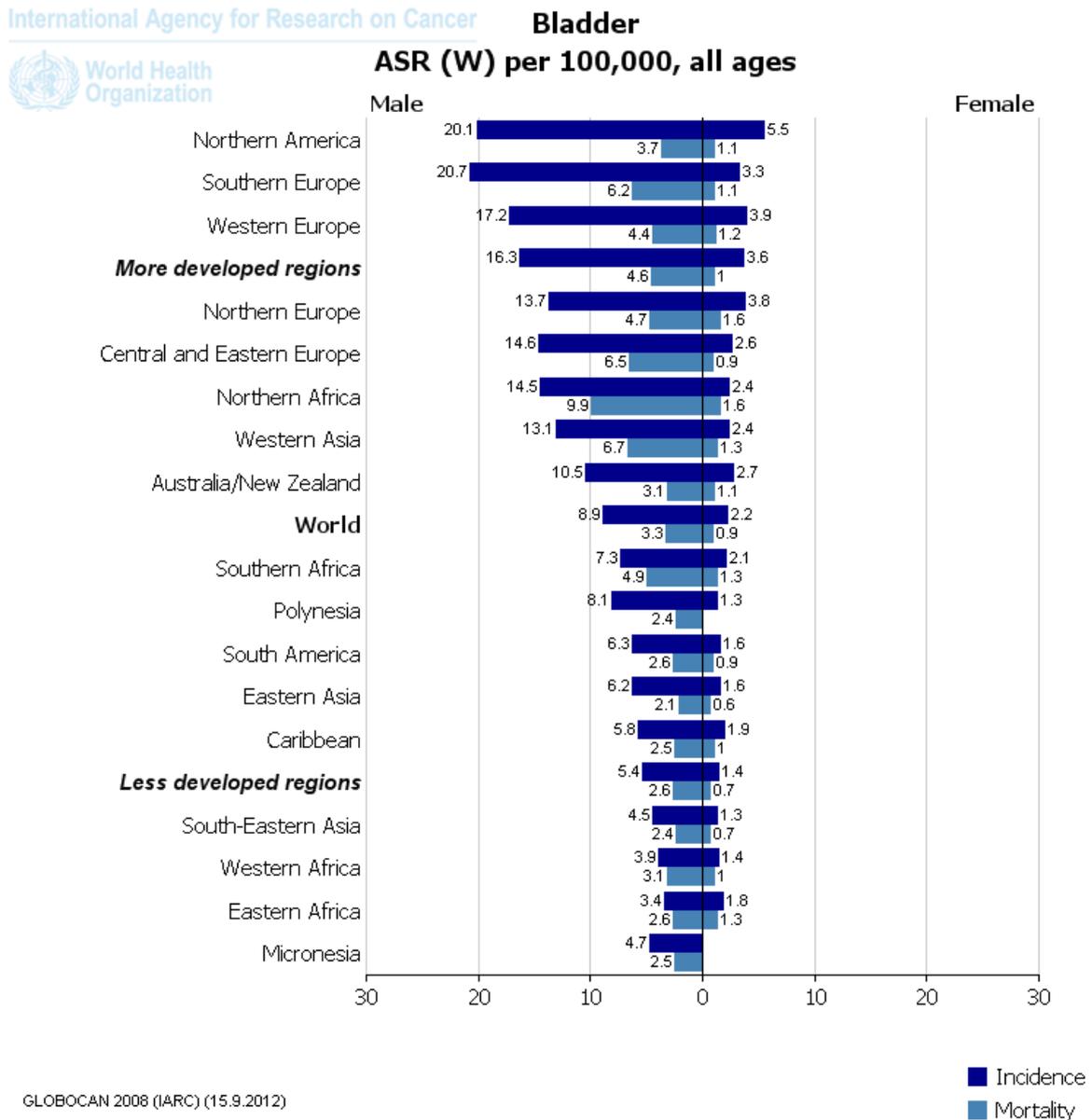


Figura 3: Incidência e mortalidade ajustadas à idade por 100.000 pessoas/ano (ASR), em função do sexo, em várias populações mundiais (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>).

Segundo os dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, os homens têm um risco de desenvolver esta neoplasia até aos 75 anos que vai de 0,4% na América Central até mais de 2% na América do Norte e no Sul da Europa, enquanto nas mulheres os valores variam entre os 0,1 e os 0,6% (Fig. 4). O risco de morrer desta neoplasia é também mais elevado no sexo masculino mas, em termos da variação geográfica, o maior valor é atingido no Norte de África, no Oeste Asiático e na Europa Central e de Leste, o que difere da incidência.

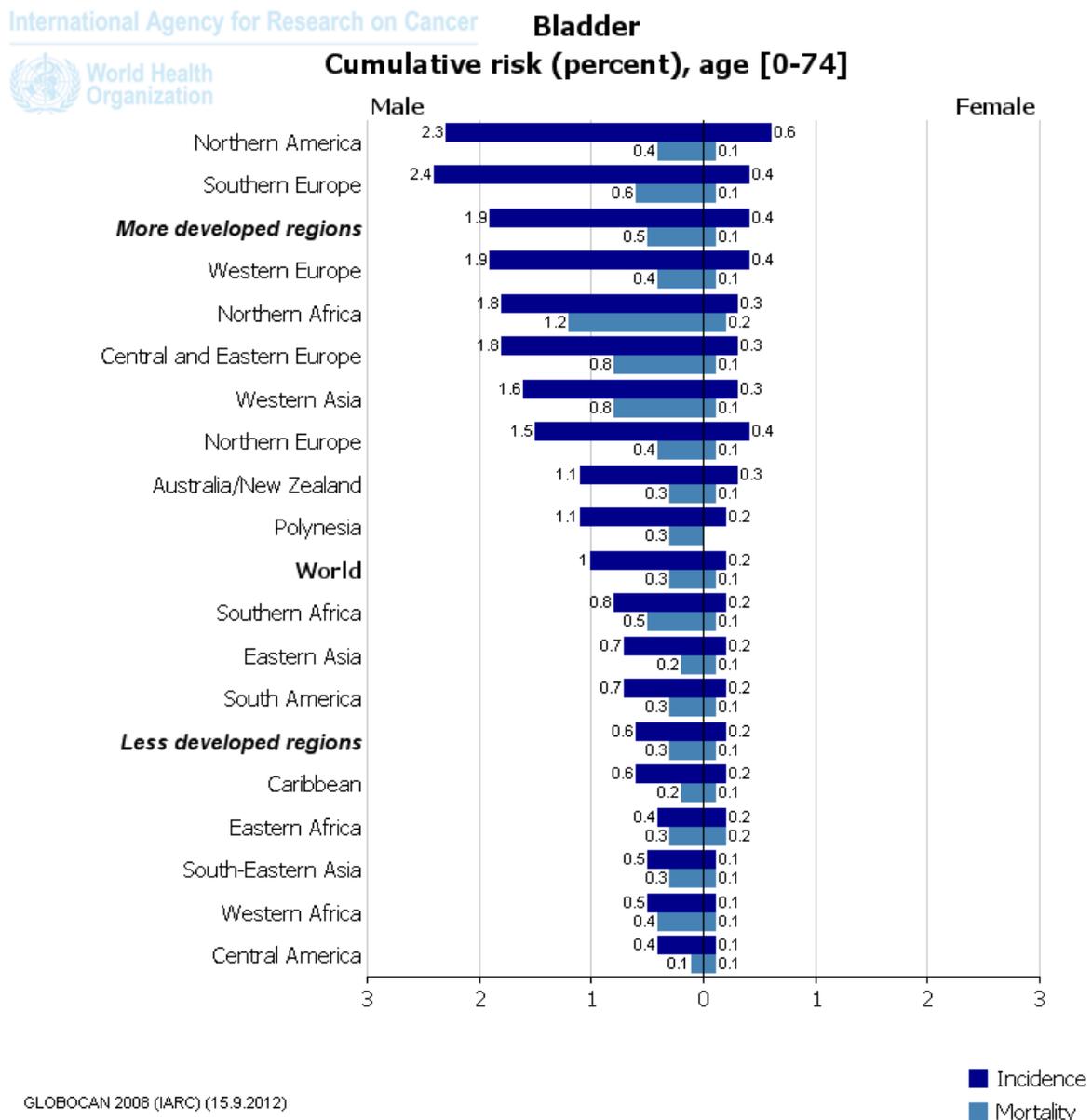


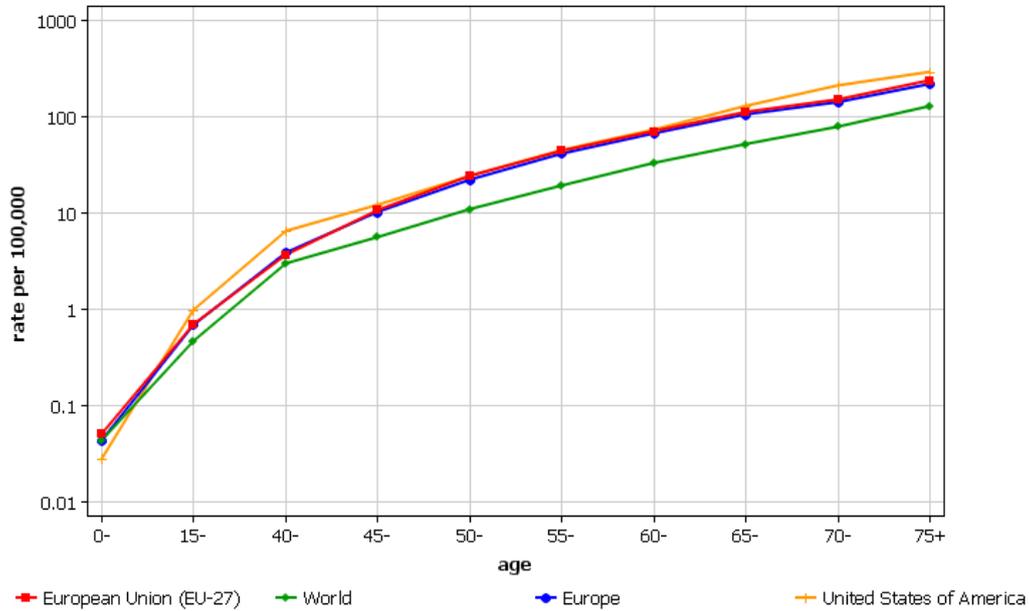
Figura 4: Risco relativo de desenvolver e morrer de cancro da bexiga (<75 anos) em função do sexo, em várias populações mundiais (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>).

A incidência aumenta com a idade, em ambos os sexos, de forma mais pronunciada a partir da 6.ª década de vida (Fig. 5).

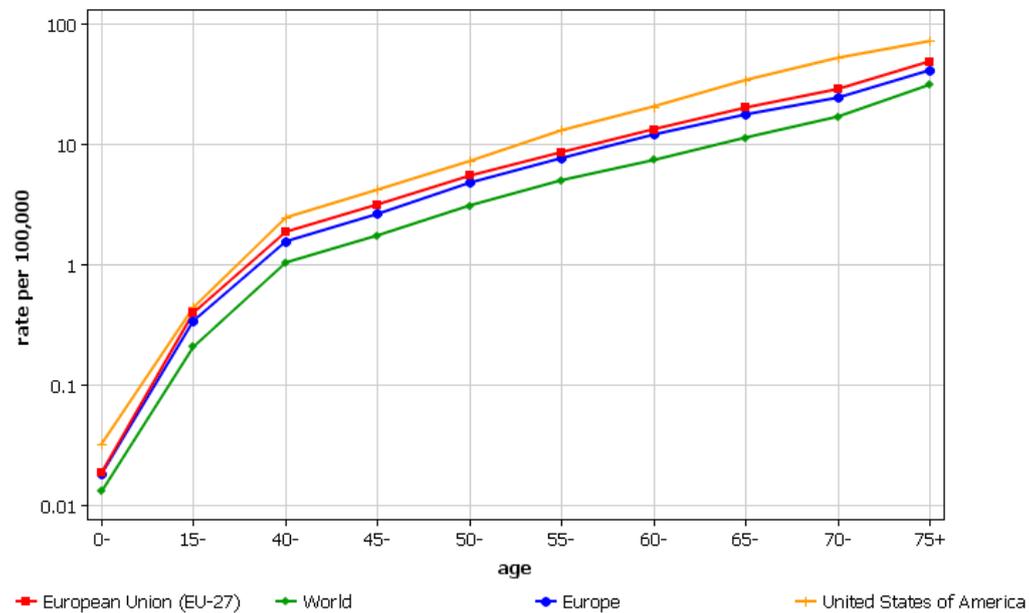
International Agency for Research on Cancer



Bladder cancer, Male



Bladder cancer, Female



GLOBOCAN 2008 (IARC) - 18.11.2012

Figura 5: Incidência e mortalidade ajustadas à idade por 100.000 pessoas/ano (ASR), em função da faixa etária e do sexo (GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer: <http://globocan.iarc.fr/>).

.....
Estes tumores raramente são detectados incidentalmente em autópsias (Kishi et al. 1981). Tem-se verificado um aumento temporal da sua incidência, que não se deve a grandes inovações tecnológicas ou a alterações nas práticas de saúde, nomeadamente com rastreios.

A maior incidência de tumores vesicais no sexo masculino não é totalmente explicada pelas diferenças nos hábitos tabágicos e na exposição ocupacional, os dois factores de risco melhor conhecidos (Mungan et al. 2000). Nos Estados Unidos, entre 1985 e 2005, o número de casos diagnosticados anualmente cresceu mais de 50%, a uma velocidade 25% superior nos homens (Jemal et al. 2005). Estes valores são surpreendentes, atendendo à crescente exposição das mulheres a carcinogénios ocupacionais, à mudança dos seus hábitos tabágicos, associado à sua maior esperança de vida e ao aumento destes tumores com a idade. Há outros factores que podem explicar estas diferenças, como factores hormonais. Estudos experimentais mostram que ratos tratados com androgénios desenvolvem mais tumores vesicais do que animais tratados com estrogénios, o que sugere que a estimulação androgénica promove (ou não inibe) a oncogénese, enquanto os estrogénios fazem o oposto (Reid et al. 1984). Estudos populacionais mostram que as mulheres que tiveram filhos têm um menor risco de carcinoma vesical do que as mulheres nulíparas, porventura devido às alterações hormonais relacionadas com a gravidez, sendo esse risco tanto menor quanto maior o número de gestações (Miller et al. 1980, Green et al. 1988, Cantor et al. 1992). Outros autores defendem que as diferenças se possam dever ao facto de os homens e as mulheres metabolizarem os carcinogénios de forma diferente, nomeadamente através do citocromo P450 1A2 (Horn et al. 1995). É também possível que diferenças nos polimorfismos genéticos de N-acetil transferase (NAT) 1 e 2 se associem a uma menor susceptibilidade das mulheres aos factores de risco tabágico e ocupacional (Risch et al. 1995, Cascorbi et al. 2001).

Nem todos os trabalhos reproduzem um maior crescimento relativo destes tumores no sexo masculino. Num trabalho de Cook, a relação masculino/feminino nos carcinomas de células de transição da bexiga nos Estados Unidos manteve-se relativamente estável entre 1975 e 2004, com valores de 4,04, 4,13 e 4,01 para os períodos de 1975-1984, 1985-1994 e 1995-2004, respectivamente (Cook et al. 2009). Contudo, no mesmo estudo, confirmou-se um aumento da sua incidência nesse intervalo temporal, em ambos os sexos.

A incidência e mortalidade também são influenciadas pela etnia. Por razões ainda não claramente determinadas, o risco dos *Afro-Americanos*

.....

desenvolverem cancro da bexiga é cerca de metade dos *Euro-Americanos*, embora a sobrevivência global seja menor (Edwards et al. 2005). No entanto, o risco aumentado nos *Euro-Americanos* está limitado às formas superficiais, sendo o risco similar nas formas invasivas (Schairer et al. 1988, Hartge et al. 1993, Prout et al. 2004). Serão multifactoriais as causas que explicam a sobrevivência cerca de 35% inferior nos doentes de raça negra. Uma razão prende-se com a menor percentagem de tumores localizados à mucosa na altura do diagnóstico. Isto pode dever-se a atrasos no diagnóstico, deficiências no registo das formas superficiais ou carcinomas mais agressivos (Lynch and Cohen 1995). Não obstante, a sobrevivência, em função do estadiamento inicial, continua a ser mais favorável na raça branca (Fleshner et al. 1996). Os carcinomas vesicais também são de grau histológico mais indiferenciado. A tendência recente aponta para uma melhoria do diagnóstico nos homens de raça negra, em estádios menos avançados, com uma evolução paralela na sobrevivência (Lee et al. 2006).

Algumas variações biológicas raciais, por exemplo, nos genes que codificam o glutatião-S transferase (GST) e o NAT2, ao modificarem várias fases da carcinogénese, podem contribuir também para estas disparidades (Yu et al. 1995, Gu et al. 2005, Kirkali et al. 2005). Contudo, ainda não foram identificadas diferenças genéticas claras ou marcadores moleculares de pior prognóstico nas várias etnias.

Embora os homens tenham globalmente uma sobrevivência aos cinco anos superior à das mulheres, esta diferença é mais significativa no caso das mulheres Afro-Americanas. Mais de um terço destas mulheres apresenta-se com doença localmente avançada ou metastática e os tumores indiferenciados são 15% superiores aos dos homens e mulheres de raça branca, 11% aos homens de raça negra e, ao contrário do sexo masculino, não houve uma evolução temporal positiva (Lee et al. 2006).

Num estudo destinado a avaliar as diferenças étnicas na sobrevivência por cancro da bexiga, baseado nos registos da *Surveillance, Epidemiology and End Results Cancer registry data*, entre 1975 e 2005, os autores encontraram uma sobrevivência específica da doença aos cinco anos inferior nos doentes de raça negra, sendo semelhante nos brancos, hispânicos e habitantes das ilhas da Ásia/Pacífico (Yee et al. 2011). Na raça negra, a percentagem de doença localizada era menor e os tumores de alto grau eram mais frequentes do que nos brancos. No entanto, os resultados foram consistentemente piores, mesmo após estratificação para o estágio, grau, características dos doentes e terapêutica primária. Alguns trabalhos referem que diferenças nos tratamentos, nos EUA, poderiam contribuir para as piores

.....
sobrevivências na raça negra (Hankey and Myers 1987, Mayer and McWhorter 1989, Konety and Joslyn 2003). Devido ao nível sócio-económico mais baixo, seriam operados mais frequentemente em Hospitais de menor diferenciação, com maior morbidade operatória (Konety et al. 2007). Contudo, num estudo mais recente, não ficou demonstrado que o maior risco de morte nos negros se devesse de forma significativa a diferenças no tratamento inicial do cancro da bexiga (Hollenbeck et al. 2010).

O estado marital também foi considerado um factor preditivo, tendo sido demonstrado que o casamento se associava a aumento da sobrevivência livre de doença, numa série de 7262 doentes submetidos a cistectomia radical (Gore et al. 2005). A taxa de casamentos cerca de 20% inferior na raça negra pode, assim, contribuir, para o pior prognóstico. As diferenças no consumo de tabaco também poderão associar-se a algumas das disparidades observadas na incidência e sobrevivência (CDC 2004).

A mortalidade por cancro da bexiga tem vindo a diminuir globalmente nos EUA desde meados dos anos setenta (Edwards et al. 2005). Na maioria da Europa Ocidental essa diminuição ocorreu mais tarde, no início dos anos noventa, mas tal descida não se verificou nalguns países da Europa Central e de Leste (La Vecchia et al. 1999, Levi et al. 2004). Até aos primeiros anos do século XXI, na União Europeia, houve uma redução da mortalidade de 16% nos homens e de 12% nas mulheres. Nos últimos anos, essa melhoria alargou-se à generalidade dos países Europeus, com excepção da Croácia e da Polónia, em ambos os sexos, da Roménia, no sexo masculino e da Dinamarca, no sexo feminino (Ferlay et al. 2008). Em 2006, a mortalidade por cancro da bexiga na União Europeia era de 5,5/100 000 nos homens e de 1,2 por 100 000 nas mulheres (Bosetti et al. 2011). No período 2005-2008, os países Europeus que tinham as mais elevadas taxas de mortalidade eram a Polónia, Espanha, Letónia e Lituânia no sexo masculino (> 7/100 000) e a Dinamarca, Hungria e Reino Unido (>1,7/100 000) no sexo feminino.

Em Portugal, segundo os dados da já citada *International Agency for Research on Cancer*, a incidência global é de 8,5, sendo o 7.º tumor mais frequente. Nos homens surge a seguir às neoplasias da próstata, colo-rectal, pulmão e estômago (ASR: 15,1). Nas mulheres a incidência é de apenas 3,2 (Bray et al. 2012). Num estudo que avalia a incidência e a mortalidade por cancro em Portugal, os valores apresentados são mais elevados, com uma incidência de 25,7 no sexo masculino e de 7,1 no sexo feminino (Pinheiro et al. 2003). Os homens portugueses têm um risco de desenvolver esta neoplasia até aos 75 anos de 1,9% e de

.....
morrer dela de 0,8%. Os mesmos autores avaliaram a variação anual da mortalidade por cancro da bexiga entre 1988 e 1998 no nosso país, tendo-se constatado um aumento de 0,8% nos homens e uma diminuição de 0,4% nas mulheres.

Devido à elevada taxa de recidivas e longas sobrevivências nas formas não músculo-invasivas é um dos tumores mais prevalentes nos homens de meia-idade e idosos, nos países desenvolvidos (Burger et al. 2012)

2. Factores de Risco

2.1. Factores de risco ambientais

1. Tabaco: o factor de risco melhor estabelecido para o cancro da bexiga, em ambos os sexos, é o tabaco (Freedman et al. 2011). No entanto, outros factores influenciam esse risco. Há populações com altas taxas de tabagismo mas baixas taxas de carcinoma vesical, como os nativos do Havai, Maoris da Nova Zelândia ou ancestrais da Polinésia, o que sugere diferenças no metabolismo de carcinogénios (Foster 1979). As nitrosaminas, nomeadamente a β -naftilamina e a 4-aminobifenil, levam a mutações do DNA que, potencialmente, podem afectar todo o genoma e factores que interfiram com a sua metabolização podem alterar o seu potencial carcinogénico (Jones et al. 1991). Sabe-se que fumadores com acetilação lenta por NAT2 têm maior risco de desenvolver neoplasia vesical, por menor capacidade de eliminação das amins aromáticas presentes no tabaco (Marcus et al. 2000). Outros autores referiram que outra NAT polimórfica, a NAT1, pode na realidade ser mais preditiva de cancro da bexiga, tendo os fumadores homozigóticos NAT1*10 um risco 8,5x superior aos do NAT1 *wild-type* (Taylor et al. 1998). O risco associado ao tabagismo seria particularmente elevado naqueles que tivessem dois alelos NAT2 lentos e uma ou duas cópias do alelo NAT1*10. Também foi referido o papel do citocromo P450 1A2 e do GST-M1 no metabolismo destes agentes carcinogénicos (Horn et al. 1995, Burger et al. 2012). Agentes exógenos, como a ingestão vitamínica, também modificam a susceptibilidade carcinogénica.

Apesar da comprovada ligação entre consumo tabágico e carcinoma vesical, a evolução temporal das duas tendências não é coincidente. Nos EUA, a prevalência de tabagismo nos últimos 30 anos diminuiu substancialmente, sem se acompanhar de um decréscimo da incidência destes tumores (Garrett et al. 2011). Tipicamente, apontava-se para um risco relativo estimado dos fumadores activos à volta de três (Hemelt

.....
et al. 2009). Contudo, a composição dos cigarros sofreu alterações durante as últimas décadas, com uma redução nas concentrações de alcatrão e nicotina, mas também um aparente aumento na concentração de carcinogénios específicos, como a β -naftilamina, 4-aminobifenil e outras nitrosaminas (Hoffmann et al. 2001). Num estudo populacional caso-controlo recente, sugere-se que o risco relativo também pode ter aumentado (Baris et al. 2009). Na população em estudo, o risco aumentou de 2,9 no período de 1994-1998, para 5,5 no período de 2001-2004. Este aumento do risco associado ao tabaco anularia o efeito positivo da redução do seu consumo, pelo que a incidência de cancro da bexiga se mantém estável. Estes dados necessitam de ser confirmados em estudos prospectivos.

O consumo de tabaco era considerado responsável por cerca de 50-65% do risco de cancro da bexiga no homem e 20-30% na mulher (Hartge et al. 1987, Brennan et al. 2000, Brennan et al. 2001). Estas estimativas baseavam-se em estudos populacionais durante um período temporal em que a prevalência do tabagismo era muito superior no sexo masculino. Actualmente, em muitos países ocidentais, essas diferenças estão muito atenuadas. Num estudo prospectivo mais recente, do *National Institutes of Health*, iniciado em Outubro de 1995, 281 394 homens e 186 134 mulheres, completaram um questionário sobre o estilo de vida e foram seguidos até Dezembro de 2006 (Freedman et al. 2011). Durante este período foram diagnosticados 3896 cancros da bexiga nos homens e 627 nas mulheres. Nos antigos fumadores o risco relativo foi 2,22 vezes superior aos não fumadores, enquanto nos fumadores activos esse risco subiu para 4,06. De igual modo, o risco de carcinoma vesical atribuível ao tabaco foi de 50% nos homens e de 52% nas mulheres. Este estudo reflecte de forma mais actual a associação do tabagismo ao tumor da bexiga nos países ocidentais.

Verificou-se também que, em contraste com a relação directa entre a duração do tabagismo e o risco de neoplasia, para intensidades elevadas de consumo (> 15-20 cigarros/dia) esse risco estabiliza (Baris et al. 2009). Adicionalmente, para uma exposição total idêntica, fumar a baixa intensidade durante mais tempo seria mais nocivo do que fumar com maior intensidade num período mais curto, idêntico ao que foi sugerido noutros estudos (Lubin et al. 2007, Lubin et al. 2008).

Existe uma relação inversa entre o risco de cancro vesical e o tempo que decorre desde que se deixa de fumar, com uma redução que ocorre primariamente nos primeiros cinco anos. Mas, mesmo ao fim de 20 anos, o risco dos ex-fumadores é superior ao dos não fumadores, sugerindo um

.....
efeito irreversível numa fase precoce (Brennan et al. 2000, Samanic et al. 2006).

Foram poucos os estudos que analisaram a exposição passiva ambiental ao tabaco como factor de risco para cancro da bexiga, tendo nalguns sido encontrada uma associação positiva, essencialmente no sexo feminino (Samanic et al. 2006, Alberg et al. 2007, Jiang et al. 2007) e a exposição na infância (Bjerregaard et al. 2006). Noutros, não foi encontrado risco significativo (Burch et al. 1989, Zeegers et al. 2004, Baris et al. 2009).

Ao compararmos o tipo de tabaco consumido, verificamos que o risco é maior com os cigarros (2,9-4,2) do que com os charutos (1,6-3,5) ou com os cachimbos (1,2-3,1) (Pitard et al. 2001, Letasiova et al. 2012). Independentemente do tipo de tabaco, o risco é superior se houver inalação do fumo (McCormack et al. 2010). Os derivados do tabaco sem produção de fumo associado (mastigado, inalado) não se associam a maior probabilidade de cancro vesical (Boffetta 2008). Alguns autores referem ainda que o risco não é alterado pela utilização ou não de filtros (Zeegers et al. 2002).

2. Exposição Ocupacional: A exposição ocupacional é o segundo factor de risco mais importante para o carcinoma vesical e o primeiro a ser conhecido, há mais de 100 anos na Inglaterra (Letasiova et al. 2012). Estima-se que possa ser responsável por cerca de 20% de todas as neoplasias da bexiga (Vineis and Simonato 1991). As aminas aromáticas β -naftilamina, 4-aminobifenil e benzidina são os únicos agentes específicos inequivocamente associados a estes tumores, podendo encontrar-se em produtos das indústrias químicas, de tintas, de borrachas bem como em corantes do cabelo, fungicidas, fumo do tabaco, plásticos, metais, fumos de exaustão automóvel e emissões poluentes de fábricas (Yu et al. 2002, Garcia-Perez et al. 2009). Já em 1954 tinha sido referido um risco 200x superior de cancro da bexiga nos trabalhadores Ingleses e Galeses expostos a β -naftilamina (Case and Hosker 1954). Num estudo envolvendo mais de 11 000 trabalhadores da indústria da borracha, confirmaram-se taxas de mortalidade por cancro vesical muito aumentadas (Golka et al. 2004). Numa publicação mais antiga, foram referenciados 19 casos de cancro da bexiga em 171 trabalhadores expostos a 4-aminobifenil (Melick et al. 1955) e com cinco desses trabalhadores a terem tempos de exposição inferiores a dois anos. A benzidina foi identificada como a amina aromática com maior potencial carcinogénico vesical, quer pela sua utilização em larga escala na indústria de tintas e de borrachas, quer pela alta

.....
incidência de tumores vesicais. Noventa e dois dos 331 trabalhadores da fábrica "IG Farben" de Leverkusen, Alemanha, expostos a este agente antes de 1967 desenvolveram esta neoplasia. (Golka et al. 2004). Num estudo Chinês, observou-se um risco de cancro da bexiga 35x superior (Ma et al. 2003).

Apesar de nos países desenvolvidos estes químicos serem actualmente proibidos, continua a haver neoplasias causadas por estes agentes. Isto deve-se ao grande período de latência, frequentemente mais de 20 anos, entre a exposição ocupacional e o tumor clinicamente evidente. Dado este risco, trabalhadores ou antigos trabalhadores expostos a estes agentes deveriam ser monitorizados para um diagnóstico precoce desta neoplasia.

Não obstante a erradicação de muitos produtos reconhecidamente perigosos, ainda existem vários potenciais carcinogénios vesicais na produção industrial como a ortotoluidina e a 4,4-metileno-bis (2-cloroanilina), um químico sintético usado primariamente na produção de componentes de poliuretano (Chen et al. 2005).

A exposição a estes agentes fora do contexto industrial também constitui factor de risco. Cabeleireiros expostos regularmente a corantes têm maior probabilidade de tumor do urotélio vesical, que pode ir até cinco vezes, nos casos de duração superior a 10 anos (Gago-Dominguez et al. 2001). Embora estudos anteriores tenham associado o uso pessoal de corantes para o cabelo ao tumor da bexiga (Gago-Dominguez et al. 2001, Gago-Dominguez et al. 2003), investigações mais recentes não o confirmam (Ros et al. 2012).

Outros profissionais de risco são os pintores, por exposição a agentes nocivos presentes nas tintas, como a benzidina, formaldeído, asbestos e solventes (Steenland and Palu 1999), os sapateiros e trabalhadores do couro, alumínio, ferro, aço, por exposição a amins aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Gaertner and Theriault 2002). As emissões do gasóleo também aumentam moderadamente o risco (Boffetta and Silverman 2001). Embora várias outras profissões tenham sido associadas ao cancro vesical, os dados não são consistentes (Zheng et al. 2002, Kogevinas et al. 2003).

Em muitos casos, há um efeito cumulativo de vários factores de risco, nomeadamente a exposição ocupacional e o tabagismo.

3. Arsénio na água de consumo: o arsénio é um metalóide natural que existe em abundância no meio ambiente, podendo encontrar-se na comida, na água, no solo e no ar (Baastrup et al. 2008). Pode causar envenenamento agudo fatal e a exposição prolongada foi associada a

.....
vários câncros, diabetes, doenças de pele, tosse crônica, bem como efeitos tóxicos no fígado, rins, aparelho cardiovascular e sistema nervoso central e periférico. O arsénio orgânico, com pouca ou nenhuma toxicidade, é mais abundante na comida enquanto os compostos inorgânicos se encontram principalmente em aquíferos, onde se acumulam por processos naturais de erosão e actividade biológica ou, eventualmente, por contaminação antropogénica (Abernathy et al. 2003). A maioria dos problemas de saúde está associada ao consumo de doses elevadas na água e à exposição às formas inorgânicas mais tóxicas. Nalguns países, como o Bangladesh, China, Índia e Chile, o arsénio é encontrado em grandes concentrações na água e no solo.

Existe uma evidência forte que associa o cancro da bexiga, além de outras neoplasias, a elevadas concentrações de arsénio na água da bebida, acima de 300-500 µg/l (Marshall et al. 2007, Navarro Silvera and Rohan 2007). Na região norte do Chile, onde houve consumo de água com alto teor de arsénio até aos anos setenta, o risco relativo de ter neoplasia vesical era significativamente superior ao de outras regiões do país, podendo ir até 6,10x nos homens e 13,8x nas mulheres, sendo de registar o longo período de latência até à manifestação clínica da doença, que continua a ocorrer mais de 25 anos após ter cessado a exposição. Outros trabalhos confirmam este risco, estabelecendo uma clara relação dose-efeito. (Chen et al. 1986, Chen et al. 1988, Su et al. 2011).

Poucos estudos avaliaram os efeitos adversos da exposição a baixas doses de Arsénio e os resultados não foram consistentes. Alguns mostraram uma relação positiva com o cancro da bexiga e também da pele e da próstata, mesmo para valores <50 µg/l (Morales et al. 2000, Knobloch et al. 2006). Outros não o confirmaram (Steinmaus et al. 2003, Baastrup et al. 2008). Um estudo mostrou mesmo uma diminuição do risco, embora não significativa, com o aumento da exposição, para valores entre 3 e 60 µg/l (Lamm et al. 2004). A existência de um limiar para o efeito carcinogénico deste agente tem sido debatido e, em investigações *in vitro*, baixas concentrações protegem contra o stress oxidativo e lesão do DNA (Snow et al. 2005). Alguns autores sugerem uma interacção com o tabaco para causar os câncros da bexiga, pulmão e pele, apontando para uma carcinogénese envolvendo vários mecanismos e co-exposição a outros agentes (Steinmaus et al. 2003, Knobloch et al. 2006). O Arsénio inibe enzimas com acção anti-oxidante e enzimas contendo sulfidril, interferindo com o metabolismo celular, daí resultando acções citotóxicas e genotóxicas (Anetor et al. 2007).

.....

2.2. História Médica

1. Infecção/Inflamação crónica do tracto urinário inferior: num estudo epidemiológico com 2982 doentes com cancro da bexiga e 5782 controlos, uma história de três ou mais infecções do tracto urinário aumentou significativamente o risco de tumor vesical em geral (RR: 2,0) e de carcinoma escamoso (SCC) em particular (RR: 4,8) (Kantor et al. 1984). O risco de neoplasia também foi mais elevado na presença de cálculos vesicais (RR: 1,8), não havendo qualquer associação aos cálculos renais.

É conhecido o risco aumentado nos doentes com traumatismo medular, que, nalgumas publicações, é mais de três vezes superior ao da população em geral (Groah et al. 2002). Mecanismos imunológicos, inflamatórios, com aumento da proliferação celular e mutações genéticas, bem como uma exposição prolongada a carcinogénios, como nitritos e nitrosaminas, podem estar envolvidos no processo neoplásico. Nos paraplégicos, a probabilidade de desenvolver neoplasia era 4,9x superior nos que usavam cronicamente sonda vesical comparativamente aos que a não necessitavam. A incidência de carcinoma vesical tem vindo a diminuir nesta população, devido à utilização menos frequente de algaliação crónica e ao melhor tratamento das infecções, sendo nalgumas séries semelhante à da população em geral (Pannek 2002). Infelizmente, 60% dos doentes surgem com tumores músculo-invasivos.

Numa avaliação recente de uma população de doentes com lesão da espinhal medula e cancro da bexiga, apenas 44% estavam algaliados cronicamente, em média 33,3 anos. Dos restantes, 8% faziam algaliação intermitente e 48% tinham um colector externo, o que levou os autores a concluírem que era a bexiga neurogénica e não a algaliação crónica o factor de risco. Dos tumores, 46,9% eram carcinomas escamosos (SCC), 31,3% tumores de células de transição (TCC), 9,4% adenocarcinomas e 12,5% tumores mistos TCC e SCC (Kalisvaart et al. 2010). As percentagens relativas divergem nas várias publicações, desde 100% de SCC até predomínio de TCC (Pannek 2002, Hess et al. 2003, Subramonian et al. 2004).

A acção do papiloma vírus humano no cancro vesical já foi estudada por alguns grupos, sendo provável que apenas desempenhe um papel na carcinogénese em doentes imunocomprometidos (Aynaud et al. 1998, Griffiths and Mellon 2000).

.....

2. Schistosomíase: a infecção por *Schistosoma haematobium* foi causalmente associada ao tumor da bexiga em áreas onde a infecção é endêmica, como no Egito (Bedwani et al. 1998). Embora as séries mais antigas mostrassem que o carcinoma escamoso era o mais frequente, com mais de 70% dos casos, na última década houve uma mudança neste padrão, sendo actualmente o carcinoma urotelial o predominante (Salem and Mahfouz 2012). Os mecanismos carcinogénicos não estão bem esclarecidos mas podem envolver a formação *in vivo* de nitritos e N-nitrosaminas voláteis e não voláteis na bexiga (Tricker et al. 1991). Outros autores propuseram moléculas estrogénicas presentes nos parasitas como sendo os iniciadores endógenos do processo tumoral (Botelho et al. 2010).

3. Radioterapia: Mulheres com carcinoma do ovário e do colo uterino submetidas a radioterapia têm um risco aumentado de desenvolver neoplasia vesical (Duncan et al. 1977, Kaldor et al. 1995). Esse risco é ainda maior se tiver sido associada quimioterapia (melfalan, tiotepa e, especialmente, ciclofosfamida). Alguns trabalhos também apontam para um maior risco nos doentes submetidos a radioterapia por neoplasia do testículo (Lewinshtein et al. 2012), da próstata (Nieder et al. 2008, Abdel-Wahab et al. 2009) assim como nos sobreviventes de bombas atómicas (Preston et al. 2007, Grant et al. 2012) e de acidentes nucleares (Romanenko et al. 2000).

4. Ciclofosfamida: este agente alquilante usado no tratamento de diversas neoplasias, nomeadamente linfoproliferativas, mieloproliferativas, ginecológicas e também em doenças não malignas, aumenta até mais de 14x o risco de cancro da bexiga, numa clara relação dose-efeito (Travis et al. 1995, Vlaovic and Jewett 1999). Para além da toxicidade aguda na mucosa vesical, produz anomalias celulares no epitélio. Não se sabe se as neoplasias uroteliais são devidas à acção imunossupressora desta substância ou a propriedades carcinogénicas intrínsecas mas é provável que ambos os factores contribuam (Kirkali et al. 2005). Foi demonstrado, em estudos experimentais, que a acroleína, um metabólito tóxico da ciclofosfamida, tem uma acção iniciadora e promotora da carcinogénese vesical (Cohen et al. 1992). São habitualmente tumores muito agressivos, a maioria já com invasão muscular na altura do diagnóstico, quer requerem um tratamento radical, mesmo nas formas superficiais, dada a elevada taxa de progressão e elevada mortalidade (Fernandes et al. 1996). O período de latência é relativamente curto,

.....
habitualmente entre os seis e os 13 anos, tendo mesmo sido referido um caso nove meses após a exposição inicial (Volm et al. 2001).

5. Fármacos: foi demonstrado que o consumo excessivo de fenacetina, cinco a 15 kg, num período de 10 anos, se associa a um aumento claro da incidência de carcinoma de células de transição da pélvis renal e da bexiga, em doentes maioritariamente do sexo feminino e com idades entre os 20 e os 49 anos (Piper et al. 1985). Outros estudos confirmaram esse aumento de risco, ao mesmo tempo que mostraram uma diminuição do risco com os AINE, especialmente os inibidores selectivos da Cox-2 (Fortuny et al. 2007, Baris et al. 2013). Também foi atribuída à pioglitazona, um antidiabético oral, uma associação, embora fraca, ao cancro da bexiga (Lewis et al. 2011).

2.3. Hábitos dietéticos

1. Café: embora tenha sido observada uma correlação positiva entre o consumo de café e o cancro da bexiga (Sala et al. 2000), uma vez considerado o tabagismo que está frequentemente associado, esse risco deixa de existir (Jensen et al. 1986, Villanueva et al. 2009).

2. Adoçantes artificiais: grandes doses de adoçantes artificiais, incluindo sacarina e ciclamatos, demonstraram ser carcinogénios vesicais em estudos experimentais com roedores (Sontag 1980). Estes estudos são pouco conclusivos dadas as elevadas doses de exposição e o facto de o cancro só ter surgido nos animais expostos *in útero* ou no período neonatal. Os estudos epidemiológicos caso-controlo em humanos chegam à conclusão de que a sacarina não está associada ao carcinoma vesical (Morgan and Wong 1985, Elcock and Morgan 1993).

3. Alimentação: embora a influência da alimentação neste tumor tenha sido pouco estudada, foi encontrado um risco aumentado para o consumo de carne cozinhada, especialmente carne vermelha (Ferrucci et al. 2010, Wu et al. 2012). Não foi encontrada qualquer associação entre o cancro da bexiga e o consumo de fruta, vegetais, peixe ou lacticíneos, tendo sido referida uma acção protectora da vitamina B12, vitamina E e selénio (Zeegers et al. 2004, Li et al. 2011, Li et al. 2011, Wu et al. 2012). Relativamente à quantidade de líquidos ingeridos, os diversos estudos têm sido inconsistentes, havendo alguns que encontram um efeito benéfico na ingestão de grandes volumes (Michaud et al.

.....
1999, Hemelt et al. 2010) e outros que não encontram esse benefício (Donat et al. 2003, Zhang et al. 2010, Zhou et al. 2012).

2.4. Hereditariedade

Não existe uma evidência epidemiológica forte para a influência de factores hereditários no carcinoma da bexiga. Numa avaliação de 12 328 familiares de 190 doentes Islandeses com neoplasia urotelial, foi encontrado um risco ligeiramente aumentado (RR: 1,24) (Kiemeney et al. 1997). Estranhamente, a prevalência de TCC foi de 3% nos familiares de 1.º grau e de 10% nos de 2.º e 3.º, o que vai contra a origem genética da doença, não tendo sido identificado um claro padrão Mendeliano de hereditariedade que pudesse explicar este risco.

Num estudo das neoplasias ocorridas na Suécia entre 1958 e 1996, foram identificadas 65 histórias familiares de cancro vesical, com um risco relativo de 1,35 nos filhos e de 2,29 nas filhas, podendo mesmo chegar a 7,26 nos irmãos de doentes diagnosticados com menos de 45 anos (Plna and Hemminki 2001). Os autores defendem um padrão de risco hereditário ligado ao cromossoma X. Um estudo mais recente da população Sueca corrobora estes dados (Bermejo et al. 2009).

A doença resulta provavelmente de uma combinação da exposição a carcinogénios exógenos e de um grande número de genes de susceptibilidade com efeitos modestos. Entre outras, foram referidas variações nas sequências genéticas 8q24.3, 4p16.3, 3q28, 5p15.33, 22q13.1, 19q12, 2q37.1 ou polimorfismos no gene promotor da Caderina-E (CDH1) (Kiemeney et al. 2006, Kiemeney et al. 2008, Kiemeney et al. 2010, Hemminki et al. 2011). Outros factores genéticos hereditários, tais como as variantes de acetiladores lentos NAT2, NAT1 e genótipos do GST-M1 podem não levar intrinsecamente a carcinoma vesical mas conferir, por exemplo, risco adicional à exposição a carcinogénios como o tabaco (Burger et al. 2012).

3. Histopatologia

Do ponto de vista histopatológico o cancro da bexiga é uma doença heterogénea. Nos países desenvolvidos, mais de 90% são carcinomas de células de transição (também denominados carcinomas uroteliais) e é a estes que nos iremos referir ao longo do trabalho (Bostwick et al. 1999).

.....

O carcinoma de células escamosas é o segundo tumor vesical mais frequente e tem uma grande variabilidade na sua prevalência em diferentes partes do mundo. Num passado recente representava mais de 70% dos casos de neoplasia vesical no Egípto, a maioria associada a infecção por *Schistosoma haematobium* (Salem and Mahfouz 2012). Noutras regiões onde este parasita é endémico, como a Tanzânia, o Malawi e o Níger, pode constituir um terço dos tumores. Na Europa e EUA, não ultrapassam os 7% e estão geralmente associados a inflamações e infecções crónicas do tracto urinário inferior causadas por cálculos vesicais, divertículos vesicais e algaliação crónica, especialmente em doentes com traumatismo medular, a tratamentos com ciclofosfamida e radioterapia. Manifestam-se como massas sólidas, frequentemente ulceradas e infiltrantes, sendo o prognóstico, em geral, mau (Lynch and Cohen 1995, Subramonian et al. 2004, Manunta et al. 2005).

O adenocarcinoma representa menos de 2% das neoplasias vesicais, podendo ser classificado em três categorias (Manunta et al. 2005) :

- Primário: surge frequentemente na cúpula e é a neoplasia predominante nas extrofias vesicais. Desenvolve-se em resposta à irritação e inflamação crónica. A maioria são mal-diferenciados, invasivos e com mau prognóstico.
- Do úraco: tumor raro, com poucas centenas de casos descritos.
- Metastático: maioritariamente de tumores prostáticos, colorectais ou ováricos.

Existem ainda neoplasias raras como o carcinoma de pequenas células/neuroendócrino, sarcoma, feocromocitoma ou melanoma.

4. Fisiologia Urotelial

4.1. O Urotélio "Normal"

A mucosa de revestimento vesical é composta por células dispostas em três a sete camadas: o denominado urotélio ou epitélio de células de transição, cujo aspecto histológico está dependente do grau de distensão na altura da fixação. Está em continuidade com o urotélio do aparelho urinário superior e da uretra, que tendem a ter menos camadas.

É constituído por um único tipo celular cujas diferenças fenotípicas entre as várias camadas se devem a diferentes graus de diferenciação celular. As da camada basal são as mais pequenas e menos diferenciadas e onde se pensa que resida o compartimento proliferativo e as células

.....
estaminais (Kurzrock et al. 2008). São praticamente inacessíveis a factores de crescimento existentes na urina e, normalmente, protegidas dos carcinogénios urinários (Messing 1992). Estas células basais podem diferenciar-se em células da camada intermédia, cujo número varia em função das espécies, três ou quatro nos humanos, uma nos roedores (Wu et al. 2009). As células mais superficiais, as células "umbrella", são altamente distintas morfológicamente de quaisquer outras de qualquer epitélio estratificado, ao contrário das anteriores. São grandes (25-250 µm), poliédricas, achatadas, assimétricas, frequentemente binucleadas, que se pensa derivarem de células intermédias, por fusão celular. Elaboram uma membrana de superfície que reveste 95% da superfície apical do urotélio e contém na sua vertente luminal as uroplaquinas, proteínas específicas do urotélio: quatro uroplaquinas *major* (Ia, Ib, II, IIIa) e uma *minor* (IIIb). As células "umbrella" têm diferenciação terminal e não sofrem divisão celular (Woodburne 1968, Wu et al. 2009). No passado, considerava-se que a presença destas células era sinónimo de urotélio normal. Contudo, podem ser observadas na superfície de neoplasias papilares de baixo grau e, frequentemente, no *Cis*.

A mucosa vesical normal contém também epitélio escamoso não queratinizante no trígono e colo vesical, sobretudo em mulheres pré-menopáusicas e menopáusicas (Stephenson et al. 1989).

Sob o urotélio encontramos a *lamina propria*, constituída por um tecido conjuntivo fibroelástico ricamente vascularizado, contendo linfáticos, nervos e onde se observam fibras musculares lisas, constituindo uma *muscularis mucosa* mal definida. Subjacente à *lamina propria* temos a *muscularis propria* da bexiga, o detrussor, constituído por fibras musculares lisas relativamente grandes, formando feixes entrelaçados, onde a mesma fibra se pode ramificar em fibras longitudinais, espirais ou circulares sem uma estruturação claramente definida, com excepção do colo vesical onde se identificam três camadas: longitudinal interna, circular média e longitudinal externa. Externamente temos a serosa (Brooks 2007). A invasão tumoral do músculo detrussor tem um significado clínico decisivo para o estadiamento, prognóstico e orientação terapêutica, na medida em que divide os tumores em dois grupos claramente distintos: os não músculo-invasivos e os músculo-invasivos.

O urotélio é um tecido altamente especializado. Actua como uma barreira de permeabilidade fisiologicamente efectiva e mecanicamente flexível que, por um lado, protege os tecidos das substâncias urinárias tóxicas e, por outro lado, ajusta a sua área de superfície,

.....
activa e reversivelmente durante o ciclo miccional (Wu 2009). Para realizar a importante função de armazenamento de urina por longos períodos, sem que se altere significativamente a sua composição, o urotélio possui várias propriedades (Lewis 2000):

- Uma relação superfície epitelial/volume de urina mínima, o que limita o movimento passivo de substâncias entre o lúmen e o sangue.
- Uma permeabilidade passiva da membrana apical e das "tight junctions" muito baixa para electrólitos e outras substâncias que, normalmente, ultrapassam as membranas muito facilmente. Em estudos experimentais a permeabilidade da membrana apical era, em cm/s, $5,15 (\pm 0,43) \times 10^{-5}$ para a água; $4,51 (\pm 0,67) \times 10^{-6}$ para a ureia e $2,98 (\pm 1,87) \times 10^{-3}$ para os protões (Negrete et al. 1996).
- Um sistema de absorção de sódio regulado: um movimento passivo de sódio para o sangue é contrabalançado por reabsorção activa.
- Permeabilidade inalterada pelas substâncias do sangue ou da urina.

Embora historicamente o urotélio seja visto primariamente como uma barreira, tem-se acumulado evidência ao longo dos anos de que as células uroteliais estão envolvidas em mecanismos sensoriais, com capacidade para expressar um conjunto de receptores que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Incluem-se receptores para a bradicinina, purinas, noradrenalina, acetilcolina, receptores activados da protease, vanilóides e endocanabinóides (Birder 2005, Gratzke et al. 2009). Para além disso, a libertação de mediadores como o óxido nítrico, ATP, acetilcolina, substância P e prostaglandinas em resposta a esses estímulos sugere que estas células possuem propriedades sensoriais e de sinalização especializadas que permitem uma comunicação recíproca com células vizinhas assim como com nervos ou outras células (imunológicas, miofibroblastos, células inflamatórias) na parede vesical (Birder et al. 2012).

Para manter a estabilidade urotelial, os ciclos celulares são extremamente lentos, com um *turnover* de cerca de 200 dias e um índice de marcação tritium-timidina inferior a 0,01% (Wu 2009).

O crescimento celular está, normalmente, sob o estreito controlo de reguladores da progressão do ciclo celular, positivos (proto-oncogenes e factores de crescimento) e negativos (moléculas indutoras da apoptose e senescência, genes supressores tumorais), o que permite a renovação tecidular sem perturbação da homeostasia. Este equilíbrio não é estático mas dinâmico, especialmente quando as células têm que

.....
responder a diversas agressões. Por exemplo, quando uma mutação activa um oncogene, as células afectadas podem activar os genes supressores tumorais e a senescência, uma forma específica de paragem do crescimento celular, para contra-balançar os efeitos oncogénicos, repondo o controlo do ciclo celular. Falhas neste processo podem levar a proliferação incontrolada e tumorigénese (Sharpless and DePinho 2005, Mo et al. 2007).

4.2. Carcinogénese Urotelial

Os carcinomas uroteliais (ou do epitélio de transição) englobam duas variantes fenotípicas com comportamentos biológicos e prognósticos drasticamente distintos (Wu 2005):

- Os tumores papilares de baixo grau, não invasivos, com origem na hiperplasia simples e papilar, frequentemente multifocais e recidivantes, mas com baixo potencial para a invasão e metastização. Constituem cerca de 80% das neoplasias e se diagnosticados e tratados precocemente por cirurgia endoscópica e terapêuticas intra-vesicais adjuvantes têm sobrevivências aos cinco anos próximas dos 90%. 10 a 15% progridem para formas invasivas.
- Tumores invasivos, sólidos, não papilares e com metastização frequente que surgem de novo ou derivam de *Cis* ou de displasia de alto grau. Uma minoria resulta da progressão de lesões papilares não invasivas. Apesar da cirurgia extirpativa radical e das terapêuticas sistémicas associadas, cerca de metade morre da doença nos dois anos após o diagnóstico (Liebert and Seigne 1996).

Os estudos moleculares, genéticos e epigenéticos confirmam que estas variantes resultam de mecanismos carcinogénicos distintos: a via dupla da carcinogénese vesical (Wu 2005, Spiess and Czerniak 2006, Cheng et al. 2010).

Segundo este conceito, os tumores papilares não-invasivos de baixo grau derivam da via do *fibroblast growth factor receptor 3 gene* (FGFR3) e os tumores invasivos da via do *TP53* (Fig. 6):

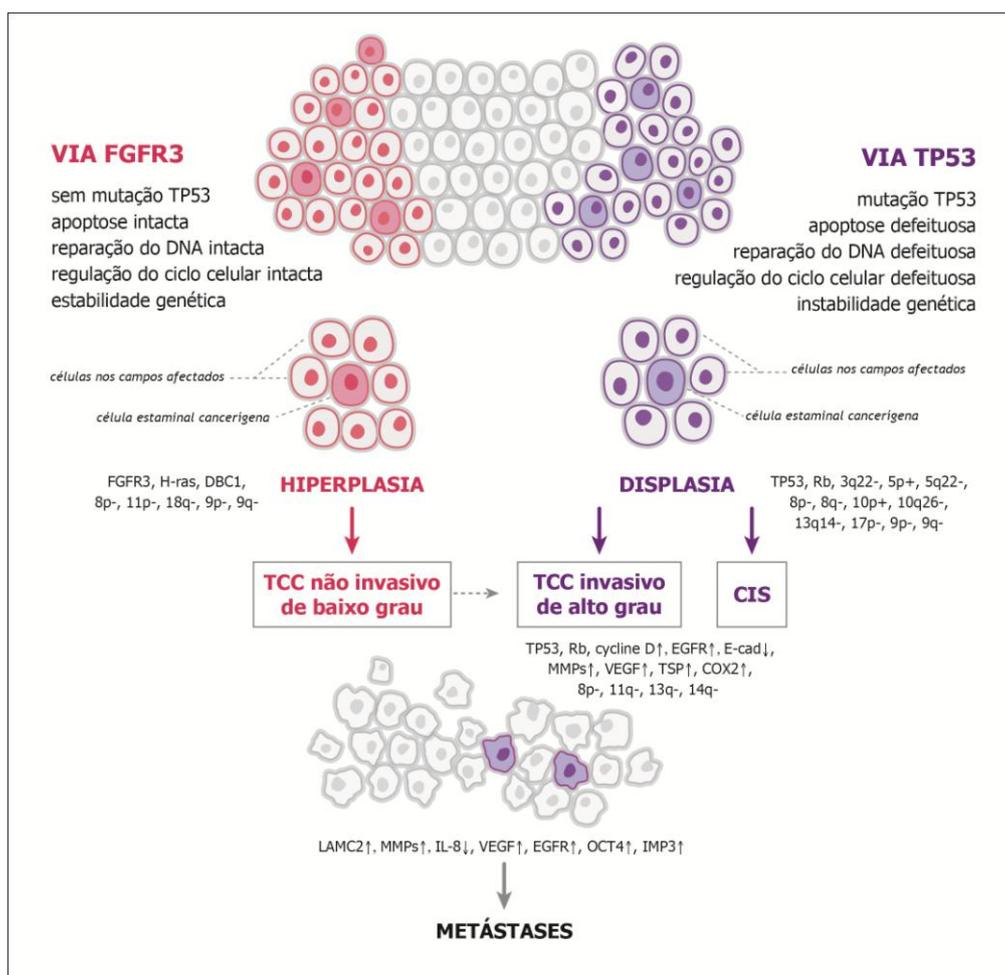


Figura 6: Mecanismos moleculares da via dupla da carcinogénese vesical: adaptado de (Cheng et al. 2010).

Independentemente da via, a moderna carcinogénese sugere que o processo de malignização representa a expansão clonal de uma ou várias células estaminais cancerígenas (CSC) nas áreas afectadas (Davidson and Cheng 2006, Gedye et al. 2010). Estas células constituem 1-4% da população celular viável numa neoplasia, proliferam por diferenciação assimétrica após divisão e podem diversificar-se em linhagens celulares heterogéneas (Cheng et al. 2010). Cada CSC e a sua descendência possuem um conjunto único de características genéticas, epigenéticas e fenotípicas que, nos casos dos tumores de células de transição, podem ser da via do *FGFR3* ou do *TP53* (Wu 2005). Embora populações puras de CSC vesicais ainda não tenham sido isoladas, vários investigadores reportaram putativas populações de células estaminais. Quando os tumores surgem nestas CSC, é essencial um microambiente específico para a contínua expansão clonal e alterações nas células somáticas contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral (Jones et al. 2005). As CSC e as células filhas adquirem

.....
vantagem proliferativa e a subsequente expansão clonal desloca gradualmente o urotélio normal, o denominado processo de cancerização do terreno ("*field cancerization*") (Braakhuis et al. 2003).

Estudos de mapeamento genómico sugerem que alguns eventos moleculares são comuns às vias papilar e não papilar da carcinogénese e podem mesmo preceder as alterações histológicas (Czerniak et al. 2000, Kim et al. 2005).

A deleção do cromossoma 9 é a alteração genética mais frequente e é um evento precoce no processo de malignização, não distinguindo os dois fenótipos da tumorigénese vesical (Wu 2005). É possível que aberrações desse cromossoma predisponham as células uroteliais afectadas a alterações genéticas mais profundas. Outra possibilidade é a de que as regiões suprimidas (9p-/9q-) contenham genes supressores tumorais. Por exemplo, o gene *CDKN2A* reside no locus 9p21 e codifica dois produtos, *INK4A* e *ARF*, que induzem paragem do ciclo celular. Outro gene candidato é o *TSC1*(9q34) (Sherr 2001, Mhawech-Fauceglia et al. 2008).

A via do *FGFR3* está associada à hiperplasia papilar e aos tumores papilares uroteliais não invasivos e de baixo grau. O *FGFR3* é um receptor de tirosina cinase crucial para o desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação e proliferação celulares bem como para a angiogénese (Ornitz and Itoh 2001). Mais de 70% dos tumores uroteliais não invasivos têm mutações de *FGFR3*, implicando-a fortemente como um dos eventos chave, contra apenas 10-20% dos tumores invasivos (Bakkar et al. 2003, van Rhijn et al. 2004). Para além do carcinoma de células de transição, foi reconhecido um papel oncogénico do *FGFR3* mutante no mieloma múltiplo e no carcinoma do colo uterino. As mutações identificadas resultam em substituições de aminoácidos em localização extracelular, transmembranar e/ou citoplasmática, levando a activação aumentada e prolongada do receptor (Cappellen et al. 1999). Vários estudos indicam que o papel oncogénico do *FGFR3* activado é mediado pela via de sinalização do receptor de tirosina cinase (*RTK*)-*Ras*. Esta via desempenha um papel central na proliferação e renovação de células epiteliais pela transdução de sinais mitogénicos da superfície celular para o núcleo (Fig. 7). O *FGFR3* está ligado ao *Ras* através da *growth factor receptor-bound protein2* (*GRB2*), comum também à via *RTK* (Shahbazian et al. 2012).

H-Ras foi o primeiro oncogene identificado nos carcinomas uroteliais (Gschwind et al. 2004) e estudos recentes indicam que as mutações *H-Ras* ocorrem em 30-40% dos tumores (Dinney et al. 2004). Um outro mecanismo de activação deste gene consiste na sua sobreexpressão,

observada em mais de metade dos carcinomas uroteliais, uma frequência maior que as mutações (Ye et al. 1993). Coexistem em cerca de 10% dos casos.

O papel exacto do *H-Ras* na tumorigénese urotelial permanece pouco claro. A sua activação num modelo experimental de ratinho transgénico induziu uma rápida proliferação celular e a hiperplasia urotelial evoluiu para tumores papilares não invasivos e de baixo grau, semelhantes aos observados no humano (Zhang et al. 2001). O oncogene era expresso em todas as camadas, incluindo a basal, onde se pensa residirem as células estaminais.

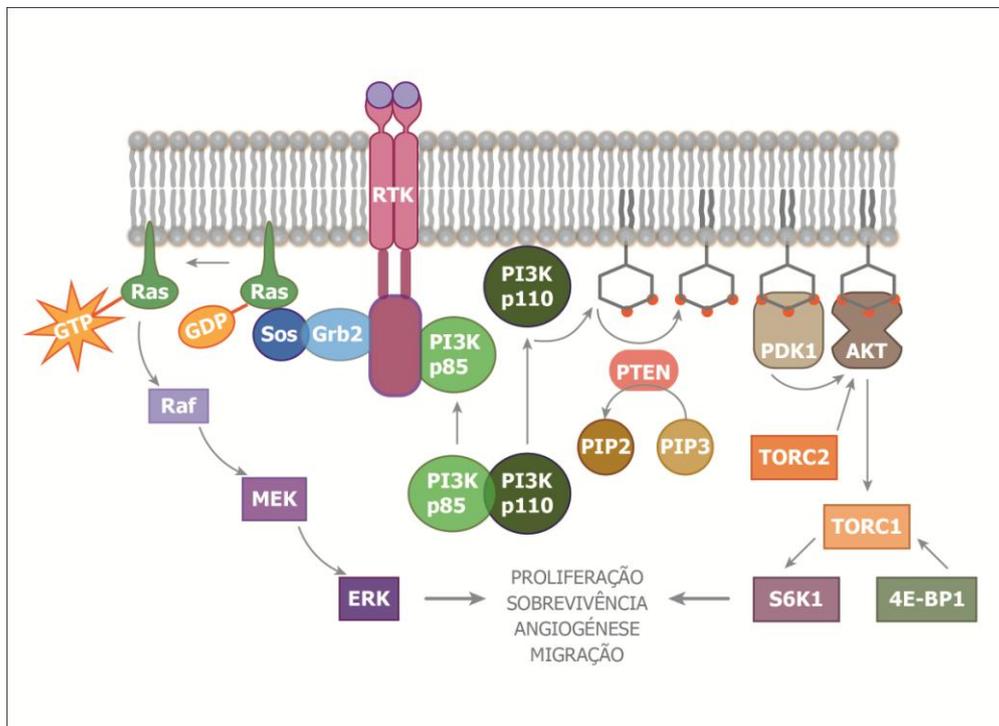


Figura 7: A via de sinalização *RTK-Ras*: adaptado de (Shahbazian et al. 2012).

O facto de as mutações *H-Ras* e *FGFR3* ocorrerem, respectivamente, em cerca de 30 e 70% dos tumores papilares não invasivos e de baixo grau indica fortemente que estes dois genes são responsáveis pela génese da esmagadora maioria desta variante tumoral (Wu 2005). Curiosamente, as duas mutações raramente coexistem, o que provavelmente reflecte a sua equivalência funcional (Jebar et al. 2005).

Os defeitos combinados dos genes *TP53* e retinoblastoma (*Rb*) têm sido associados aos carcinomas uroteliais músculo-invasivos (Shariat et al. 2004). Cerca de 50% destes têm simultaneamente mutações de *p53* e expressão aberrante da *pRb* e estas duas alterações têm sido associadas de forma mais significativa a mau prognóstico do que cada uma delas

isoladamente. Contudo, estudos demonstram que a deficiência de *p53* *per se*, à semelhança da de *pRb*, não é tumorigénica no contexto urotelial. Os defeitos concomitantes destes dois genes supressores tumorais são necessários mas não suficientes para iniciar carcinomas uroteliais invasivos (He et al. 2009).

O *p53* é um gene supressor tumoral com um papel chave no cruzamento de complexas redes de sinalização celular (Fig. 8). Aberrações na sua expressão desempenham uma acção primordial na oncogénese vesical, resultando em perda de controlo sobre a apoptose e proliferação celular e sobre a transcrição de genes envolvidos na identificação da lesão do DNA (Vogelstein et al. 2000).

Com um papel essencial no controlo da progressão *G1/S* do ciclo celular, o *p53* é indispensável para manter o crescimento urotelial equilibrado, contribuindo os seus defeitos estruturais e funcionais, que se encontram em mais de 50% dos tumores invasivos de alto grau e no *Cis*, mas raramente nos superficiais de baixo grau, para a instabilidade genómica.

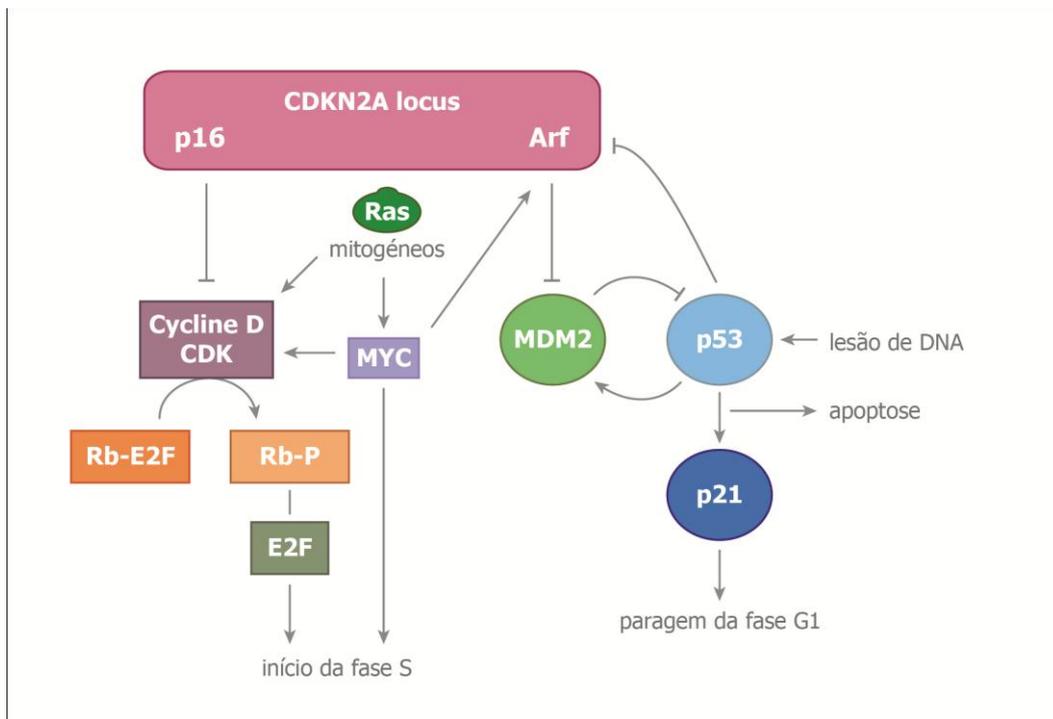


Figura 8: Representação esquemática das vias *p53* e *Rb*: adaptado de (Knowles 2007).

As mutações de *TP53* afectam inicialmente um alelo, seguindo-se a perda do segundo, o que perturba completamente a sua função enquanto gene supressor tumoral (Cordon-Cardo 2008). Consistente com isto, a expressão de *p21*, também conhecida como *WAF1*, um importante alvo

.....
situado a jusante de *p53*, está subregulada na maioria dos carcinomas uroteliais portadores de mutações *TP53*, associando-se a progressão da doença e menor sobrevivência (Lu et al. 2002). A hiperexpressão da oncoproteína MDM2 constitui um mecanismo de inativação não mutacional de *p53*, levando à sua degradação mediada pela ubiquitina (Piette et al. 1997). Embora a disfunção de *p53* seja uma assinatura identificadora da variante tumoral invasiva e possa ter um papel importante na progressão, pouco se sabe sobre o seu papel na iniciação dos carcinomas uroteliais.

O gene do retinoblastoma (*Rb*) é prevalente nos carcinomas uroteliais e primariamente associado à variante invasiva. Tem influência em diversas funções directamente envolvidas na carcinogénese: no desenvolvimento, proliferação, diferenciação e metabolismo das células, no controlo do ciclo celular e na sinalização intra-celular, na resposta à lesão do DNA, na senescência e apoptose. Discute-se ainda o seu papel nas células estaminais e células estaminais carcinogénicas (Takahashi et al. 2012). A *pRb* previne a progressão do ciclo celular urotelial, mantendo o seu crescimento e proliferação a um mínimo. Uma *pRb* disfuncional é incapaz de inibir a família de factores de transcrição *E2F*, levando a um aumento da proliferação celular (Fig. 8) (Calzone et al. 2008). Contudo, as células uroteliais dispõem de mecanismos de fuga à tumorigénese durante a deficiência de *Rb*, o que sugere a ocorrência de outros eventos para que se dê o processo de malignização (He et al. 2009).

A recidiva, progressão e metastização tumoral resultam da aquisição de alterações genéticas adicionais, incluindo deleções dos braços curtos dos cromossomas 3, 8, 11 e 13 e dos braços longos dos cromossomas 13 e 14 (Cheng et al. 2010).

Deleções 17p também foram associadas a progressão tumoral, presumivelmente devido à perda do gene *TP53* que lhe está associada.

É claro, contudo, que a iniciação e progressão tumorais não dependem apenas dos factores genéticos intrínsecos das células neoplásicas mas também do microambiente tumoral (van der Horst et al. 2012). A perda da adesão celular, uma maior degradação da matriz extra-celular, uma angiogénese aumentada e uma hiperexpressão de ciclooxygenase 2 (*Cox-2*) são características essenciais nesse processo.

4.3. Multifocalidade Tumoral

O desenvolvimento de lesões multifocais, quer síncronas quer metácronas, é uma característica dos tumores uroteliais (Jones et al.

.....

2005). Duas teorias procuram explicar esta multifocalidade. A teoria monoclonal sugere que os múltiplos tumores surgem de uma única célula transformada que prolifera e se propaga através do urotélio por implantação intraluminal ou por migração intraepitelial. A teoria policlonal, por sua vez, considera que a multicentricidade é secundária ao efeito de cancerização do terreno, em que os carcinogénios causam alterações genéticas independentes em diferentes locais do urotélio, levando a múltiplos tumores geneticamente distintos (Cheng et al. 2010). Não há consenso sobre a origem monoclonal ou policlonal destas neoplasias, embora a cancerização do terreno seja encontrada na maioria dos casos. Um estudo recente sugere mesmo que ambas possam coexistir no mesmo doente (Jones et al. 2005). Também foi sugerido que a origem policlonal seja mais comum nas lesões iniciais, que surgiriam de clones geneticamente distintos. A subsequente propagação tumoral levaria ao crescimento preferencial de um dos clones e a uma "pseudo" monoclonalidade (Simon et al. 2001, Hafner et al. 2002).

5. Aspectos Clínicos

5.1. Manifestações Clínicas e Diagnóstico

A manifestação clínica mais comum no carcinoma vesical é a hematuria indolor, que ocorre em cerca de 85% dos doentes, embora praticamente todos aqueles com doença macroscopicamente visível tenham pelo menos hematuria microscópica se se analisarem várias amostras de urina, em períodos temporais distintos (Messing and Vaillancourt 1990). A hematuria macroscópica total é o sinal de alarme mais frequente e sugestivo deste tumor, embora outras formas de hematuria não o excluam.

As queixas miccionais de armazenamento ou irritativas, frequência, urgência e disúria, são a segunda manifestação clínica mais comum, estando frequentemente associadas ao *Cis* ou ao carcinoma invasivo. Outros sinais e sintomas, como a dor no flanco, dores abdominais ou ósseas, edema dos membros inferiores, perda de peso e deterioração do estado geral são uma forma mais incomum de apresentação inicial, sendo tradutores de doença localmente avançada ou metastática (Kirkali et al. 2005). As formas não invasivas da doença não se traduzem habitualmente por alterações no exame físico, embora a palpação bimanual possa detectar massas pélvicas nos tumores invasivos.

.....
Independentemente de outros exames justificados pela clínica para o correcto esclarecimento dos diagnósticos diferenciais, a cistoscopia, flexível ou rígida, habitualmente realizada em ambulatório, está indicada em todos os doentes com suspeita de neoplasia vesical, não podendo ser substituída pela citologia urinária ou outros exames não invasivos. Contudo, nos casos em que os exames imagiológicos são inequívocos no diagnóstico deste tumor, ela pode ser realizada no bloco operatório, imediatamente antes da ressecção endoscópica (Burger et al. 2012).

O estudo citopatológico da urina ou do lavado vesical, habitualmente referido simplesmente como citologia urinária, está recomendada a todos os doentes com suspeita de neoplasia vesical (Kamat et al. 2012), sendo a colheita frequentemente feita no momento da cistoscopia. Uma citologia positiva pode indicar um tumor urotelial em qualquer parte do tracto urinário. A interpretação depende muito do observador e pode ser dificultada por escassez de células, infecções urinárias, cálculos ou instilações intravesicais prévias (Lokeshwar et al. 2005). Uma meta-análise de 36 estudos referiu uma sensibilidade de 44% e uma especificidade de 96% para a citologia (Mowatt et al. 2010) e o valor preditivo positivo é de cerca de 90% (Planz et al. 2005). Para além de auxiliar no diagnóstico, a citologia urinária pode ter algum valor preditivo. A sensibilidade é maior nos carcinomas de alto grau e, sobretudo, no *Cis*, onde pode atingir os 90%, devido à perda da coesão celular e maior grau de anaplasia. Pelo contrário, anda entre os 4 e os 31% nos de baixo grau (Lotan and Roehrborn 2003).

Vários outros marcadores urinários foram comercializados na tentativa de melhorar a sensibilidade da citologia urinária, não se tendo ainda provado de forma inequívoca a sua utilidade e fiabilidade (Tilki et al. 2011).

A ecografia é usada como exame imagiológico inicial na avaliação do aparelho urinário em casos de hematúria ou suspeita de tumor vesical. Para além do diagnóstico de massas vesicais, permite detectar hidronefrose ou alguns tumores do urotélio alto, embora não seja o melhor exame para este fim. A incidência de tumores do urotélio alto é baixa (1,8%) mas aumenta (7,5%) na presença de tumores do trígono vesical (Palou et al. 2005).

Numa avaliação inicial, não são necessários, por regra, estudos imagiológicos adicionais. Contudo, pode estar indicada a realização de uma tomografia axial computadorizada ou de uma ressonância magnética para um correcto estadiamento de um carcinoma vesical clinicamente

.....
avançado ou músculo invasivo no estudo anátomo-patológico (Kamat et al. 2012).

A realização de outros exames, como o cintigrama ósseo ou a tomografia de emissão de positrões, pode ter indicação em casos muito particulares.

Os tumores são estadiados usando o sistema de classificação TNM (Sobin LH 2009) e a classificação dos tumores uroteliais proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) em 1998 (Epstein et al. 1998) e publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2004 (Sauter G et al. 2004) (ver apêndices 1 e 2).

5.2. Tratamento

A abordagem inicial de um tumor vesical (TV) consiste na sua ressecção endoscópica transuretral (RTU) e tem vários objectivos (Babjuk et al. 2011):

- Terapêutico, removendo, se possível, todas as lesões visíveis em extensão e profundidade. Uma RTU tecnicamente correcta, que inclua músculo detrussor, é essencial para se conseguirem bons resultados.
- Diagnóstico anátomo-patológico, incluindo a determinação do grau tumoral.
- Estadiamento, distinguindo os tumores não músculo-invasivos (Ta/T1) dos músculo invasivos (\geq T2).

Uma segunda ressecção deve ser considerada se a primeira for incompleta, não permitir um estadiamento adequado ou nos tumores T1 ou de alto grau (Divrik et al. 2010).

Os tumores não músculo-invasivos Ta/T1, que constituem mais de 75% do total, têm altas taxas de recidiva e de progressão e a forma clássica de categorizar os doentes consiste em dividi-los em grupos de risco, com base em factores de prognóstico derivados de análises multivariadas (Brausi et al. 2011).

Para prever o risco individual de recidiva e progressão, a *European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)* desenvolveu um sistema de pontuação e tabelas de risco (Sylvester et al. 2006).

Este sistema baseia-se nos seis factores clínicos e patológicos mais significativos: número e tamanho dos tumores, taxa de recidiva prévia, categoria T, presença de *Cis* concomitante e grau tumoral (Quadro 2).

Factor	Recidiva	Progressão
N.º Tumores		
1	0	0
2-7	3	3
≥8	6	3
Diâmetro tumoral		
<3 cm	0	0
≥3 cm	3	3
Taxa de recidiva prévia		
Primário	0	0
≤1/ano	2	2
1 /ano	4	2
Categoria		
Ta	0	0
T1	1	4
Cis		
Não	0	0
Sim	1	6
Grau		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
TOTAL	0-17	0-23

Quadro 2: Factores de risco e sistema de pontuação da EORTC (Sylvester et al. 2006).

De acordo com a pontuação obtida, é possível estratificar os doentes em grupos de risco baixo, intermédio ou alto, quanto à recidiva ou progressão (Quadro 3):

Pontuação	Recidiva 1 ano		Recidiva 5 anos		Grupo de risco
	%	(95% IC)	%	(95% IC)	
0	15	(10-19)	31	(24-37)	Baixo
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)	Intermédio
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)	Intermédio
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)	Alto
	Progressão 1 ano		Progressão 5 anos		
	%	(95% IC)	%	(95% IC)	
0	0,2	(0-0,7)	0.8	(0-1,7)	Baixo
2-6	1	(0,4-	6	(5-8)	Intermédio
7-13	5	1,6)	17	(14-20)	Intermédio
14-23	17	(4-7)	45	(35-55)	Alto
		(10-24)			

Quadro 3: Grupos de risco quanto à recidiva e progressão (Sylvester et al. 2006).

.....
Em todos os doentes está indicada, no pós-operatório imediato à ressecção endoscópica, uma instilação intra-vesical única de agente de quimioterapia (Oosterlinck et al. 2011), geralmente mitomicina C, excepto se houver um risco aumentado de absorção sistémica e complicações, como em casos de hematúria macroscópica, grande superfície de ressecção, perfuração vesical ou em situações de RTU incompleta ou suspeita de doença invasiva (Oddens et al. 2004). Os resultados de uma meta-análise de sete estudos demonstraram que esta instilação intra-vesical reduz o risco relativo de recidiva em 24,2%, essencialmente em tumores únicos e primários (Sylvester et al. 2004), benefícios confirmados em estudos mais recentes (Gudjonsson et al. 2009).

Nos doentes com baixo risco de recidiva ou progressão não são necessários tratamentos intra-vesicais adicionais.

Nos restantes, a administração única é insuficiente dada a alta incidência de recidiva ou progressão, tornando-se necessárias mais instilações intravesicais. A escolha entre quimioterapia ou imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) depende do principal risco que precisa de ser reduzido, a recidiva ou a progressão.

Várias meta-análises mostraram que a quimioterapia intravesical diminui o risco de recidiva, que pode chegar aos 38% e 70%, ao fim de um e três anos de seguimento, mas não de progressão (Huncharek et al. 2000, Huncharek et al. 2001, Babjuk et al. 2011). Ainda é controversa a duração e frequência das instilações de quimioterapia mas a evidência disponível não defende esquemas superiores a um ano e um tratamento intensivo nos primeiros três a quatro meses parece ser tão eficaz como esquemas mais longos (Sylvester et al. 2008).

Numa meta-análise que avaliou dados de 2820 doentes de nove estudos, o tratamento com BCG em esquemas de manutenção superiores a um ano associava-se a uma redução do risco de recidiva tumoral de 32%, quando comparado com a mitomicina C, enquanto que o BCG sem esquema de manutenção era menos eficaz (Malmstrom et al. 2009). Os dados também demonstram que o tratamento com BCG previne ou pelo menos atrasa o risco de progressão tumoral, podendo a redução chegar aos 27% (Sylvester et al. 2002, Suttman et al. 2004). Assim, embora o tratamento com BCG seja superior nos doentes com risco intermédio e alto de recidiva ou nos doentes com risco intermédio de progressão, tem mais efeitos secundários que a mitomicina C. Por isso, quer a quimioterapia quer a imunoterapia intravesical são opções (Sylvester 2009). Nos doentes de alto risco de progressão deve optar-se pelo BCG com esquema de manutenção superior a um ano (Babjuk et al. 2011).

.....
O *Cis* é um factor de risco para recidiva, progressão e mortalidade específica nos tumores não músculo-invasivos, devendo por isso ser abordado e vigiado de forma agressiva (Palou et al. 2012). O *BCG* aumenta as taxas de resposta completa, a percentagem de doentes que fica livre da doença e reduz o risco de progressão.

Nos doentes com alto risco de progressão, especialmente nos T1 de alto grau com *Cis* associado e nos casos de falência ao *BCG*, a cistectomia radical imediata deve ser considerada (Babjuk et al. 2011). Nos casos em que a ressecção endoscópica completa não é possível, a cirurgia radical também está indicada.

Devido ao risco de recidiva e progressão, os doentes com tumores Ta/T1 necessitam de ter um seguimento adaptado ao seu risco individual, de acordo com o sistema de pontuação e as tabelas de risco anteriormente apresentadas.

Dado não existir nenhum método não invasivo com sensibilidade e especificidade suficientemente elevada, o seguimento baseia-se em cistoscopias regulares, de acordo com o quadro 4:

Seguimento recomendado

Doentes com baixo risco de recidiva e progressão devem fazer cistoscopia aos 3 meses após RTU-TV. Se negativa, a seguinte deve ser realizada aos 9 meses e depois anualmente até aos 5 anos.

Doentes com alto risco de progressão e os doentes com *Cis* devem fazer cistoscopia e citologia urinária aos 3 meses após RTU-TV. Se ambas forem negativas, este procedimento deve ser repetido cada 3 meses até aos 2 anos, cada 6 meses até aos 5 anos e anualmente depois disso. Recomenda-se controlo imagiológico anual do aparelho urinário superior.

Doentes com risco intermédio de progressão devem ter um seguimento situado entre os dois anteriores, adaptado a factores individuais e subjectivos.

Quadro 4: Recomendações para o seguimento de doentes com tumores TaT1 após a RTU-TV (Babjuk et al. 2012).

Os carcinomas uroteliais músculo-invasivos requerem uma abordagem mais agressiva e multimodal. A cirurgia continua a ser a opção terapêutica de eleição nestes doentes (Stenzl et al. 2011) e consiste na cistectomia radical, com linfadenectomia ileo-pélvica e derivação urinária, sendo a ureteroileostomia cutânea e a reconstrução vesical ortotópica as técnicas mais comuns. É uma cirurgia altamente agressiva e publicações recentes de centros de elevado volume operatório mostram que as taxas de complicações precoces, até aos três meses do pós-operatório, podem chegar aos 54-58%, as complicações *major* podem ocorrer em mais de 40% dos casos e com taxas de mortalidade de 3% no

.....
mesmo período temporal (Novara et al. 2009, Hautmann et al. 2010, Svatek et al. 2010). Se adicionarmos a ocorrência de complicações tardias em 40,8% dos casos, temos uma ideia fiel da elevada morbidade deste procedimento, sem incluir as alterações da auto-imagem corporal e perturbações graves da qualidade de vida em todas as suas componentes (Hautmann et al. 2011).

Em dois grandes centros, com mais de 1000 doentes operados em cada um, as sobrevivências globais aos 5, 10 e 20 anos foram de 60-68%, 43-49,8% e 28,3% respectivamente. Na presença de extensão extra-vesical, a sobrevivência aos 10 anos desceu para os 22% e com invasão ganglionar para os 17% (Stein et al. 2001, Hautmann et al. 2011). Em resultado de aumentos da sobrevivência global aos 5 anos de 5-8%, a quimioterapia neoadjuvante, à base de cisplatina, deve ser considerada (Sherif et al. 2004, Advanced Bladder Cancer Meta-analysis 2005). A radioterapia e a quimioterapia adjuvante não são opções de 1.^a linha mas podem ter indicação em casos seleccionados (Stenzl et al. 2011). Na doença metastática, as sobrevivências não ultrapassam os 12-14 meses (Calabro and Sternberg 2012). Os cuidados paliativos devem ser uma prioridade nas formas avançadas da doença.

6. Aspectos Económicos

O tratamento do cancro da bexiga tem custos económicos elevados mesmo que não se considerem as perdas associadas ao absentismo laboral e à diminuição de anos de vida. Tem aliás, os mais elevados custos por tratamento entre todos os cancros, à frente do colo-rectal, mama, próstata e pulmão (Sievert et al. 2009). Nos EUA, em termos de custos globais, ocupa o quinto lugar, com 3,4 biliões de dólares (\$), dos quais 2,9 biliões relacionados com o tratamento (Brown et al. 2002, Botteman et al. 2003). Dependendo do país, o custo do cancro da bexiga por doente, desde o diagnóstico até à morte, varia entre os \$89 287 e os \$202 203 e esse valor irá aumentar com a melhoria das sobrevivências.

Em Espanha, no ano de 2008, o custo do tratamento do cancro da bexiga de etiologia ocupacional foi superior a 26 milhões de euros (€), dos quais perto de 17 milhões em cuidados hospitalares, mais de 600 mil em cuidados de saúde primários e perto de nove milhões em custos de farmácia (Garcia Gomez et al. 2012). O custo médio por internamento, com duração de cerca de sete dias, foi de 4 276,39 € no homem e de 3 984,86 € na mulher e o custo médio para uma consulta em ambulatório foi de 434,83 € no homem e de 444,7 € na mulher.

.....
A ressecção endoscópica, incluindo o procedimento e a estadia hospitalar, representa a maior parcela dos custos associados ao tratamento, com variações em vários países europeus, desde os \$1 124 em França até aos \$2 967 na Alemanha (Grasso 2008). Os custos no Japão são similares, \$2 428, mas são mais elevados nos EUA, \$3 453 (Uchida et al. 2007).

Usando os dados de 10 856 doentes submetidos a cistectomia radical em 1 175 hospitais dos EUA, o custo total por doente foi de \$26 306 na ausência de complicações e de \$54 242 quando estas ocorreram (Kim et al. 2012). Na Europa os valores são mais baixos, variando entre os \$5 684 no Reino Unido e os \$20 507 na Alemanha (Grasso 2008).

Os custos vão para além do tratamento. No seguimento de 200 doentes com antecedentes de tumor não invasivo da bexiga no *MD Anderson Cancer Center*, da Universidade do Texas, o custo médio por recidiva tumoral diagnosticada foi de \$7 692 quando se usava apenas a cistoscopia, \$11 846 quando se associava a citologia, subindo para os \$26 462 quando se combinava a cistoscopia e a *fluorescence in situ hybridization (FISH) UroVysion®* (Kamat et al. 2011).

Os estudos mostram que, ao contrário do que a intuição nos poderia sugerir, o diagnóstico, tratamento e seguimento dos doentes com carcinoma da bexiga segundo as melhores linhas de recomendação, se associa não só a melhores resultados clínicos mas também a poupanças de custos (Sievert et al. 2009). Por exemplo, Uchida mostrou que, apesar do custo médio adicional de \$1 936 associado ao tratamento com *BCG*, o aumento da sobrevivência livre de recidiva aos 5 anos, de 28 para 78%, com a consequente redução de novas cirurgias e internamentos, permite uma poupança anual de \$525 por doente (Uchida et al. 2007). Cálculos semelhantes feitos em doentes tratados com quimioterapia intravesical adjuvante sugerem poupanças de \$66 882 por cada 100 novos doentes com carcinoma não músculo-invasivo (Botteman et al. 2003).

Apesar disso, a alocação de recursos para a investigação deste cancro não é proporcional ao seu custo social e financeiro, quando comparada com outras neoplasias. Nos EUA verificou-se mesmo uma redução do investimento do *National Cancer Institute* na investigação em cancro da bexiga de 35,5 milhões de dólares em 2003 para 19,8 milhões em 2007 enquanto, no mesmo período temporal, o investimento total em investigação em cancro aumentou de 4,6 para 4,8 biliões de dólares (Sievert et al. 2009).

7. Carcinoma Urotelial da Bexiga:

7.1. Ponto da Situação

O carcinoma urotelial da bexiga é ainda hoje, em pleno século XXI, um importante problema de saúde pública. Da leitura do atrás exposto, podemos identificar vários pontos ainda não resolvidos:

1. É um tumor com incidência elevada no sexo masculino, sobretudo nos países desenvolvidos, sendo o 4.º mais frequente na América do Norte e União Europeia. Em Portugal também ocupa um lugar de destaque, surgindo a seguir às neoplasias da próstata, colórectal, pulmão e estômago. Em 2008, de acordo com dados do GLOBOCAN, foram diagnosticados 382.660 novos casos em todo o mundo e tem-se verificado um aumento na sua incidência. Devido à elevada taxa de recidivas e longas sobrevivências nas formas não músculo-invasivas é um dos tumores mais prevalentes nos homens de meia-idade e idosos.
2. Os factores de risco são quase exclusivamente exógenos, sendo o tabagismo o mais importante, seguido da exposição ocupacional a amins aromáticas. Embora a prevalência do tabagismo no sexo masculino nas últimas décadas tenha diminuído substancialmente, não houve um decréscimo equivalente na incidência destes tumores. Aparentemente, este benefício da redução do consumo é anulado pela alteração da composição química dos cigarros, com aumento da concentração de carcinogénios específicos, como a β -naftilamina, 4-aminobifenil e outras nitrosaminas. Por outro lado, houve um aumento do consumo de tabaco nas mulheres, com o consequente acréscimo do risco de carcinoma vesical especificamente atribuído ao tabagismo que há três décadas era de 20-30% e actualmente ultrapassa os 50%, sem diferenças com o sexo masculino.
3. Apesar dos avanços científicos obtidos neste campo, o processo da carcinogénese vesical ainda não está totalmente esclarecido e resulta provavelmente de uma combinação da exposição a carcinogénios exógenos e de um grande número de genes de susceptibilidade que podem não levar intrinsecamente a carcinoma vesical mas conferir, por exemplo, um risco adicional à exposição. Uma ou várias células estaminais progenitoras adquirem características malignas e sofrem expansão clonal. Sob a influência de um microambiente específico dá-se o

.....

desenvolvimento e a progressão tumoral, ao longo de um período temporal longo, que pode ser de décadas. Alguns eventos moleculares, como a deleção do cromossoma 9 ocorrem precocemente e antecedem o processo da via dupla da carcinogénese vesical. Segundo este conceito, vias moleculares, genéticas e epigenéticas distintas dão origem a duas variantes tumorais fenotípicas diferentes: os tumores papilares não-invasivos de baixo grau derivam da via do *fibroblast growth factor receptor 3 gene* (FGFR3) e os tumores invasivos da via do TP53. Contudo, há ainda muitos mecanismos mal explicados e desconhecidos.

4. Os tumores papilares de baixo grau, não invasivos, que constituem 75-80% das neoplasias vesicais, embora possuam baixo potencial para a invasão e metastização, e se consigam sobrevivências aos cinco anos próximas dos 90% se diagnosticados e tratados de forma adequada, têm altas taxas de recidiva, que podem atingir os 84% aos cinco anos e até 55% podem progredir a formas mais agressivas. Isto tem diversas consequências:

- A indicação, para além da ressecção endoscópica inicial, para terapêuticas intravesicais adicionais, que por vezes se prolongam por mais de um ano, de forma a reduzir o risco de recidiva e progressão. Esses tratamentos adjuvantes não são isentos de efeitos secundários e implicam a deslocação regular dos doentes às instituições de saúde com as consequentes limitações em termos pessoais e profissionais.
- A necessidade de estratificar os doentes em função do risco de recidiva e progressão. O actual sistema de pontuação e tabelas de risco da *EORTC*, baseado em factores clínicos e patológicos, apresenta algumas limitações e justifica-se o estudo de novos marcadores de prognóstico de forma a aumentar a capacidade de predizer *ab initio* quais os tumores com maior potencial de malignidade e que, por isso, requerem uma intervenção mais agressiva.
- Um seguimento regular e prolongado dos doentes, de acordo com a estratificação de risco atrás referida, para diagnosticar e tratar precocemente recidivas e progressões tumorais. Apesar do interesse da citologia urinária neste contexto, não existe nenhum método não invasivo com sensibilidade e especificidade suficientemente elevadas e o seguimento baseia-se ainda em cistoscopias regulares. Trata-se de um exame invasivo e que requer a deslocação do doente a estruturas hospitalares,

.....
impondo-se a descoberta de marcadores não invasivos, idealmente urinários, que possam ser usados de forma fiável no diagnóstico de tumores vesicais.

5. Os tumores músculo-invasivos requerem tratamentos agressivos, frequentemente multimodais, baseados em cirurgias mutilantes, com complicações precoces que podem ultrapassar os 50% e taxas de mortalidade de 3%, associadas a alterações graves da auto-imagem corporal e da qualidade de vida. Apesar disso, mesmo nos melhores centros, as sobrevivências globais aos 5 anos andam na ordem dos 60% e aos 10 anos não ultrapassam os 50%, sendo muito inferiores na presença de extensão extra-vesical. Não obstante os refinamentos técnicos conseguidos e a melhoria dos cuidados de suporte à quimioterapia, não tem havido melhorias significativas nos resultados do tratamento destes tumores.

7.2. Propostas de Contributo Pessoal

A adopção de estratégias preventivas pode, potencialmente, ter um impacto enorme na redução das gravosas consequências pessoais, sociais e económicas desta neoplasia, assumindo a quimioprevenção um papel de destaque nesta área. Contudo, a sua implementação prática com sucesso exige uma investigação prévia que inclua:

- Uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos patológicos da carcinogénese urotelial, nomeadamente da dupla via de malignização, permitindo uma melhor identificação dos doentes que mais beneficiariam da quimioprevenção farmacológica, isto é, aqueles com maior risco de desenvolverem tumores da bexiga, quer de novo, quer recidivas.
- A identificação dos fármacos com maior capacidade preventiva, em função dos mecanismos de acção mais adaptados à carcinogénese urotelial.

Em face disto, propusemo-nos desenvolver um trabalho de investigação experimental que pudesse trazer algum contributo, mesmo que modesto, a esses dois pontos, e que incluiu o estudo de:

- Mecanismos patológicos e
- Prevenção farmacológica da carcinogénese urotelial.

CAPÍTULO II

CARCINOMA DA BEXIGA:

ESTUDO EXPERIMENTAL

Introdução

O carcinoma da bexiga é um dos mais prevalentes no Mundo Ocidental. Embora 75-80% não sejam invasivos e apresentem altas taxas de sobrevivência, têm um elevado risco de recidiva e uma proporção significativa progride a formas mais invasivas (Brausi et al. 2011). Essa natureza recorrente, justificando terapêuticas adjuvantes e seguimento por longos anos em estruturas hospitalares especializadas, associada aos tratamentos multimodais e agressivos das formas invasivas, com alta morbilidade e mortalidade, torna-o um dos cancros com mais elevados custos pessoais, sociais e financeiros (Lattouf 2009). Métodos eficazes na prevenção de recidivas teriam um papel de destaque na abordagem desta neoplasia e tornam-se cada vez mais necessários.

Várias características fazem do cancro da bexiga uma doença adequada para a adopção de estratégias de prevenção em geral e de quimioprevenção em especial (Leppert et al. 2006, La Rochelle et al. 2008):

- A sua localização anatómica, que permite avaliar eficazmente o sucesso dessas estratégias com recurso à realização de cistoscopia.
- A obtenção de urina de forma não invasiva, para uma pesquisa fácil de células neoplásicas pela citologia convencional ou através de novos marcadores.
- A história natural policronotrópica das formas não invasivas que necessita de ser minimizada.

Para além disso, algumas das suas particularidades etiopatogénicas poderiam ser exploradas no sentido positivo:

- A existência de factores de risco conhecidos, como o tabagismo e a exposição ocupacional, que poderiam ser eliminados. Daqui decorre igualmente a identificação de uma população-alvo de susceptibilidade aumentada, destinatária primordial da prevenção.
- A função de armazenamento, que está na base do processo da tumorigénese vesical devido ao contacto prolongado de agentes carcinogénicos com o urotélio, poderia ser utilizada para a exposição directa e prolongada desse mesmo urotélio a agentes anti-carcinogénicos de excreção renal ou administração intravesical.

-
- A própria carcinogénese vesical, duradoura no tempo, com múltiplos eventos bioquímicos e moleculares e o processo de cancerização do terreno, oferecem janelas de oportunidade amplas e diversas para a adopção de estratégias preventivas.

Foram definidos três tipos de prevenção:

1. Primária, que consiste em evitar o desenvolvimento do cancro em pessoas saudáveis. A aplicação de estratégias de prevenção numa população sem doença, embora conceptualmente interessante, torna-se não só difícil de implementar na prática como tem uma relação benefício versus custo/inconveniente bastante baixa (Lattouf 2009). Apesar disso, a informação da população em geral sobre a doença e os seus factores de risco, recorrendo aos meios de difusão disponíveis, são importantes porque, ao contrário de outras neoplasias, o conhecimento e o alerta sobre o cancro da bexiga são escassos (Brausi 2012). Felizmente existem factores de risco conhecidos, sendo o tabaco e as exposições ocupacionais os mais importantes e bem definidos. Daí que estas intervenções devam focar-se neste público-alvo, não só em termos de informação mas também na definição de programas que levem à redução/eliminação destas exposições e, eventualmente, ao diagnóstico precoce.
2. Secundária, evitando a progressão de uma lesão pré-maligna a carcinoma. Não tem de momento um papel relevante neste contexto, dada a inexistência de uma lesão pré-maligna bem definida, na ausência de neoplasia concomitante (La Rochelle et al. 2008).
3. Terciária, a prevenção de recidivas em doentes previamente tratados a cancro da bexiga. Já se aplica amplamente no presente sob a forma de terapêuticas intravesicais adjuvantes embora exista um potencial enorme a ser explorado, nomeadamente a quimioprevenção com novos agentes, mais eficazes, mais cómodos e menos tóxicos.

Várias vitaminas, fármacos e outras substâncias pareceram promissoras, sem que até à data tenham confirmado em estudos cientificamente sólidos a sua eficácia.

Existem trabalhos em modelos experimentais e em linhas celulares que suportam a actividade da vitamina A e de outros retinóides no cancro da bexiga (Nutting and Huddart 2001, Zou et al. 2001). Infelizmente, dois estudos epidemiológicos de larga escala não demonstraram influência destas substâncias na redução da sua incidência (Zeegers et al. 2001, Michaud et al. 2002), embora um trabalho mais recente sugira

II. Estudo Experimental: Introdução

.....
que uma ingestão elevada de carotenóides possam ter algum benefício nos fumadores (Castelao et al. 2004).

Não obstante alguns resultados iniciais promissores, um estudo de fase III da *EORTC* não mostrou vantagem da vitamina B6 (Piridoxina) sobre o placebo na prevenção de recidivas (Newling et al. 1995).

Nalguns estudos epidemiológicos foi observada a capacidade da vitamina C, com conhecidas propriedades anti-oxidantes, em prevenir o cancro da bexiga, estando o consumo mais elevado associado a maior benefício (Michaud et al. 2000, Jacobs et al. 2002).

Alguns trabalhos mostram uma relação inversa entre a ingestão de vitamina E e esta neoplasia (Bruemmer et al. 1996, Michaud et al. 2000, Mazdak and Zia 2012), possivelmente devido a propriedades anti-oxidantes, apoptóticas e por redução de compostos N-nitrosos, conhecidos carcinogénios vesicais. Contudo, o estudo *SELECT* (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*), prospectivo, de dupla ocultação, com inserção aleatória de 34 887 homens em quatro grupos (Vitamina E, selénio, vitamina E + selénio, placebo) não mostrou qualquer efeito preventivo (Lotan et al. 2012). Para além disso, numa meta-análise de Miller houve um aumento da mortalidade global associada ao consumo de altas doses de suplementos de vitamina E (Miller et al. 2005), o que impede recomendações definitivas.

A ausência de consenso é o critério comum aos vários trabalhos e num estudo prospectivo e randomizado de Lamm o uso de megadoses de vitaminas A, B6, C, E e zinco em doentes com história de carcinoma vesical reduziu o risco de recidiva aos 5 anos de 91 para 41%, destacando o potencial interesse das vitaminas neste contexto e justificando investigação adicional (Lamm et al. 1994).

O papel do Selénio é controverso. Apesar do estudo *SELECT* não ter mostrado benefício, numa meta-análise recente foi sugerido um papel protector (Amaral et al. 2010). Para tentar esclarecer esta questão, decorre na Bélgica o estudo de fase III *SELEBLAT* (*The Selenium and Bladder Cancer Trial*), ainda em fase de recrutamento de doentes com tumor não invasivo (Goossens et al. 2012).

Componentes químicos derivados da soja preveniram o crescimento e metástases do carcinoma da bexiga num modelo experimental, por alterações da proliferação celular e da angiogénese (Singh et al. 2006). Estes resultados promissores não nos podem fazer esquecer o aumento do risco associado ao consumo de doses crescentes de soja em populações de Singapura e de Xangai (Sun et al. 2002, Sun et al. 2004).

.....

Existe evidência pré-clínica que sugere uma acção quimiopreventiva dos compostos polifenólicos do chá verde, nomeadamente epigallocatequina-3-gallate, epicatequina-3-gallate, epigallocatequina e epicatequina, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos mas que podem incluir acções anti-oxidantes, anti-proliferativas e pró-apoptóticas (Qin et al. 2007, Philips et al. 2009, Sagara et al. 2010). A baixa incidência deste tumor em países Asiáticos com alto consumo de chá verde é não apenas um argumento circunstancial mas com suporte científico (Wang et al. 2012). Essa associação positiva não se encontra para os outros tipos de chá (Qin et al. 2012).

Também foram referidos efeitos anti-tumorais da lisina, prolina e arginina (Roomi et al. 2006) bem como de isotiocianatos, abundantes nas crucíferas, de que os bróculos são um exemplo (Tang et al. 2010).

Os anti-inflamatórios não esteróides, em especial os inibidores da ciclooxigenase 2, foram aqueles que demonstraram maior interesse e que mais foram estudados neste contexto. Vários estudos em linhas celulares demonstraram uma paragem do ciclo celular, com inibição da proliferação e mesmo apoptose das células uroteliais malignas (Dhawan et al. 2008, Gee et al. 2009). Estes resultados estão em linha com os alcançados em modelos experimentais com ratos, tendo-se verificado uma inibição do crescimento tumoral e um aumento da sobrevivência dos animais com carcinoma vesical tratados com AINE (Grubbs et al. 2000, Hattori et al. 2006). Um estudo caso-controlo de Castelao mostrou uma redução do risco de cancro da bexiga (OR: 0,81) nos consumidores regulares de AINE, com excepção da fenacetina e dos derivados da pirazolona (fenilbutazona, metamizol) (Castelao et al. 2000). Contudo, um estudo randomizado, de dupla ocultação, controlado com placebo, não mostrou um decréscimo das recidivas tumorais nos doentes que tomaram os inibidores da Cox durante um ano, embora os autores também concluíssem que se justificavam investigações adicionais (Sabichi et al. 2011). O fármaco foi bem tolerado, não se tendo verificado nenhum aumento de eventos cardíacos.

Alguns outros agentes e modificações comportamentais, como o aumento da ingestão de fluidos, a diminuição do consumo calórico e de gorduras saturadas, privilegiando as frutas e os legumes, têm uma fundamentação teórica que os justifica num contexto de prevenção embora a sua acção não tenha sido demonstrada de forma consistente (La Rochelle et al. 2008).

Não obstante as evidências laboratoriais e epidemiológicas já apontarem para o interesse da aplicação de estratégias de quimioprevenção no cancro da bexiga, os estudos prospectivos ainda não

II. Estudo Experimental: Introdução

.....
o confirmam e o nível de evidência científica disponível não permite, de momento, recomendar o uso de nenhuma substância, excluindo as terapêuticas intravesicais adjuvantes actualmente em uso.

O sucesso de futuras investigações na área da prevenção desta neoplasia requer a integração de vários factores (Lieberman 2001):

- A adequada selecção dos agentes (produtos biológicos, naturais ou farmacêuticos), o que pressupõe estudos pré-clínicos (farmacológicos, em linhas celulares e em animais) correctamente desenhados e executados. O conhecimento mais profundo do carcinoma vesical, com uma caracterização molecular mais completa da(s) sua(s) carcinogénese(s) são condições *sine qua non*.
- A disponibilidade de biomarcadores que reflectam a actividade biológica e a redução do risco tumoral.
- A identificação dos doentes que mais possam beneficiar dessa redução. Justifica estudos paralelos para desenvolvimentos de modelos com elevada acuidade para avaliação do risco (estudos também justificados no caso dos biomarcadores).
- O desenho eficiente de estudos prospectivos, de dupla ocultação e randomizados, com o número adequado de participantes.
- A definição clara de *endpoints* clinicamente úteis, tais como redução do risco de recidiva ou progressão.
- Um tempo de seguimento adequado aos objectivos pretendidos. O efeito dos agentes na lesão, na mucosa envolvente ou nos biomarcadores da urina pode fazer-se notar precocemente, ao fim de poucos meses, mas a avaliação de recidivas requer no mínimo dois anos, mais no caso de progressão. É um ponto extremamente sensível e que pode constituir um factor de confusão. A curto prazo uma substância pode ser erradamente classificada como ineficaz se uma lesão inicial oculta ou não identificada for incorrectamente definida como recidiva. Por outro lado, é possível que a quimioprevenção não afecte a primeira recidiva mas previna as subseqüentes (La Rochelle et al. 2008).

.....
Razões para as nossas opções de investigação na quimioprevenção do cancro da bexiga

Ao planearmos a nossa investigação na área da quimioprevenção do tumor da bexiga, tivemos que fazer opções:

Não era viável o desenho ou desenvolvimento de novas moléculas dado não dispormos dos meios humanos, logísticos ou financeiros indispensáveis, para além do conhecimento e experiência nessa área. Optámos, por isso, por usar fármacos já amplamente investigados, com mecanismos de acção, eficácia e segurança conhecidos e com indicações clínicas aprovadas pelas instâncias reguladoras do medicamento, embora distintas da prevenção do carcinoma vesical. Não era objectivo do nosso trabalho o seu estudo farmacocinético ou farmacodinâmico, pois já havia sido feito. De igual modo, as dosagens escolhidas, já haviam sido previamente usadas noutros estudos.

Idealmente, um agente de quimioprevenção deveria ser de fácil administração o que nos levou a optar por fármacos com formulações para administração oral.

O mecanismo de acção também foi decisivo na nossa escolha. Um agente que, em teoria, pudesse bloquear ou atrasar o processo da carcinogénese, numa fase mais ou menos precoce, teria um interesse óbvio. Fármacos que levassem à redução da sobrevivência, crescimento ou progressão das células malignas também seriam passíveis de utilização neste contexto.

É conhecido o papel chave da inflamação na etiopatogenia do cancro da bexiga. A activação da cascata inflamatória estimula a proliferação e motilidade celulares, a neoangiogénese, ao mesmo tempo que inibe a apoptose e a vigilância imunológica, todas elas acções promotores da carcinogénese (Tanaka et al. 2011). A ligação entre a hiperactivação das vias da ciclooxigenase e o cancro da bexiga são evidentes (Kitayama et al. 1999, Czachorowski et al. 2012). Estes dados levaram-nos à escolha de dois grupos de fármacos para a nossa investigação: os imunomoduladores (Sirolimus e Ciclosporina) e os inibidores da Cox (Celecoxib e AAS).

A existência de agentes que associam, entre outras, propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-oxidantes, genericamente denominadas acções pleiotrópicas (Schonbeck and Libby 2004), todas elas teoricamente úteis no combate ao cancro vesical, levou-nos à introdução de um terceiro grupo: o dos fármacos com acções pleiotrópicas (Atorvastatina e ácidos Ómega 3).

II. Estudo Experimental: Introdução

.....
Finalmente, escolhemos um modelo animal que reproduzisse, o mais fielmente possível, a carcinogênese vesical no humano, tanto do ponto de vista da sua patogênese como do ponto de vista histológico. Um modelo que incluísse a exposição a um agente carcinogénico, a iniciação e progressão tumorais ao longo de um período temporal suficiente para tentar, farmacologicamente, inibir, lentificar ou reverter o processo de malignização.

Objectivos

Os objectivos do nosso projecto de investigação farmacológica experimental foram:

I. Objectivos principais:

1. Aprofundar o conhecimento dos mecanismos e vias associadas ao processo carcinogénico vesical, identificando as alterações fisiopatológicas mais importantes. Inclui um objectivo específico:
 - 1.1 Caracterização do modelo experimental, confirmando que tem uma alta incidência de tumores e que é similar ao cancro da bexiga no humano, em termos histológicos e de história natural.
2. Avaliação da capacidade de quimioprevenção dos fármacos em estudo, num modelo experimental de carcinogénese urotelial da bexiga.
3. Caracterização dos mecanismos de acção dos fármacos. Inclui alguns objectivos específicos:
 - 3.1 Estudo dos mecanismos de acção anti-neoplásica dos fármacos, identificando qual ou quais as vias da carcinogénese que são influenciadas ou alteradas; correlacionar os mecanismos de acção com a maior ou menor eficácia de prevenção tumoral.
 - 3.2 Identificar o perfil de quimioprevenção mais ajustado a cada fármaco, prevenção precoce ou mais tardia.

II. Outros objectivos:

4. Estudo da segurança e da toxicidade farmacológica nos animais em estudo.
5. Comprovar que a quimioprevenção é uma estratégia exequível no cancro da bexiga.
6. Identificação de fármacos com interesse para utilização em ensaios clínicos, com base na sua eficácia, mecanismos de acção e segurança no modelo experimental.

Material e Métodos

Todos os procedimentos do protocolo experimental foram efectuados em conformidade com as normas da Directiva 2010/63 do Parlamento e do Conselho Europeu, relativas à protecção dos animais utilizados para fins científicos bem como com as disposições legais em vigor, designadamente as contidas na Portaria n.º 1005/92 de 23 de Outubro e no Decreto-Lei n.º 129/92 de 6 de Julho.

O estudo foi realizado em instalações aprovadas pela Direcção Geral de Veterinária e sob a orientação de pessoal com formação específica em experimentação animal (incluindo o autor), nomeadamente com frequência e aprovação no Curso da *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*, categoria C, destinado a pessoas responsáveis pela direcção de experiências animais.

Animais e Acondicionamento

Nesta investigação experimental utilizaram-se ratos macho da espécie *Rattus norvegicus*, da estirpe Wistar, adquiridos à empresa Charles River Lab. Inc (Barcelona, Espanha).

À chegada ao Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, os animais tinham entre seis a oito semanas de idade e pesos entre 250 a 300 g, sendo colocados uma semana em quarentena.

Os ratos foram distribuídos ao acaso em gaiolas de policarbonato, três a quatro por gaiola, com cama de aparas de madeira, em câmaras ventiladas (Tecniplast®, referência 9ARMV8124LR) (fig. 9), numa sala com controlo da temperatura ($22\pm 2^\circ\text{C}$), humidade ($55\pm 5\%$), ruído e sujeitos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas (25 LUX). As gaiolas foram substituídas e lavadas duas vezes por semana.

A alimentação, uma dieta sintética apropriada (IPM-R20, Leticia, Espanha) e a bebida, água ou BBN 0,05% (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Tokyo, Japan), consoante os grupos, foram fornecidas *ad libitum*.

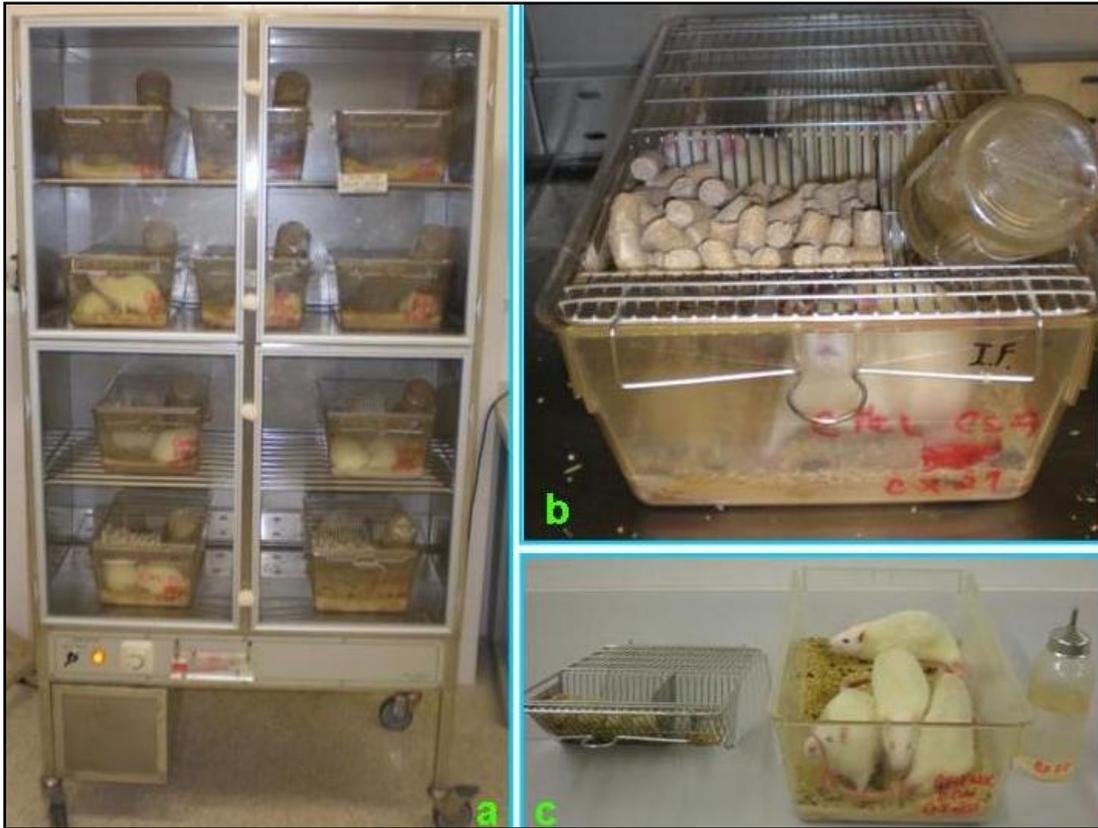


Figura 9: Condições de Acondicionamento

Protocolo Experimental

O protocolo experimental decorreu durante um período de 20 semanas, dividido em duas fases (fig. 10):

- Fase 1, entre as semanas um e oito, de indução tumoral com BBN a 0,05% na água da bebida, com ou sem administração de fármacos associada (prevenção farmacológica precoce).
- Fase 2, entre as semanas nove e vinte, sem exposição a BBN, para manifestação das lesões tumorais, com ou sem administração de fármacos associada (prevenção farmacológica tardia).

Os animais foram divididos em vários grupos, em função da bebida e da administração precoce ou tardia do fármaco, mantendo-se constantes as restantes variáveis:

- **Grupo Controlo (C):** animais a quem foi fornecida água *ad libitum* durante todo o estudo. Não foi administrado carcinógeno ou qualquer fármaco.
- **Grupo Controlo do Fármaco (F):** animais a quem foi administrado o fármaco, na fase 1 (FP) ou fase 2 (FT), nas mesmas condições dos

II. Estudo Experimental: Material e Métodos

grupos de Prevenção mas a quem não foi induzido o tumor urotelial com BBN 0,05%.

- **Grupo Carcinogénio (BBN)**: animais a quem foi fornecido BBN 0,05% *ad libitum* na água da bebida entre as semanas um e oito. Entre as semanas nove e vinte foi fornecida água. Não foi administrado qualquer fármaco.
- **Grupo Prevenção Precoce (PP)**: animais a quem foi fornecido BBN 0,05% *ad libitum* na água da bebida entre as semanas um e oito. Simultaneamente foi administrado o fármaco em estudo. Entre as semanas nove e vinte foi fornecida água e não foi administrado qualquer fármaco.
- **Grupo Prevenção Tardia (PT)**: animais a quem foi fornecido BBN 0,05% *ad libitum* na água da bebida entre as semanas um e oito. Entre as semanas nove e vinte foi fornecida água e simultaneamente foi administrado o fármaco em estudo.

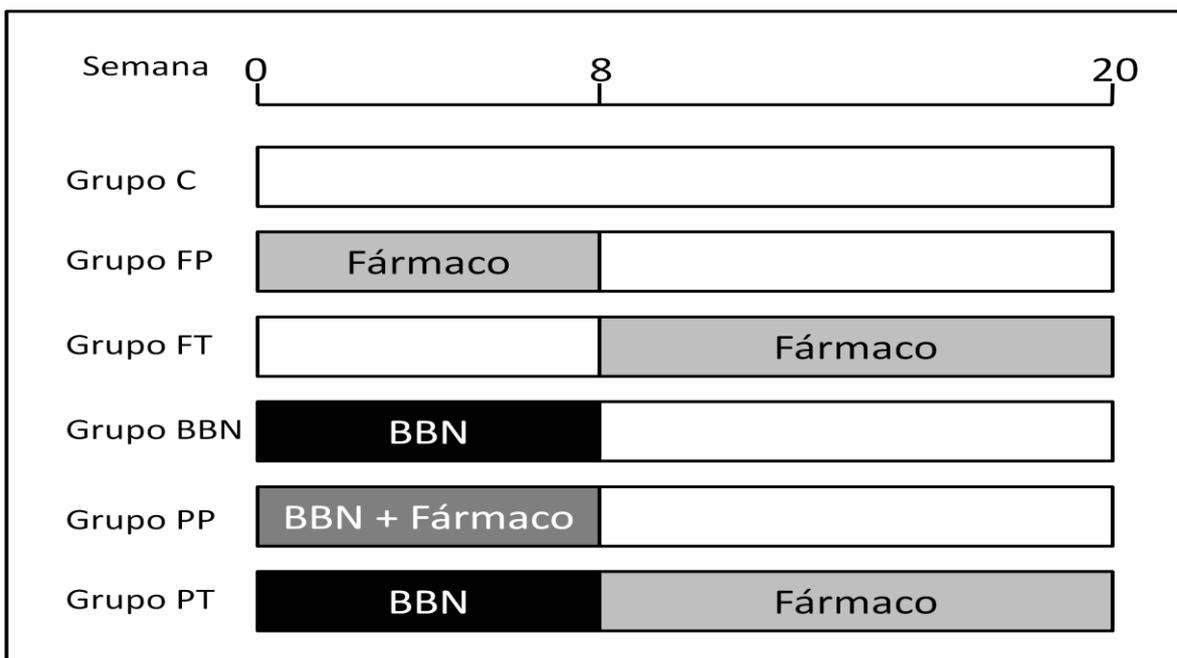


Figura 10: Protocolo Experimental

Os fármacos (e as doses) em estudo foram os seguintes:

1. Imunomoduladores:

- 1.1. Sirolimus 1 mg/kg/dia
- 1.2. Sirolimus 2 mg/kg/dia
- 1.3. Ciclosporina 5 mg/kg/dia

II. Estudo Experimental: Material e Métodos

.....

2. Inibidores da COX-2:

- 2.1. Celecoxib 1 mg/kg/dia
- 2.2. Celecoxib 10 mg/kg/dia
- 2.3. Ácido acetilsalicílico (AAS) 25 mg/kg/dia
- 2.4. AAS 250 mg/kg/dia

3. Acções Pleiotrópicas:

- 3.1. Atorvastatina 3 mg/kg/dia
- 3.2. Atorvastatina 30 mg/kg/dia
- 3.3. Ácidos gordos Ómega-3 600 mg/kg/dia: ácido eicosapentanoico (EPA) 360 mg/kg/dia e ácido docosahexanoico (DHA) 240 mg/kg/dia

O número de animais por grupo foi o seguinte:

Grupo	N. ° Animais
Controlo	6
Carcinogénio	25
Sirolimus Controlo	4
Sirolimus 1 mg PP	12
Sirolimus 2 mg PP	12
Sirolimus 2 mg PT	8
Ciclosporina A Controlo	4
Ciclosporina A PP	8
Ciclosporina A PT	8
Celecoxib Controlo	4
Celecoxib 1 mg PP	8
Celecoxib 10 mg PP	8
Celecoxib 10 mg PT	8
AAS Controlo	4
AAS 25 mg PP	8
AAS 250 mg PT	8
Atorvastatina Controlo	4
Atorvastatina 3 mg PP	8
Atorvastatina 30 mg PP	8
Ómega 3 Controlo	4
Ómega 3 PP	8
TOTAL	167

Quadro 5: Número de animais, por grupo de estudo, no início da investigação

.....
As administrações dos fármacos foram efectuadas através de uma cânula esofágica, sempre entre as 15:00 e as 16:00, de forma a minimizar a agressão provocada no animal, executadas com o máximo cuidado para não causar ferimentos/traumatismos, por um número limitado de investigadores experientes.

Durante a experiência, os animais foram observados diariamente, aquando da administração dos fármacos. Qualquer mudança do comportamento, sinais de doença ou alterações dos produtos biológicos eliminados foram registados. Foram ainda monitorizados diversos parâmetros:

- Bebida ingerida: para tal foram usados biberões graduados, meticulosamente controlados quatro vezes por semana, aquando da substituição da bebida.
- Consumo de comida: registo semanal.
- Peso corporal: os animais foram pesados numa balança analítica (Kern CB6K1, Alemanha), semanalmente, desde a chegada. No fim do estudo foram ainda registados os pesos de vários órgãos (rins, coração, ventrículo esquerdo e fígado).
- Pressões arteriais: Foram avaliadas as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), e a frequência cardíaca (FC). Essa avaliação foi efectuada numa fase intermédia (semanas sete a nove) 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 Leticia (Barcelona, Espanha).

No final da 20^a semana, os animais foram anestesiados para colheita de sangue e órgãos e eutanasiados.

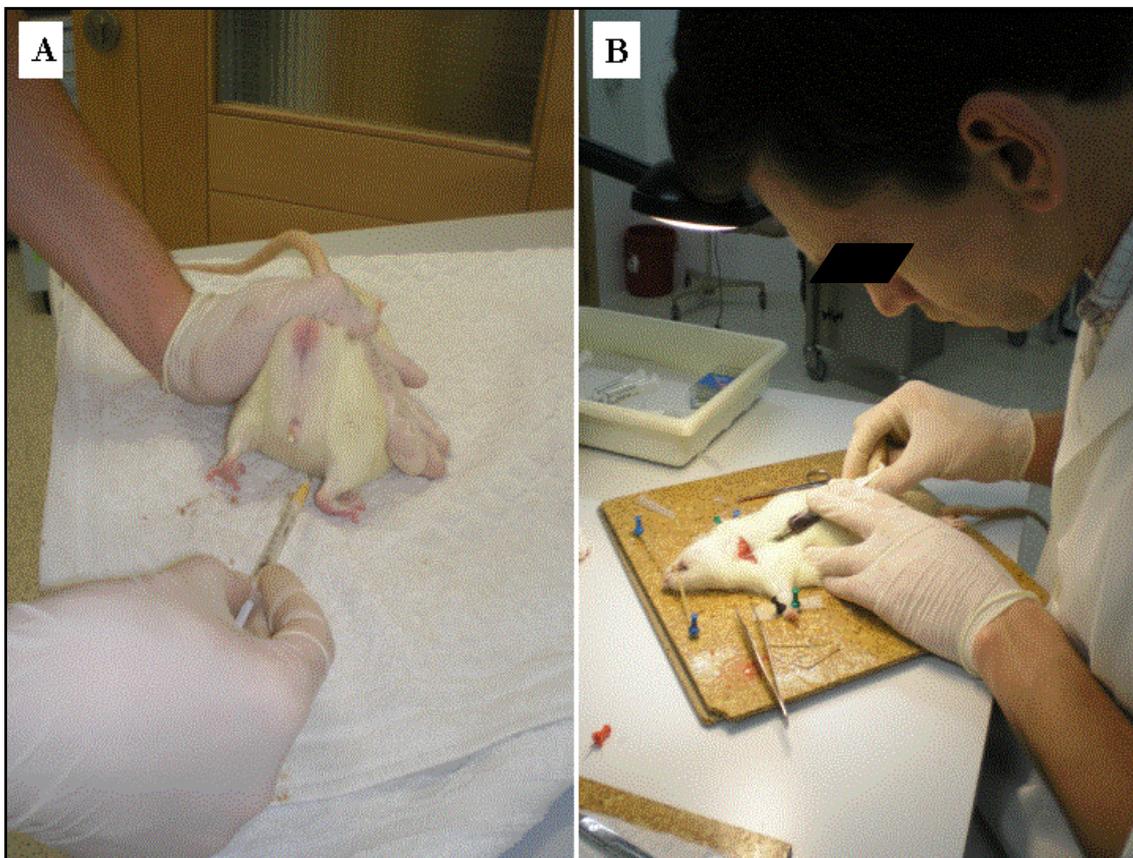
Colheita de Sangue e Órgãos

A componente cirúrgica deste protocolo foi realizada no Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os animais foram anestesiados com 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cloridrato de cetamina (Ketalar[®], Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda, Seixal, Portugal) em clorpromazina a 2,5 % (Largactil[®], Rhône-Poulenc Rorer, Vitória laboratories, Amadora, Portugal), por via intra-peritoneal. O sangue foi colhido da veia jugular em seringas de 5 ml, com agulhas

II. Estudo Experimental: Material e Métodos

.....
previamente passadas por heparina (B Braun Melsunger AG, Alemanha) para evitar coagulação instantânea durante a colheita (fig. 11). 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.



Figuras 11A-B: Anestesia intra-peritoneal (A); Colheita de sangue na jugular (B).

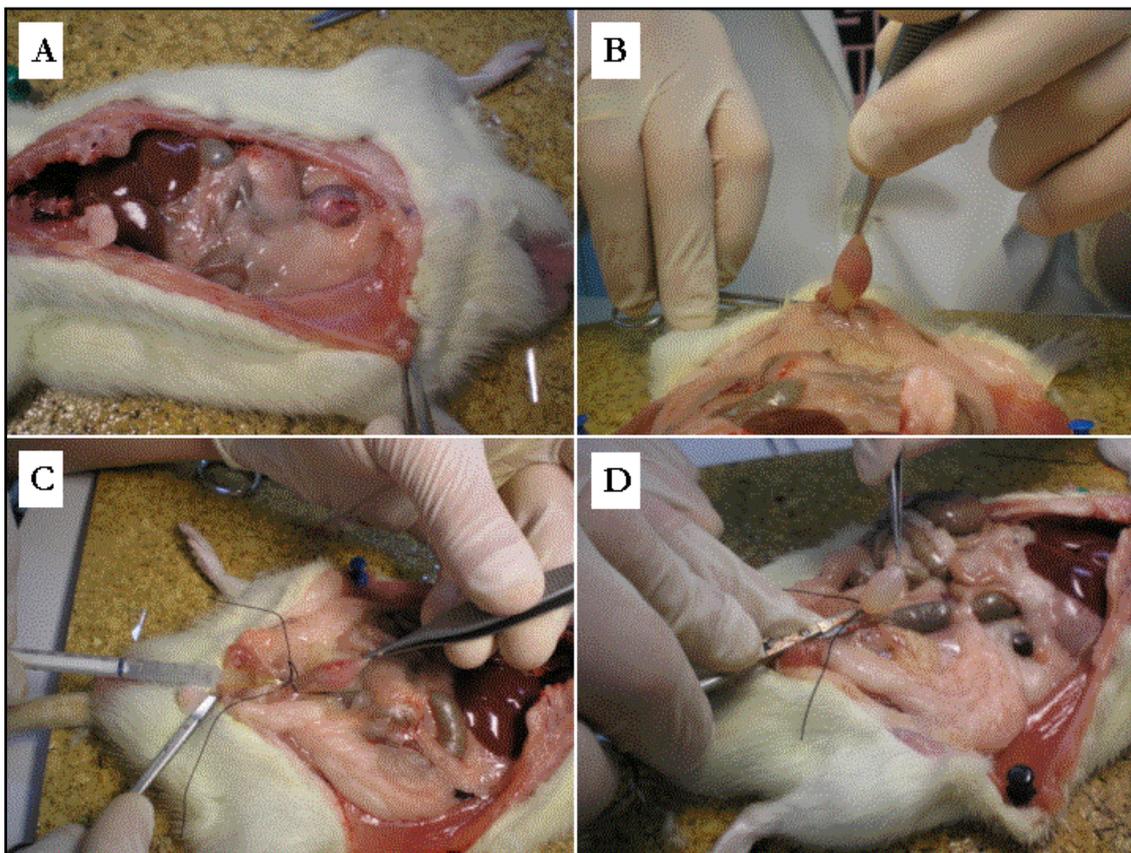
Efectuou-se de seguida uma incisão mediana entre o esterno e o púbis, permitindo uma exposição ampla de todos os órgãos intra-torácicos e intra-abdominais (fig. 12A).

Inicialmente, procedeu-se à identificação e isolamento da bexiga. Cada bexiga foi distendida *in situ* através de uma injeção transuretral de

II. Estudo Experimental: Material e Métodos

1 ml de formol tamponado a 10% e colocação de um fio de seda 3/0 à volta da uretra (fig. 12B-D). Procedeu-se então à sua remoção e imersão numa solução de formol a 10%. Seguiu-se a recolha de rins e ureteres, suprarrenais, fígado, coração, pulmões, artéria aorta, veia cava inferior e estômago.

A eutanásia dos animais ocorreu por exsanguinação.



Figuras 12 A-D: Exposição das cavidades torácica e abdominal (A); Colheita da bexiga (B-D).

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 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%).

.....
Todo este material biológico foi recolhido para a realização de diversos estudos:

A - Órgãos / Tecidos

1. Histopatologia convencional
2. Imunohistoquímica
3. Expressão génica

B - Sangue

1. Hemograma
2. Parâmetros bioquímicos
3. Marcadores inflamatórios e tumorais
4. Marcadores de equilíbrio oxidativo
5. Determinação de concentrações séricas (no caso do Sirolimus)

A: Bexiga

1. Histopatologia Convencional

O estudo histopatológico foi integralmente efectuado no Serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra. A totalidade dos estudos macroscópicos e histológicos foi efectuada por dois observadores em conjunto, o autor e uma médica especialista em Anatomia Patológica, especialmente dedicada à patologia Urogenital. Aquando da observação, as bexigas fixadas em formol foram removidas dos recipientes que as continham, de forma individual e devidamente identificadas por códigos.

O grupo do protocolo de investigação a que pertenciam era desconhecido dos dois observadores.

O estudo das bexigas envolveu duas fases distintas:

1.1. Avaliação Macroscópica

As bexigas foram inicialmente observadas a olho nu, de forma a identificar, por transiluminação, áreas suspeitas de neoplasia, a espessura da parede vesical e áreas de maior vascularização. As bexigas foram então seccionadas sagitalmente, evitando destruir lesões tumorais previamente identificadas. Foi feita uma observação macroscópica cuidadosa, sendo registados numa tabela de *SPSS®*, para cada animal, os seguintes dados:

1. Código de identificação do rato.

-
2. Tumor vesical: sim/não.
 3. Número total de tumores.
 4. Volume de cada tumor.
 5. Volume tumoral total.
 6. Comentários: onde eram registados dados considerados relevantes, tais como dúvidas a esclarecer na histologia, aumento da vascularização ou aumento da espessura da parede vesical.

Após registo das dimensões dos três eixos principais do tumor, longitudinal, sagital e transversal, calculou-se o volume tumoral segundo a fórmula:

$$\text{Dimensão 1} \times \text{dimensão 2} \times \text{dimensão 3} \times \pi / 6$$

De seguida, cada bexiga foi cortada em quatro tiras e processada em parafina, segundo o protocolo do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC (Apêndice 3). Dos blocos resultantes realizaram-se vários cortes num micrótomo (tipo Minot, Leica®, Modelo RM 2135) onde se aplicaram lâminas descartáveis R35 e S35 (Feather®), para estudos histopatológicos, imunohistoquímicos e de expressão génica.

1.2. **Avaliação Histopatológica**

Para esta avaliação, as preparações foram desparafinadas em xilol, hidratadas numa série de álcoois de concentração decrescente, coradas pelo método convencional de hematoxilina-eosina (H&E) e desidratadas numa série de álcoois de concentração crescente e montadas em Entellen® (Merck) (Apêndice 3).

Para a observação das lâminas recorreu-se a um microscópio Nikon™ Optiphot, com cabeça múltipla, permitindo a observação simultânea de dois ou mais observadores, com ocular 10X e objectivas 4X, 10X, 20X e 40X.

1.2.1. **Classificação histológica dos tumores uroteliais da bexiga**

Uou-se a classificação dos tumores uroteliais proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) em 1998 (Epstein et al. 1998) e publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2004 (Sauter G et al. 2004).

II. Estudo Experimental: Material e Métodos

Com base nestas classificações, com pequenas adaptações, foi elaborada uma tabela em SPSS, onde foram registados os dados histológicos de cada bexiga (Quadro 6):

Código de identificação Rato	
Urotélio Normal	0: Ausente 1: Presente
Hiperplasia Plana	0: Ausente 1: Presente
Hiperplasia Papilar	0: Ausente 1: Presente
Comentários 1	Tipo, intensidade e extensão das lesões Outros dados relevantes
Metaplasia Escamosa	0: Ausente 1: Presente
Displasia	0: Ausente 1: Presente
Displasia (Se presente)	1: Baixo Grau 2: Alto Grau
Carcinoma <i>in Situ</i>	0: Ausente 1: Presente
Papiloma	0: Ausente 1: Presente
Papiloma Invertido	0: Ausente 1: Presente
Carcinoma Urotelial	0: Ausente 1: Presente
Carcinoma Urotelial (Se presente)	Classificação OMS 2004
Comentários 2	Intensidade e extensão das lesões Outros dados relevantes

Quadro 6: parâmetros de avaliação das alterações histológicas da bexiga.

2. Imunohistoquímica

No estudo imunohistoquímico foi avaliada a expressão dos antigénios p53, Ki67, CD 31 e Cox-2 (este apenas nos grupos do carcinogénio e dos fármacos inibidores da Cox).

Para a marcação imunohistoquímica utilizou-se o método indirecto da estreptavidina-biotina-peroxidase (Apêndice 4).

A imunorreactividade foi avaliada em dois parâmetros:

- Quantitativa: percentagem de células com imunomarcção positiva
- Qualitativa: intensidade de imunomarcção
 - 0 - Ausente
 - 1 - Ligeira
 - 2 - Moderada
 - 3 - Intensa

.....
3. Expressão Génica

Para a análise da expressão génica no tecido vesical, o RNA total foi isolado de cortes histológicos dos blocos de parafina, segundo o protocolo descrito no Apêndice 5. A expressão génica relativa foi quantificada por *real-time PCR*.

Foram estudados os seguintes genes (e respectivos códigos):

· ARF1: Rn_Arf1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00434420
· BAX: Rn_Bax_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01081752
· Bcl2: Rn_Bcl2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00184863
· Casp3: Rn_Casp3_2_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01794429
· Casp9: Rn_Casp9_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00188734
· Ccnd3: Rn_Ccnd3_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01084181
· Cox-1: Rn_Ptgs1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00187859
· Cox-2: Rn_Ptgs2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00192934
· EGFr: Rn_Egf_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00176463
· Hras: Rn_LOC293621_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00438417
· IL1 b: Rn_Il1b_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00181657
· IL2: Rn_Il2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00185360
· IL6: Rn_Il6_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00182896
· IL10: Rn_Il10_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00177618
· Ki67: Rn_Mki67_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00450786
· Kras: Rn_Kras_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00188958
· Rb1: Rn_Rb1_2_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01591170
· TGFβ: 1Rn_Tgfb1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00187796
· TNFα: Rn_Tnf_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00178717
· P53: Rn_P53_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00193522
· VEGFb1: Rn_Vegfb_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01290163
· VEGFR2: Rn_Kdr_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00408352

B: Sangue e derivados

1. Hemograma

Vários parâmetros hematológicos foram doseados em sangue total EDTA: número de glóbulos vermelhos (GV), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), número de glóbulos brancos (GB) e de plaquetas (PLT).

2. Parâmetros Bioquímicos

Foram efectuadas diversas determinações bioquímicas (a partir de amostras de sangue total, de soro e de plasma) para avaliação da glicémia, função renal (creatinina, ureia), ácido úrico, função hepática (TGO, TGP) e perfil lipídico (Colesterol total, HDL, Não HDL, LDL e triglicerídeos).

3. Marcadores Séricos

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 ultrasensíveis Quantikine® (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). O fundamento da técnica aparece no apêndice 6.

4. Marcadores de equilíbrio oxidativo

Foram estudados marcadores de equilíbrio oxidativo através de:

- Medição da concentração sérica de malondialdeído (MDA) pelo método das espécies reactivas ao TBA: TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances).
- Doseamento da capacidade antioxidante total (Total Antioxidant Status - TAS).

As metodologias encontram-se descritas no Apêndice 7.

Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada com o programa PAWS (Predictive Analytics SoftWare Statistics) versão 18.0, actualmente denominado IBM® SPSS® Statistics (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA).

Foram estudadas variáveis quantitativas e variáveis categóricas:

A - Variáveis quantitativas:

1. Expressas em média \pm erro padrão e, quando indicado, com os valores mínimo e máximo.
2. Na comparação de amostras independentes foi usado o teste paramétrico *t* de *Student* com teste prévio de *Levene*, quando as variáveis tinham uma distribuição normal.
3. Na comparação de amostras independentes foi usado o teste não paramétrico *Mann-Whitney* quando os dois pressupostos do ponto anterior não se verificaram.
4. A análise da normalidade de distribuição da amostra foi efectuada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*.
5. Foram consideradas estatisticamente significativas diferenças com valores $p < 0,05$.

B - Variáveis categóricas:

1. Expressas em números absolutos e percentagens.
2. Para analisar a relação existente entre variáveis categóricas foi utilizado o teste de independência do Qui-Quadrado ou o teste exacto de *Fisher*, de acordo com as regras de *Cochrane*.
3. Foram consideradas estatisticamente significativas diferenças com valores $p < 0,05$.

Resultados

No total foram utilizados 167 ratos no nosso modelo experimental. 165 completaram as 20 semanas do estudo (Quadro 7).

Grupo	N. ° Animais Início	N. ° Animais Final
Controlo	6	6
Carcinogénio	25	25
Sirolimus Controlo	4	4
Sirolimus 1 mg PP	12	12
Sirolimus 2 mg PP	12	10
Sirolimus 2 mg PT	8	8
Ciclosporina A Controlo	4	4
Ciclosporina A PP	8	8
Ciclosporina A PT	8	8
Celecoxib Controlo	4	4
Celecoxib 1 mg PP	8	8
Celecoxib 10 mg PP	8	8
Celecoxib 10 mg PT	8	8
AAS Controlo	4	4
AAS 25 mg PP	8	8
AAS 250 mg PT	8	8
Atorvastatina Controlo	4	4
Atorvastatina 3 mg PP	8	8
Atorvastatina 30 mg PP	8	8
Ómega 3 Controlo	4	4
Ómega 3 PP	8	8
TOTAL	167	165

Quadro 7: N.º Animais no início e fim do estudo.

Dois ratos do grupo Sir 2 PP morreram na fase 2 do estudo, por causas não esclarecidas.

Optámos por fazer inicialmente uma caracterização do modelo experimental, apresentando os resultados do grupo Carcinogénio (vs Grupo Controlo). Tendo o grupo Carcinogénio como factor comparativo, procedemos posteriormente à apresentação dos resultados dos fármacos, em função do seu mecanismo de acção:

- Fármacos Imunomoduladores.
- Fármacos Inibidores da COX.
- Fármacos com "Acções Pleiotrópicas".

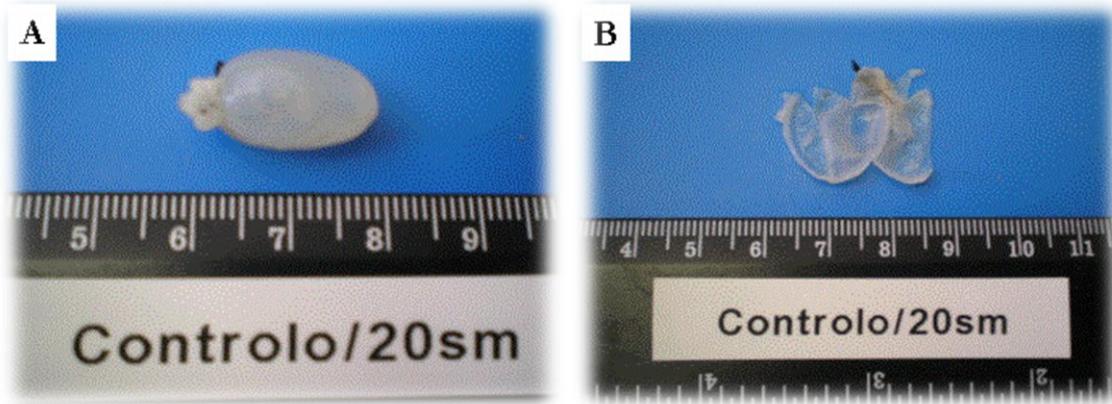
I: Grupos Carcinogénio e Controlo

A - BEXIGA

1. Anatomopatologia

1.1. Avaliação Macroscópica

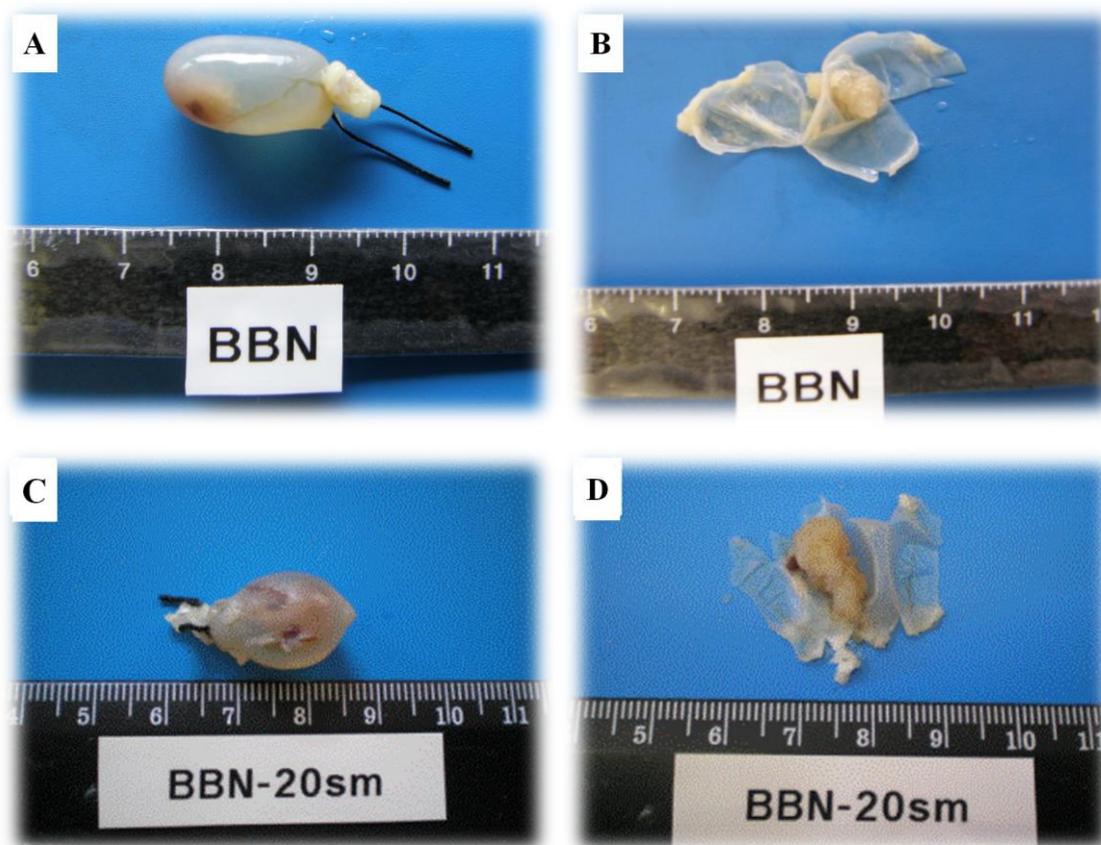
As bexigas dos animais do grupo Controlo não apresentaram alterações macroscópicas evidentes, mesmo após o seu corte sagital (Figs. 13 A-B). Eram translúcidas, de parede fina, sem sinais de hipervascularização. Não foi detectada nenhuma lesão suspeita de tumor vesical.



Figuras 13 A-B: Aspecto macroscópico das bexigas do grupo Controlo, distendidas com formol (A) e após cortes sagitais (B).

No grupo carcinogénio (BBN), à observação macroscópica, 17 animais em 25 (68%) tinham entre uma a duas lesões visíveis, sugestivas de tumor vesical. As dimensões eram variáveis, desde pequenas proliferações com cerca de 1 mm de maior eixo até lesões de grandes dimensões, com 16 mm de maior eixo, ocupando grande parte do lúmen (Figs. 14 A-D). Tratava-se de lesões esbranquiçadas, maioritariamente papilares, exofíticas, à excepção de dois animais em que os tumores tinham uma morfologia sésil, ocupando todo o lúmen vesical. A mucosa vesical era irregular e espessada, sobretudo nas áreas adjacentes aos tumores. O aumento da vascularização era uma constante.

Dos oito animais sem lesões macroscópicas aparentes, quatro apresentavam contudo uma parede espessada e irregular, com vascularização aumentada.



Figuras 14 A-D: Aspecto macroscópico das bexigas do grupo BBN, distendidas com formol (A, C) e após cortes sagitais (B, D).

Os restantes órgãos colhidos (fígado, rins, pulmões, estômago, coração) não tinham alterações macroscópicas sugestivas de doença tumoral metastática.

Os resultados da avaliação macroscópica são apresentados no Quadro 8:

	Grupo	Controlo	BBN	P
Ratos com tumor		0% (0/6)	68% (17/25)	0,001
N.º de tumores				
Rato: \bar{x} (EP)		0	1 (0,16)	0,006
Rato com tumor: \bar{x} (EP)		-	1,47 (0,13)	-
Min/Max		-	0/2	-
Volume Tumoral (mm³)				
Rato: \bar{x} (EP)		0	66,97 (31,58)	0,009
Rato com tumor: \bar{x} (EP)		-	100,46 (45,50)	-
Por tumor: \bar{x} (EP)		-	66,97 (31,18)	-
Min/Max		-	0,52/732,16	-

Quadro 8: Resultados macroscópicos nos Grupos BBN e Controlo.

1.2. Avaliação Histopatológica

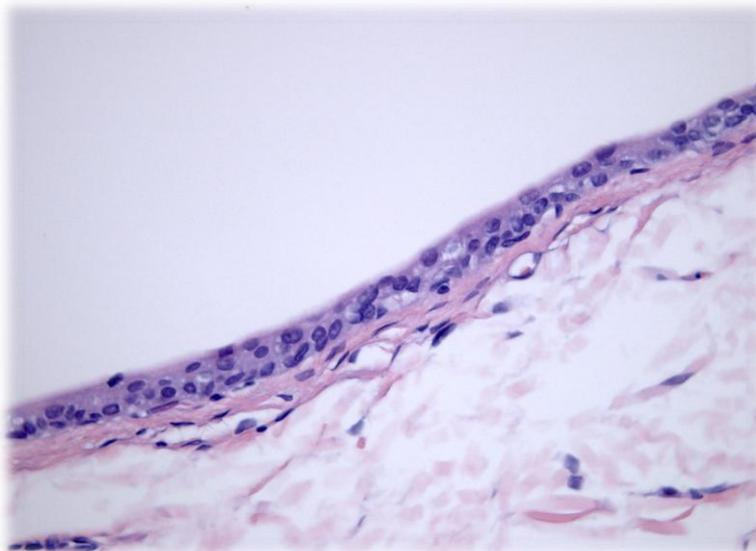
Após observação microscópica das lâminas coradas pelo método de H&E, procedemos à avaliação histopatológica de cada bexiga, de acordo com os critérios descritos em Material e Métodos, tendo sido obtidos os seguintes resultados:

	Grupo Controlo (n=6)	BBN (n=25)	P
Urotélio Normal	6 (100%)	25 (100%)	-
Hiperplasia plana	0	25 (100%)	0,000
Hiperplasia papilar	0	11 (44%)	0,014
Metaplasia escamosa	0	14 (56%)	0,004
Displasia	0	25 (100%)	0,000
Displasia alto grau		24 (96%)	
Carcinoma <i>in situ</i> (Cis)	0	13 (52%)	0,006
Papiloma	0	4 (16%)	0,173
Papiloma invertido	0	6 (24%)	0,088
Carcinoma urotelial	0	17 (68%)	0,001

Quadro 9: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos BBN e Controlo.

Em todos os animais do grupo controlo, a bexiga era revestida em toda a sua extensão por urotélio normal, sendo visíveis três camadas: superficial, intermédia e basal. A camada superficial era composta por células grandes, achatadas, as denominadas "umbrella cells", que se distinguíam das células mais pequenas da camada intermédia. Não se encontraram atipias celulares e a polaridade estava mantida. O urotélio repousava numa membrana basal que o separava da lâmina própria (Fig. 15), uma camada de tecido conjuntivo laxo e rica em fibras musculares lisas dispersas, a *muscularis mucosae*. Subjacente, estava o músculo detrussor (Fig. 16).

Não foram identificadas lesões hiperplásicas, displásicas, metaplásicas, de *Cis* ou carcinomas em nenhuma bexiga dos animais controlo.



Figuras 15: Urotélio normal (H&E, 200X).

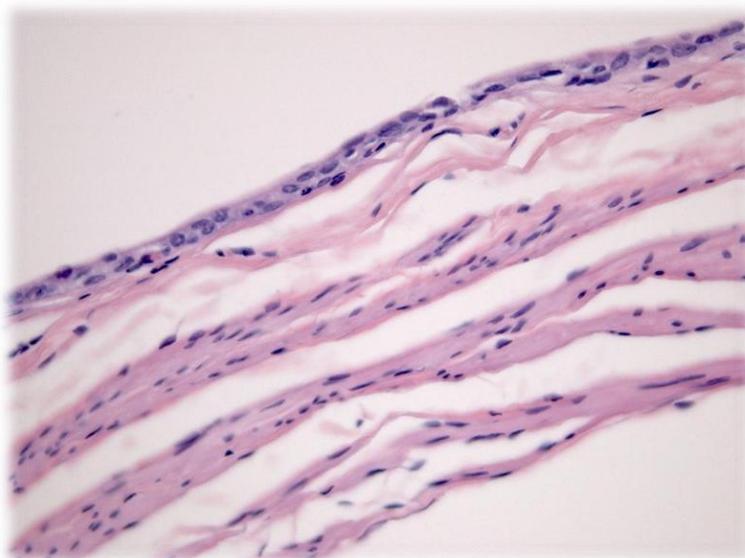


Figura 16: Urotélio normal (H&E, 200X).

Nos animais do grupo Carcinogénio encontraram-se diversas alterações histológicas, quantificadas na Quadro 9. Apesar destas lesões, havia em todas as bexigas do grupo Carcinogénio extensas áreas de urotélio normal.

A hiperplasia plana estava presente, de forma difusa ou focal, em 100% das bexigas deste grupo. Caracterizou-se por aumento do número de camadas uroteliais, sem evidentes alterações nucleares ou arquiteturais, embora com maior basofilia celular (Fig. 17).

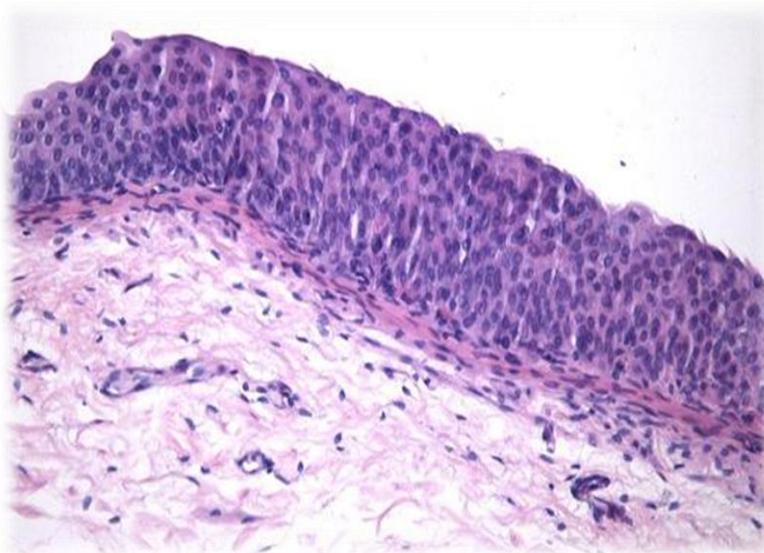


Figura 17: Hiperplasia plana (H&E, 200X).

Apesar de, por definição, a hiperplasia não ter componente displásico associado, foi frequente encontrarem-se figuras mitóticas, sobretudo na proximidade de carcinomas uroteliais (Fig. 18).

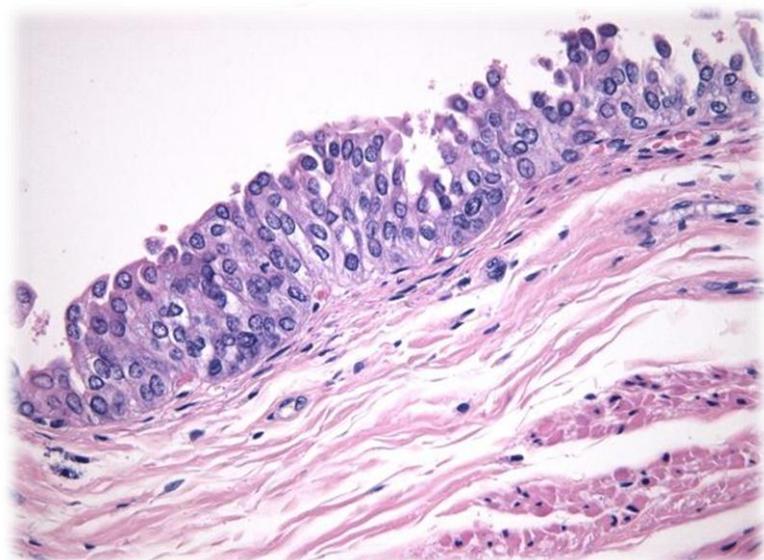


Figura 18: Hiperplasia urotelial com mitoses (H&E, 400X).

Nalguns casos, a superfície era ondulante, com pregas, assumindo mesmo a configuração de hiperplasia papilar em 44% dos casos, ocasionalmente com pequenos capilares na base dessas papilas (Fig. 19).

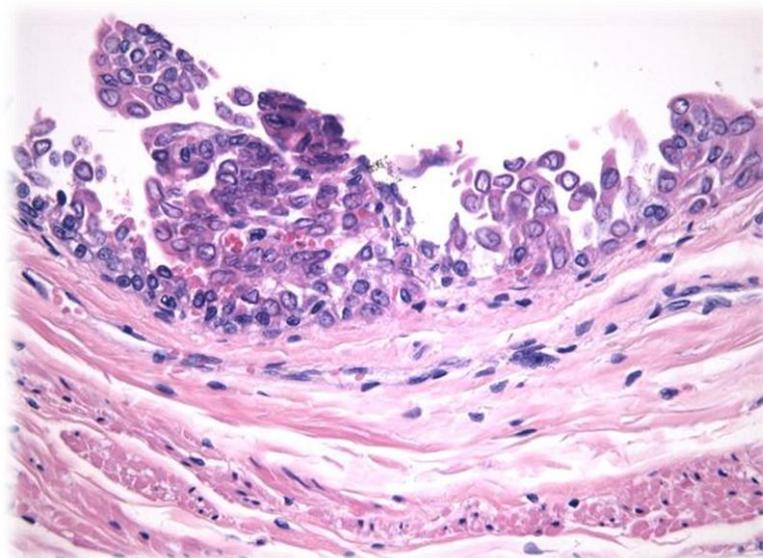


Figura 19: Hiperplasia papilar, com áreas de metaplasia escamosa (H&E, 400X).

Em quatro casos foram identificadas lesões papilares com um fino eixo fibrovascular central, revestidas por urotélio normal: papilomas (Fig. 20). As células superficiais "umbrella cells" eram proeminentes mas não se observaram alterações arquiteturais, mitoses ou atipia celular.

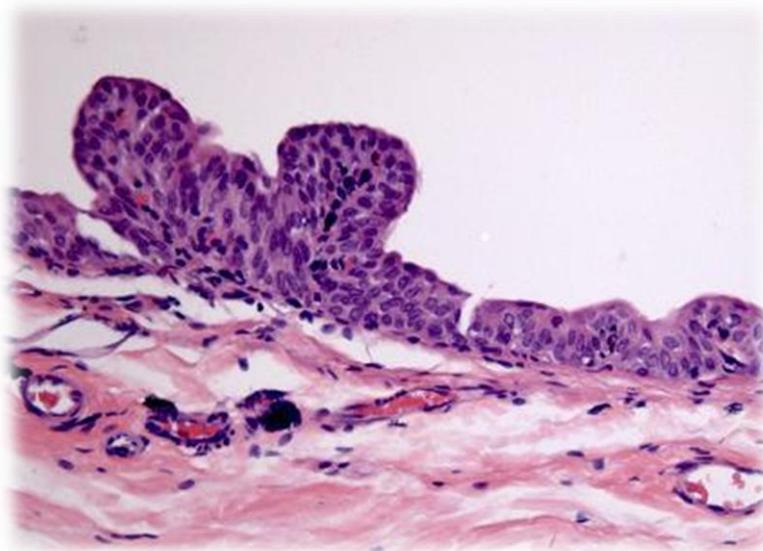


Figura 20: Papilomas uroteliais (H&E, 200X).

Os papilomas invertidos foram identificados em seis animais. Eram proliferações ligeiramente pedunculadas ou sésseis, com origem na mucosa, que se invaginavam, por vezes extensamente, na lâmina própria subjacente, mas não na camada muscular, formando ilhéus ou estruturas em cordão (Fig. 21). As atipias celulares eram mínimas ou estavam

.....
ausentes. Eram revestidos por um urotélio histológica e citologicamente normal, embora nalguns coexistisse hiperplasia. Também foram observados focos de metaplasia escamosa.

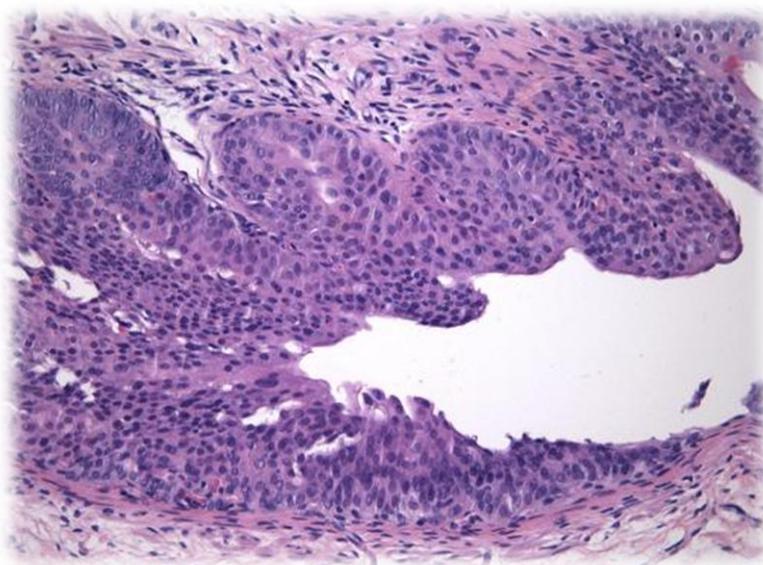


Figura 21: Papilomas invertidos, com áreas de hiperplasia urotelial e metaplasia escamosa (H&E, 200X).

Em 14 animais, o revestimento vesical apresentava áreas de epitélio epidermóide espessado, geralmente sem atipia e não queratinizante, correspondendo a metaplasia escamosa. Focalmente havia hiperqueratose superficial (Fig. 19) e atipia celular. Também havia metaplasia escamosa nalguns carcinomas uroteliais e nalgumas áreas de *Cis*, como veremos mais adiante. Numa bexiga deste grupo, identificámos diferenciação (metaplasia) glandular do urotélio.

A displasia urotelial estava presente em todas as bexigas do grupo Carcinogénio (Fig. 22), sendo de alto grau na quase totalidade dos casos (Quadro 9). As alterações arquiteturais eram uma constante, com desorganização das camadas uroteliais, diminuição das "umbrella cells" e perda da polaridade nuclear. As alterações citológicas incluíam núcleos aumentados, arredondados, hipercromáticos, de bordos irregulares, com nucléolos pequenos, raras mitoses e ocasionalmente eosinofilia citoplasmática.

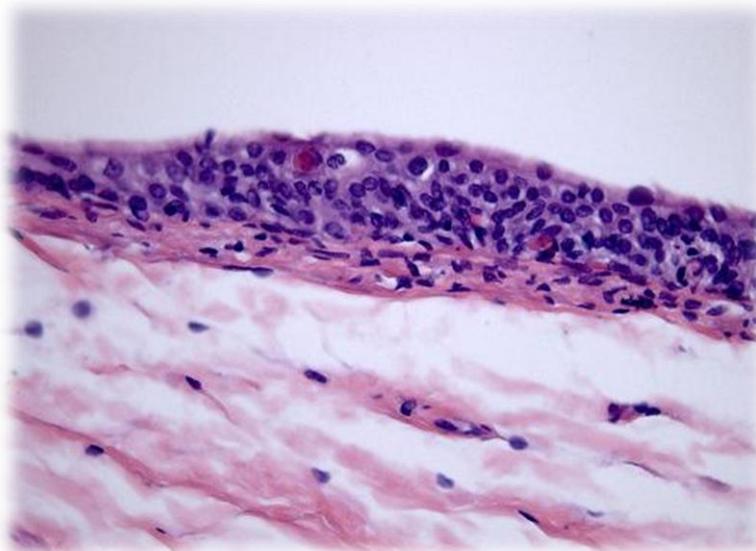


Figura 22: Displasia de alto grau (H&E, 400X).

Treze ratos tinham Carcinoma *in situ* (Cis). O Cis era multifocal, caracterizando-se por anaplasia nuclear, com núcleos grandes, pleomórficos, hipercromáticos, cromatina dispersa ou condensada e nucléolos volumosos (Fig. 23). A relação núcleo-citoplasma estava aumentada e o citoplasma era frequentemente eosinofílico. As mitoses eram comuns e as "umbrella cells" estavam geralmente ausentes. Havia perda da coesão intercelular, vendo-se células desprendendo-se das camadas superficiais.

Nalguns casos, esta falta de coesão celular traduziu-se numa superfície desnudada ("Cistite desnudada") (Fig. 24).

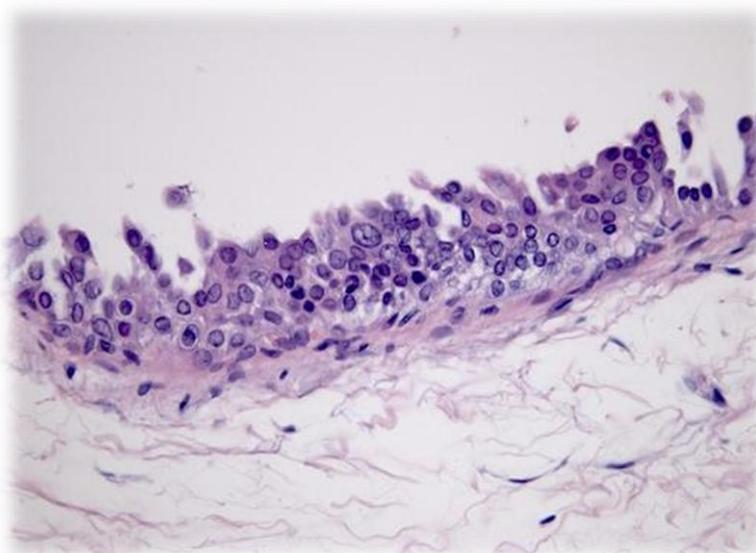


Figura 23: Carcinoma *in situ* (H&E, 400X).

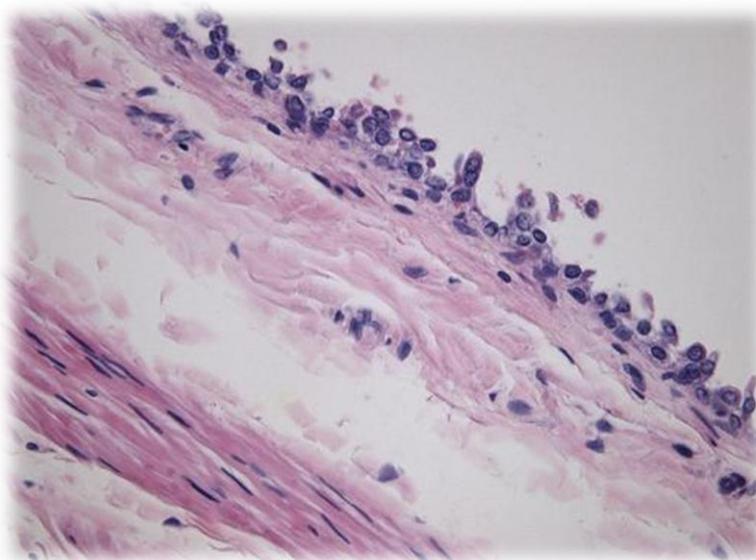


Figura 24: *Cis*: Perda da coesão celular ("Cistite desnudada") (H&E, 400X).

Os carcinomas uroteliais estavam presentes em 17 ratos (68%) do grupo carcinogénio.

Analisando este grupo carcinogénio, verificamos que há maior incidência de algumas das lesões pré-malignas atrás descritas quando coexistem carcinomas, embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas (Quadro 10):

	Com Carcinoma (n=17)	Sem Carcinoma (n=8)	p
Hiperplasia plana	17 (100%)	8 (100%)	-
Hiperplasia papilar	8 (47,1%)	3 (37,5%)	0,652
Metaplasia escamosa	10 (58,8%)	4 (50%)	0,679
Displasia	17 (100%)	8 (100%)	-
Displasia alto grau	17 (100%)	7 (87,5%)	0,676
Carcinoma <i>in situ</i> (<i>Cis</i>)	10 (58,8%)	3 (37,5%)	0,318
Papiloma	3 (17,6%)	1 (12,5%)	0,739
Papiloma invertido	4 (23,5%)	2 (25%)	0,936

Quadro 10: Caracterização histológica no Grupo BBN, em função da existência ou não de carcinoma urotelial.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Grupos Carcinogénio e Controlo

.....
Nos 17 animais com carcinomas uroteliais foram identificados 25 tumores com a seguinte classificação histopatológica (Quadro 11):

N.º total de carcinomas	25
TPBPM	4
Ta baixo grau	11
Ta alto grau	5
T1 alto grau	5

Quadro 11: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais.

Os tumores papilares de baixo potencial de malignidade (TPBPM), historicamente denominados TaG1, lesões confinadas à mucosa, tinham um fino eixo fibrovascular revestido por um urotélio com aumento do número de camadas celulares. A polaridade celular estava preservada e as alterações arquitecturais eram ligeiras. A atipia celular era mínima, havia aumento da densidade celular, núcleos ligeiramente maiores, mitoses raras e localizadas às camadas basais. As "umbrella cells" estavam geralmente presentes. Os quatro TPBPM eram tumores únicos.

Onze neoplasias eram carcinomas papilares não invasivos, Ta, de baixo grau. Apesar de estarem limitadas à mucosa, diferenciavam-se dos tumores anteriores por apresentarem em geral um eixo vascular mais largo, maior variabilidade do tamanho e forma nucleares, nucléolos proeminentes, alterações nos padrões de cromatina e perda da polaridade celular (Fig. 25). A relação núcleo-citoplasma encontrava-se frequentemente aumentada, com mitoses mais frequentes e, do ponto de vista arquitectural, a normal maturação celular, das camadas basais à superfície, estava alterada. Ocasionalmente havia fusão de estruturas papilares. Em quatro animais existiam dois tumores Ta de baixo grau na mesma bexiga, duas eram lesões únicas e num caso coexistia um tumor invasivo, T1, de alto grau. Num dos tumores havia áreas sólidas e invertidas (Fig. 26) e em três casos a metaplasia escamosa associada era proeminente.

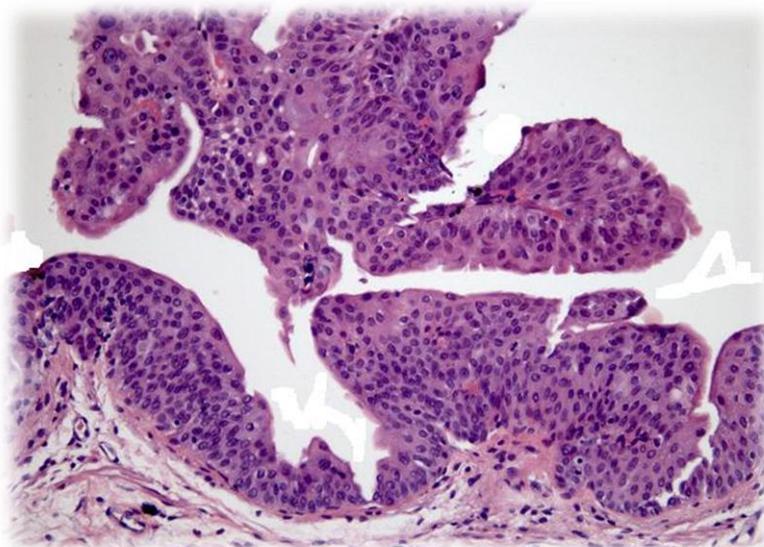


Figura 25: Carcinoma papilar não invasivo de baixo grau (H&E, 200X).

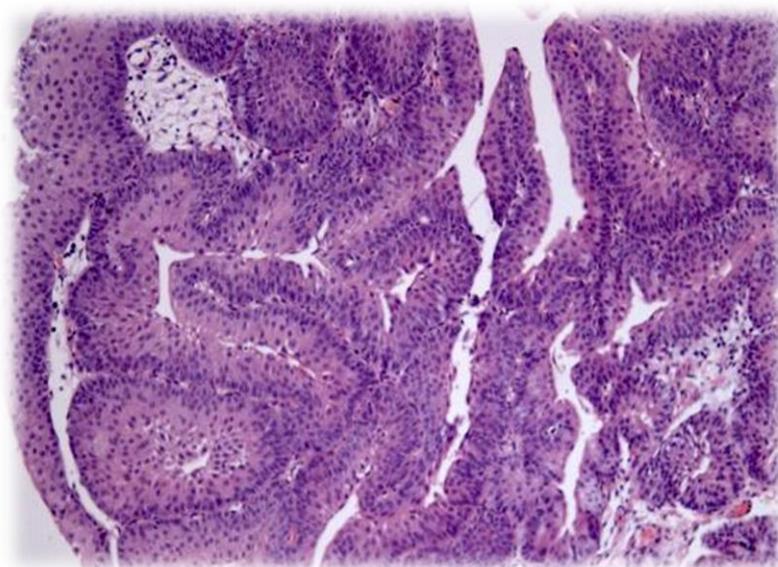


Figura 26: Carcinoma papilar não invasivo de baixo grau, de crescimento invertido (H&E, 200X).

Os carcinomas papilares Ta de alto grau mostraram acentuada desorganização histológica e citológica urotelial, com frequente fusão das papilas. Observava-se frequentemente perda da coesão celular (Fig. 27). A variabilidade do tamanho e forma nucleares, da textura da cromatina, os nucléolos aumentados, bem como a perda da polaridade celular eram mais proeminentes do que nas lesões de baixo grau. As mitoses eram mais numerosas, podendo ser atípicas e ocorrer a qualquer nível, incluindo nas camadas superficiais (Fig. 28). Apesar destas características de maior agressividade, estes tumores não invadiam a lâmina própria. Também foram identificadas áreas de metaplasia escamosa e de necrose e, num tumor, crescimento invertido (Fig. 29).

.....
Num dos casos, o tumor associava-se a um carcinoma urotelial invasivo de alto grau.

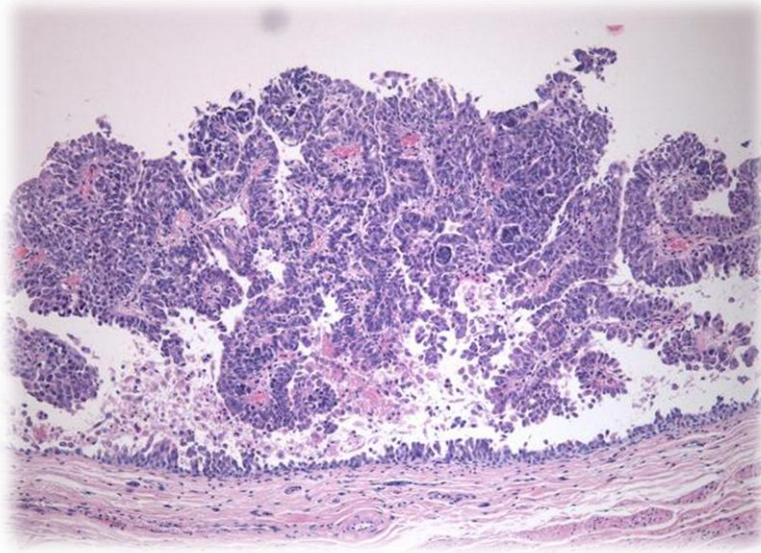


Figura 27: Carcinoma papilar não invasivo de alto grau: fusão de papilas e perda de coesão celular (H&E, 200X).

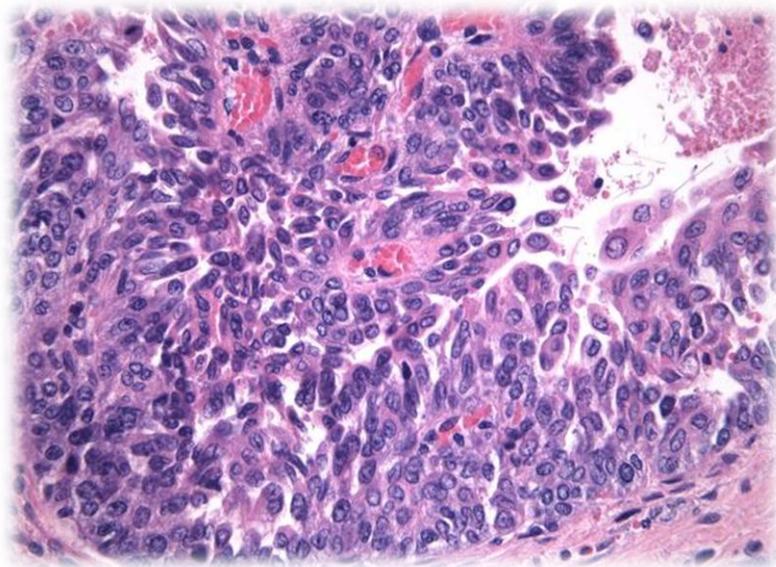


Figura 28: Carcinoma papilar não invasivo de alto grau: pleomorfismo e mitoses nucleares; metaplasia escamosa e áreas de necrose (H&E, 400X).

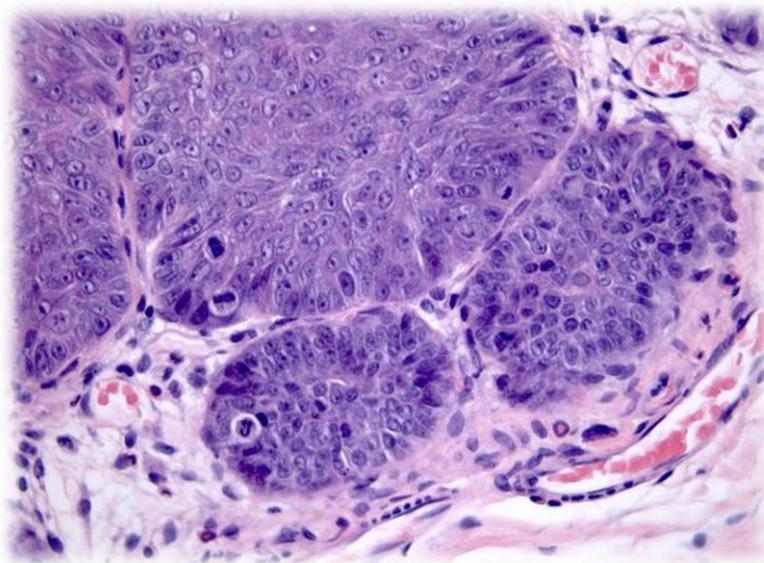


Figura 29: Carcinoma papilar não invasivo de alto grau com crescimento invertido (H&E, 400X).

Em cinco tumores, as células neoplásicas penetravam a membrana basal e invadiam a lâmina própria, T1 (Fig. 30). Estes carcinomas invasivos, todos eles de alto grau, apresentavam a desorganização arquitetural e citológica anteriormente descrita, com maior preponderância de áreas de anaplasia (Fig. 31). Três deles eram tumores únicos e dois estavam associados a tumores não invasivos, de baixo e alto grau. Em quatro deles havia crescimento invertido e em dois metaplasia escamosa (Fig. 32).

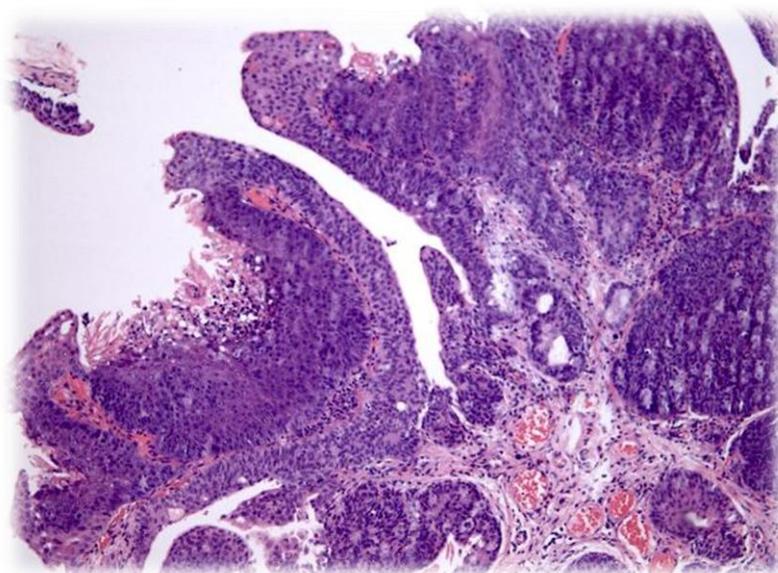


Figura 30: Carcinoma papilar de alto grau com invasão da lâmina própria; acentuada atipia nuclear (H&E, 200X).

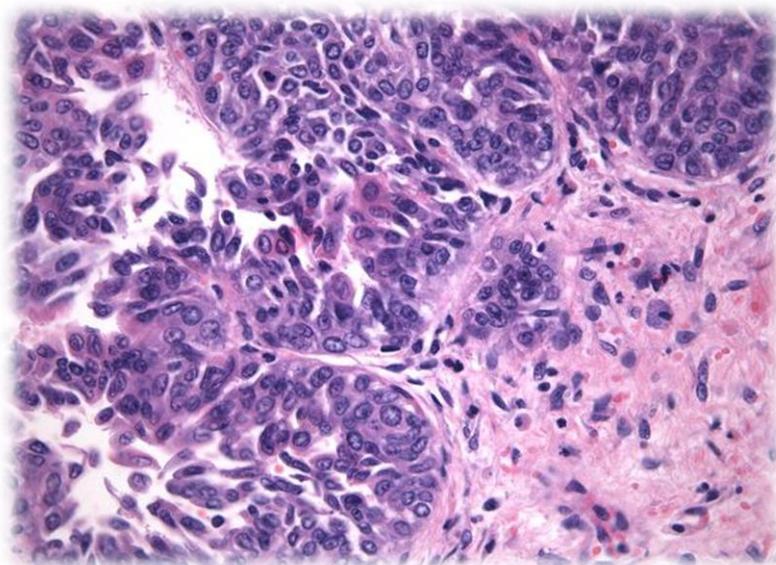


Figura 31: Carcinoma papilar invasivo de alto grau: desorganização arquitetural, pleomorfismo nuclear e mitoses (H&E, 400X).

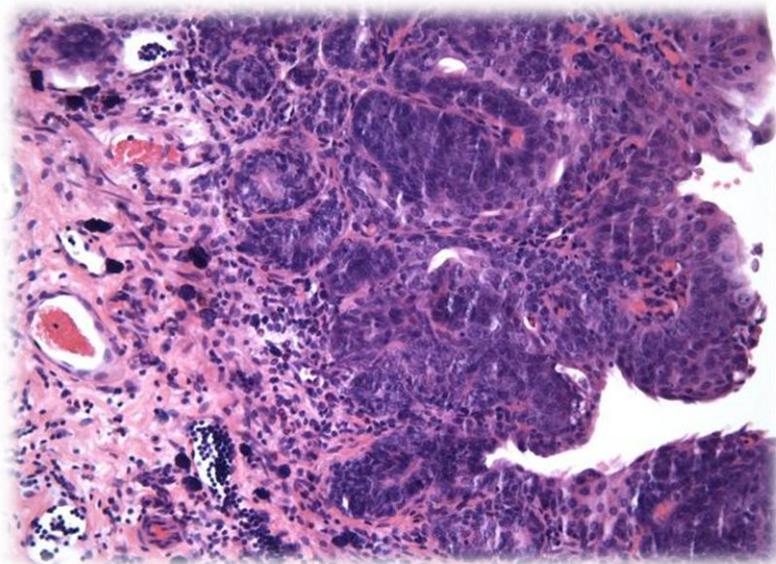


Figura 32: Carcinoma papilar invasivo de alto grau: Crescimento invertido, metaplasia escamosa e cistite folicular linfóide (H&E, 400X).

2. Imunohistoquímica

O estudo imunohistoquímico revelou diferenças quer na intensidade quer na percentagem de células com reactividade aos anticorpos p53, Ki67 e CD-31 no urotélio normal dos grupos Controlo e Carcinogénio (Quadro 12). Dentro do grupo Carcinogénio, observou-se também uma imunomarcação mais acentuada nas lesões pré-tumorais/tumorais comparativamente com o urotélio histologicamente normal.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Grupos Carcinogénio e Controlo

	Grupo		BBN	
	%	Intensidade	%	Intensidade
p53				
Urotélio Normal	0	0	50%	2+
Hiperplasia/displasia/tumor	-	-	75%	2+
Ki67				
Urotélio Normal	1-2%	1+	5%	2+
Hiperplasia/displasia/tumor	-	-	15 ^a /25 ^b %	2 ^a /3 ^b
CD31				
Urotélio Normal	<5%	1+	50-75%	1+
Hiperplasia/displasia/tumor	-	-	75%	1 ^a /2 ^b

Quadro 12: Resultados da expressão imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD31, em função da % e da intensidade de células com imunomarcção, nos Grupos Controlo e BBN. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

Verificámos que nos Controlos a imunomarcção para o p53 no urotélio normal era negativa (Fig. 33), contrariamente ao grupo Carcinogénio, com positividade moderada (2+), em 50% dos núcleos (Fig. 34).

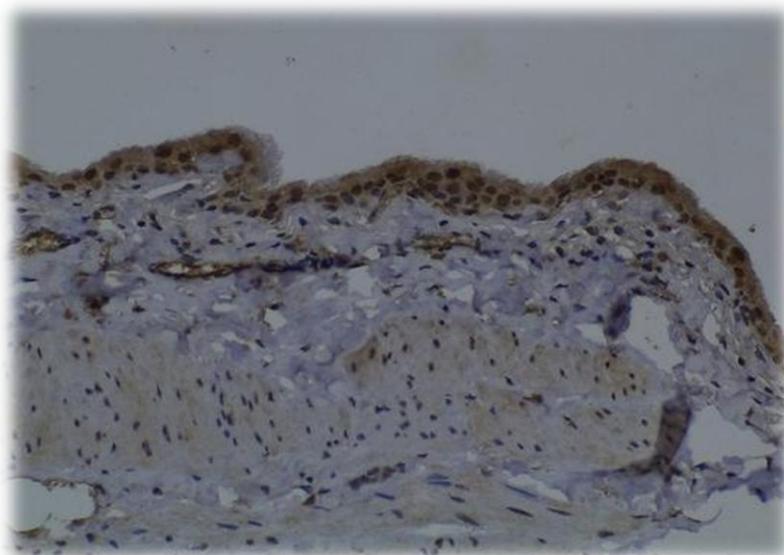


Figura 33: Imunorreactividade de p53 no urotélio normal do Grupo Controlo (200X).

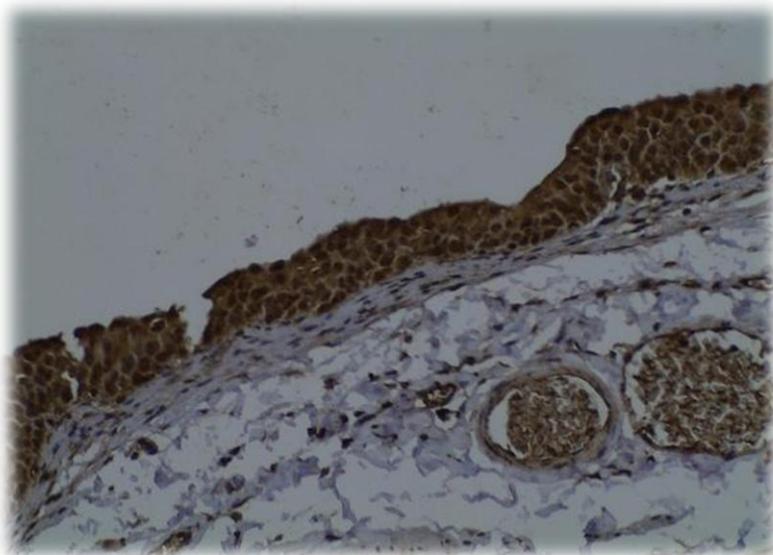


Figura 34: Imunorreactividade de p53 no urotélio normal do Grupo Carcinogénio (200X).

Ainda neste grupo, a hiperexpressão nuclear de p53 no urotélio com alterações hiperplásicas, displásicas ou tumorais era mais extensa, atingindo 75% das células (Fig. 35).

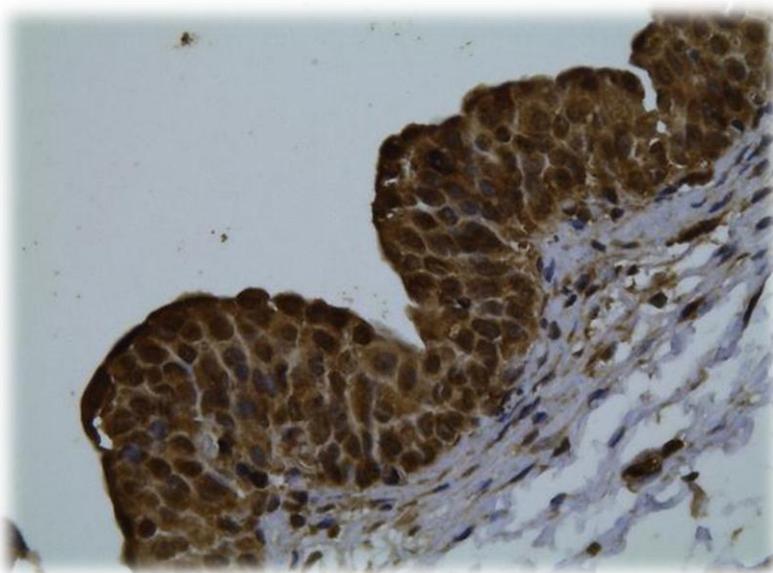


Figura 35: Imunorreactividade de p53 em urotélio hiperplásico e displásico do Grupo Carcinogénio (400X).

Embora a marcação mais importante seja nuclear, verificou-se também imunomarcacão citoplasmática ligeira (1+) em todas as células do urotélio normal e moderada (2+) nas lesões displásicas e tumorais.

.....
Relativamente à imunorreatividade nuclear para Ki67, ela era mínima no grupo Controlo (Fig. 36).

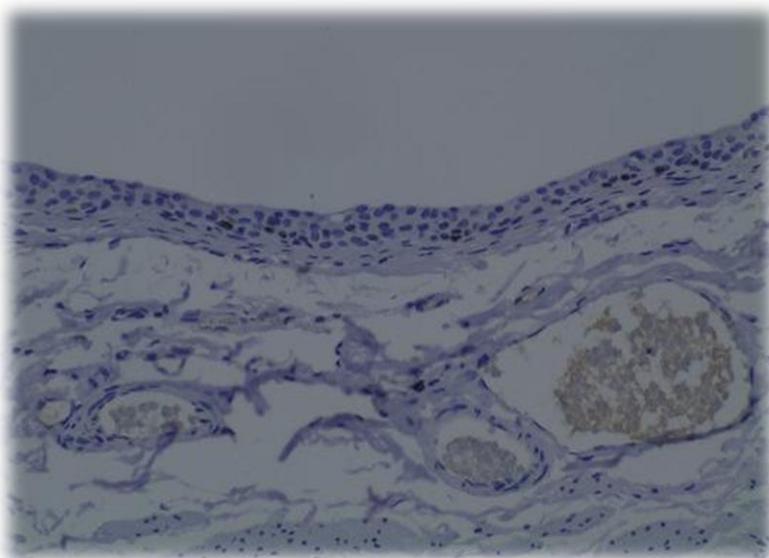


Figura 36: Imunorreatividade de Ki67 no Grupo Controlo (200X).

Dentro do grupo Carcinogénio, a positividade imunohistoquímica nas áreas hiperplásicas/displásicas era mais acentuada (3+ vs 2+) e extensa (25 vs 15%) quando existia carcinoma concomitante (Figs. 37 e 38).

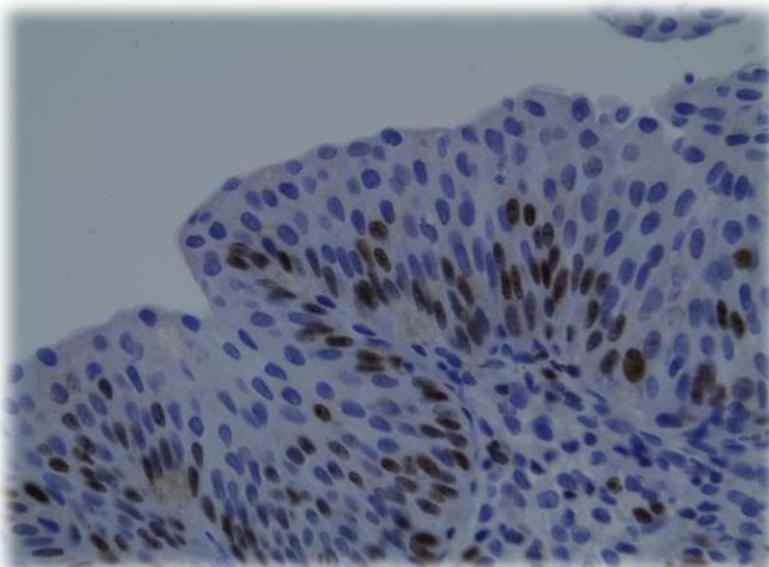


Figura 37: Imunorreatividade de Ki67 em urotélio hiperplásico e displásico do Grupo Carcinogénio, com carcinoma concomitante (400X).

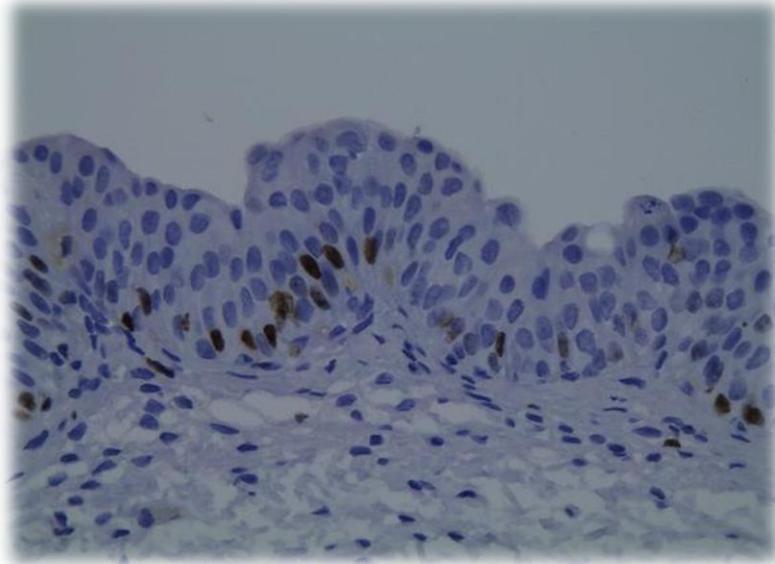


Figura 38: Imunoreactividade de Ki67 em urotélio hiperplásico e displásico do Grupo Carcinogénio, sem carcinoma concomitante (400X).

Estas diferenças também se verificaram na marcação imunohistoquímica pelo CD31 das áreas hiperplásicas e displásicas, que era mais intensa (2+ vs 1+) quando coexistia carcinoma urotelial (Figs. 39 e 40).

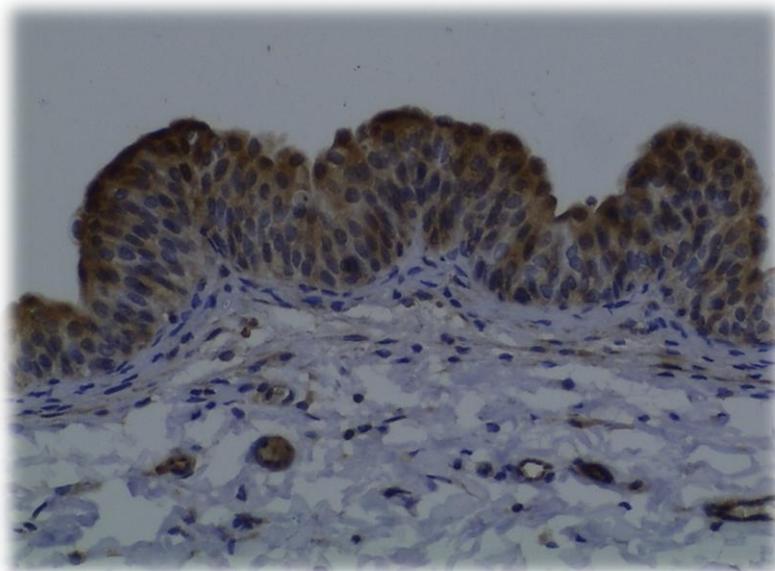


Figura 39: Imunoreactividade de CD31 em urotélio hiperplásico e displásico do Grupo Carcinogénio, com carcinoma concomitante (400X).

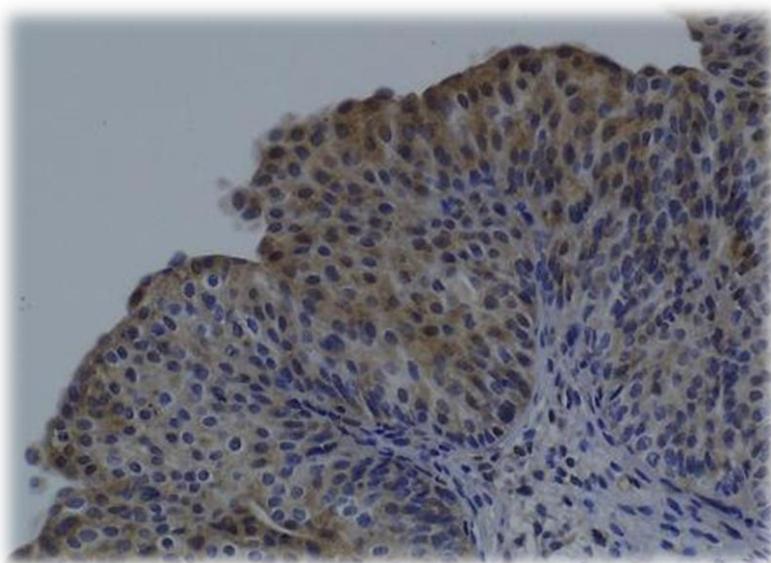


Figura 40: Imunorreactividade de CD31 em urotélio hiperplásico e displásico do Grupo Carcinogénio, sem carcinoma concomitante (400X).

3. Expressão Génica

Os genes *Bcl-2*, *Hras*, *Cox-2* e *VEGF* tiveram expressão superior no grupo BBN, ao contrário do gene *Rb1* (Quadro 13). A expressão génica de *p53* apenas ocorreu nos animais expostos ao carcinogénio.

Os genes que não são apresentados no quadro não tiveram expressão.

Grupo	Controlo	BBN	p
Bcl-2	1,303 (0,367)	3,200 (3,110)	0,651
Cox-2	0,940 (0,410)	1,345 (1,225)	0,727
Hras	0,280 (0,180)	1,130 (0,030)	0,317
Rb1	0,060 (0,040)	Sem expressão	-
p53	Sem expressão	- 0,403 (0,159)	-
VEGF	0,420 (0,190)	0,912 (0,288)	0,333

Quadro 13: Resultados de expressão génica (*Expression Ratio*); resultados expressos em \bar{x} (EP).

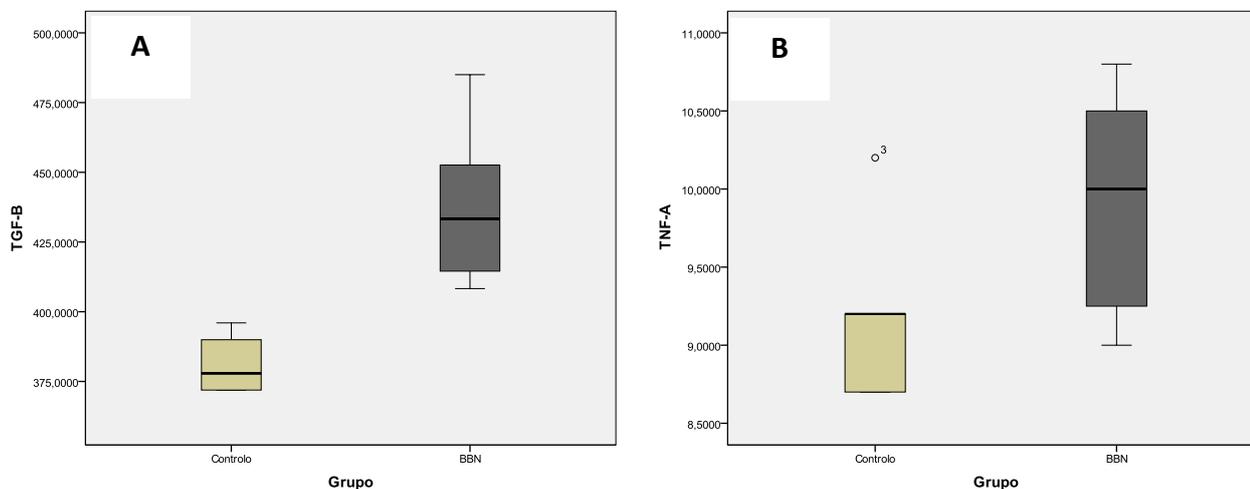
B: Sangue e derivados

1. Marcadores Séricos

Os marcadores séricos TGF- β e TNF- α foram mais elevados nos animais do grupo Carcinogénio do que nos Controlos, embora só no primeiro tenha havido diferença estatisticamente significativa (Quadro 14 e Fig. 41).

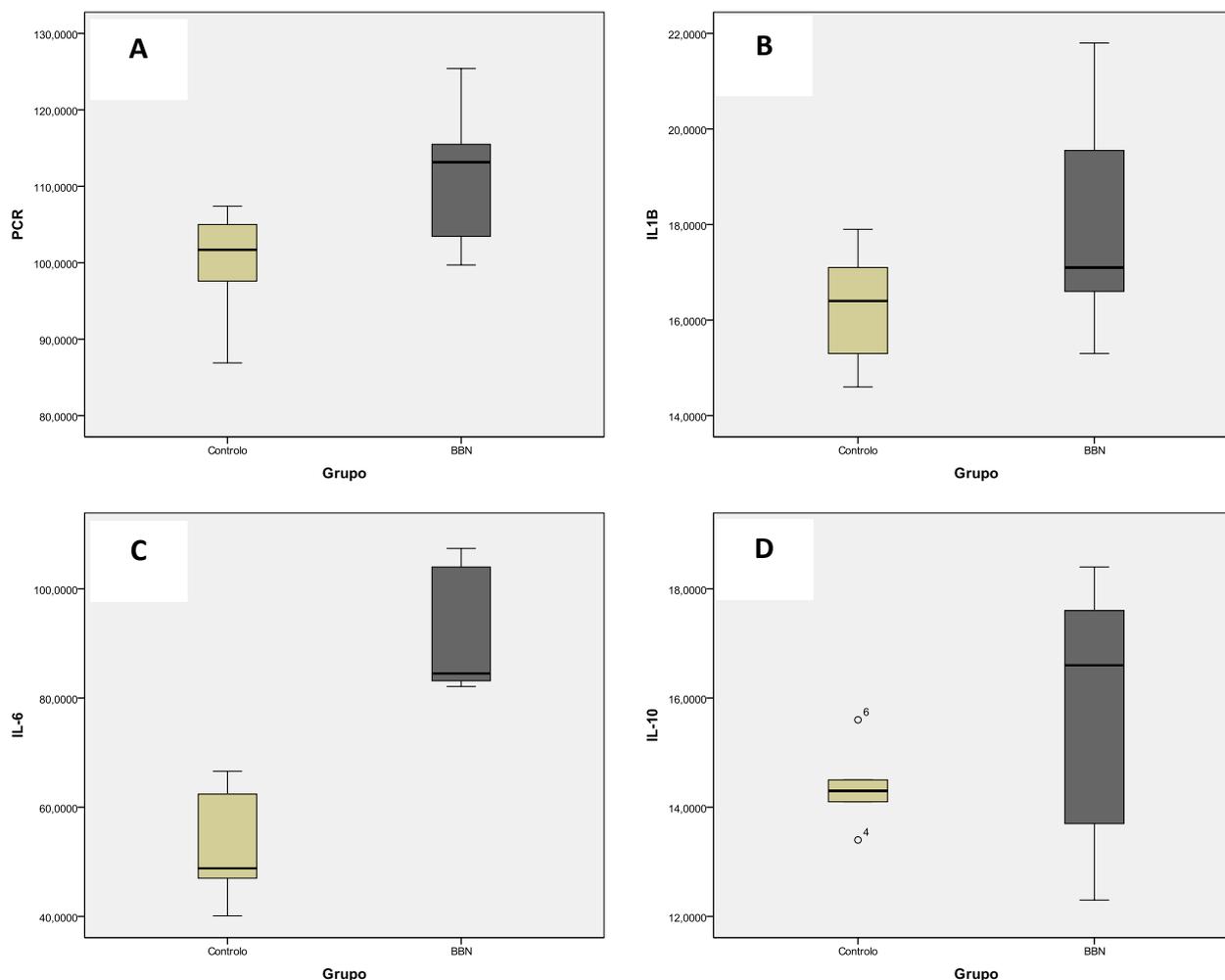
Grupo	Controlo	BBN	p
TGF-β	380,925 (5,766)	437,271 (11,400)	0,006
TNF-α	9,200 (0,224)	9,912 (0,250)	0,064
PCR	100,050 (2,962)	111,162 (3,059)	0,026
IL-1β	16,283 (0,487)	17,950 (0,799)	0,129
IL-6	52,980 (4,967)	92,614 (4,460)	0,000
IL-10	14,367 (0,296)	15,867 (0,966)	0,189

Quadro 14: Resultados dos marcadores séricos (em pg/ml, à excepção de PCR, em mg/ml); resultados expressos em \bar{x} (EP).



Figuras 41 A-B: Valores mínimos, máximos e medianas de TGF- β e TNF- α .

Relativamente aos marcadores inflamatórios, todos estavam aumentados nos ratos do grupo BBN, atingindo as diferenças significado estatístico nos marcadores PCR e IL-6 (Quadro 14 e Fig. 42).



Figuras 42 A-D: Valores mínimos, máximos e medianas de PCR, IL-1 β , IL-6, IL-10.

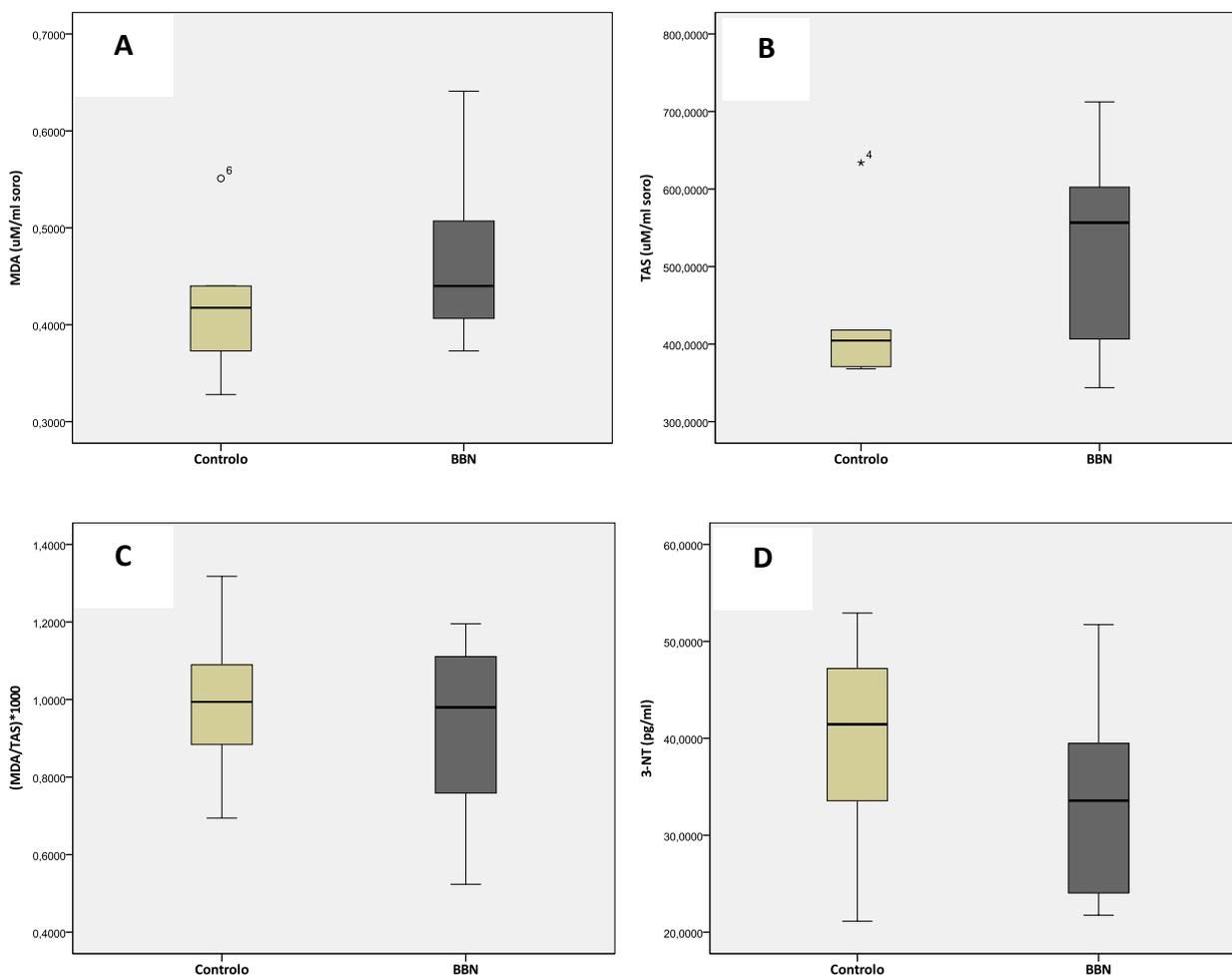
2. Marcadores de Equilíbrio Oxidativo

Não se registaram diferenças significativas nos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo (Quadro 15) apesar de se ter verificado uma maior peroxidação lipídica (MDA) no grupo BBN, contrabalançada por um estado antioxidante (TAS) superior. Daí resultou uma relação MDA/TAS semelhante entre os dois grupos (Fig. 43). Também não houve diferenças nos valores de 3-NT.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Grupos Carcinogénico e Controlo

Grupo	Controlo	BBN	p
MDA	0,421 (0,031)	0,465 (0,033)	0,345
TAS	433,381 (40,919)	523,500 (44,970)	0,332
MDA/TAS	0,996 (0,085)	0,927 (0,081)	0,577
3-NT	39,616 (4,546)	33,458 (3,598)	0,312

Quadro 15: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo; resultados expressos em \bar{x} (EP).



3. Hemograma

Os valores médios do hemograma estavam todos dentro dos intervalos de referência considerados normais para a estirpe, sexo e idade, não havendo diferenças entre os dois grupos em estudo (Quadro A1, Apêndice 8). Numa análise individual, nenhum dos animais apresentou alterações analíticas.

4. Parâmetros Bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos mostrou valores de glicémia, provas de função renal (creatinina, ureia) e hepática (TGO, TGP), ácido úrico e perfil lipídico (Colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos) normais para todos os ratos dos grupos Controlo e Carcinogénio, embora o azoto ureico fosse superior nestes últimos (Quadro A2, Apêndice 8).

C: Bebida Ingerida e Pesos Corporais

Não houve diferenças no consumo semanal de bebida entre os grupos, quer consideremos a duração total do modelo experimental, quer se analisem as duas fases do estudo separadamente (Quadro 16).

Dentro do grupo Carcinogénio também não houve diferenças nos consumos entre os ratos com e sem carcinoma vesical.

Não houve diferenças na quantidade de comida consumida.

Grupo	Controlo	BBN	p
Bebida 0-20S	0,76 (0,04)	0,75 (0,03)	0,887
Bebida 0-8S	0,92 (0,05)	0,88 (0,04)	0,574
Bebida 9-20S	0,66 (0,02)	0,67 (0,02)	0,675

Quadro 16: Bebida média semanal por rato (em ml/g peso): durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S); resultados em \bar{x} (EP).

Não houve diferenças na evolução ponderal dos animais dos dois grupos ao longo do estudo ($p=0,922$), como o demonstram as curvas quase sobreponíveis da Fig. 44.

Tendo como ponto de partida o peso inicial ($304,2 \pm 3,4$ g no grupo controlo e $302,0 \pm 3,1$ g no grupo carcinogénio), até à semana oito

II. Estudo Experimental: Resultados dos Grupos Carcinogénio e Controlo

.....
(fase 1 do estudo) houve um aumento ponderal de 55,07% no grupo controlo e de 57,89% no grupo carcinogénio, tendo sido esse aumento no final do estudo de 84,11% e 81,57%, respectivamente.

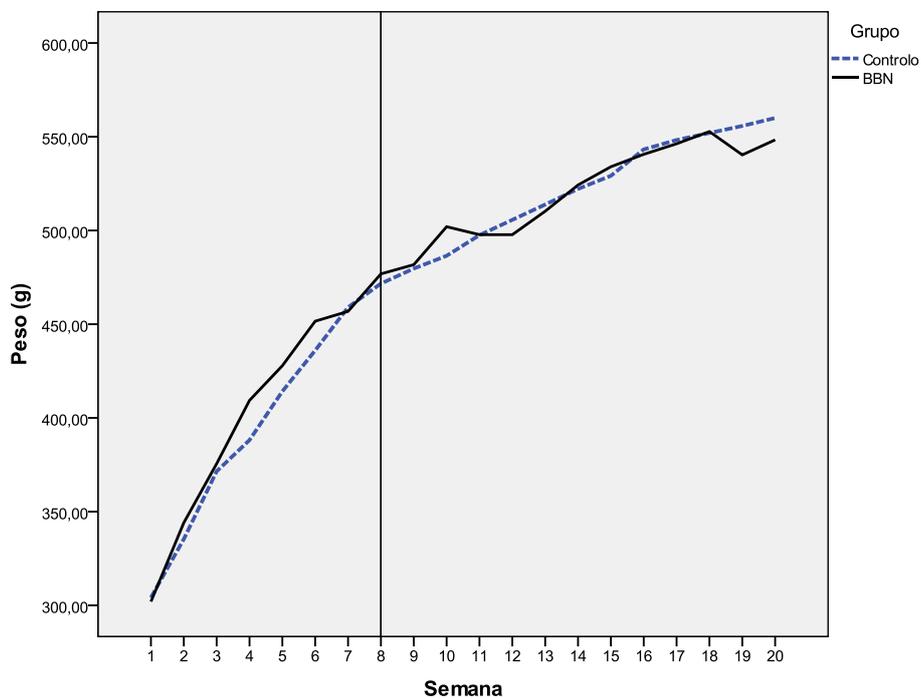


Figura 44: Evolução ponderal média (em g) dos ratos ao longo do estudo.

II: Fármacos Imunomoduladores

Os fármacos imunomoduladores estudados foram o Sirolimus e a Ciclosporina A, tendo-se formado os seguintes grupos:

a) Sirolimus

- i. Sirolimus Controlo (Sir)
- ii. Sirolimus 1 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Sir 1 PP)
- iii. Sirolimus 2 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Sir 2 PP)
- iv. Sirolimus 2 mg/kg/dia Prevenção Tardia (Sir 2 PT)

b) Ciclosporina A

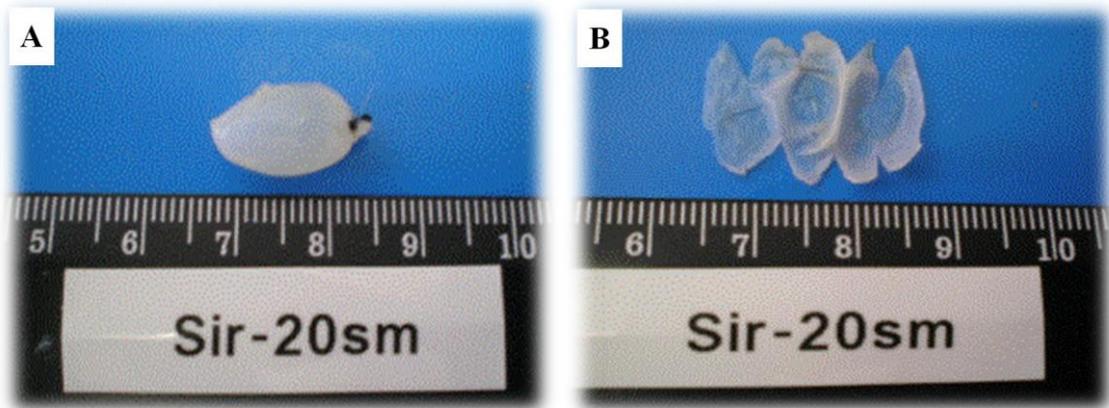
- i. Ciclosporina A Controlo (CsA)
- ii. Ciclosporina A 5 mg/kg/dia Prevenção Precoce (CsA PP)
- iii. Ciclosporina A 5 mg/kg/dia Prevenção Tardia (CsA PT)

A - BEXIGA

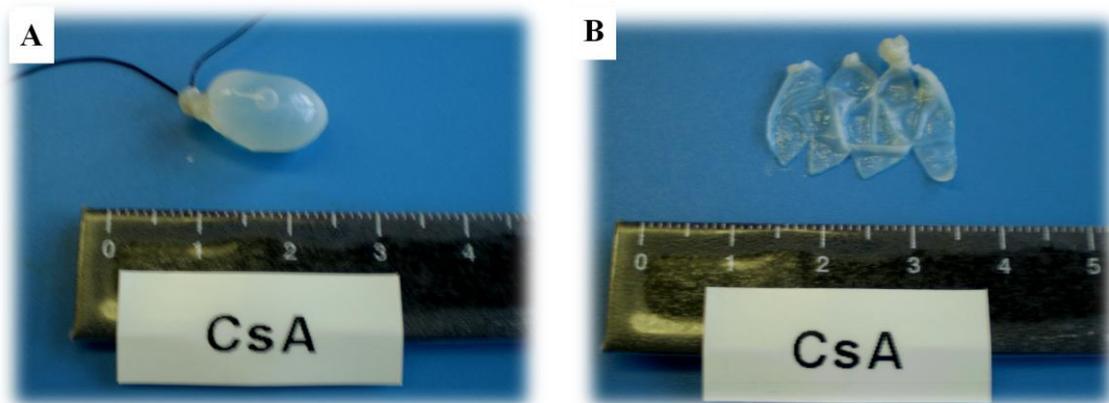
1. Anatomopatologia

1.1. Avaliação Macroscópica

Os controlos dos grupos Sirolimus e Ciclosporina A não apresentaram alterações vesicais macroscópicas evidentes, mesmo após o seu corte sagital (Figs. 45, 46).



Figuras 45 A-B: Aspecto macroscópico das bexigas do grupo Sirolimus Controlo, distendidas com formol (A) e após cortes sagitais (B).

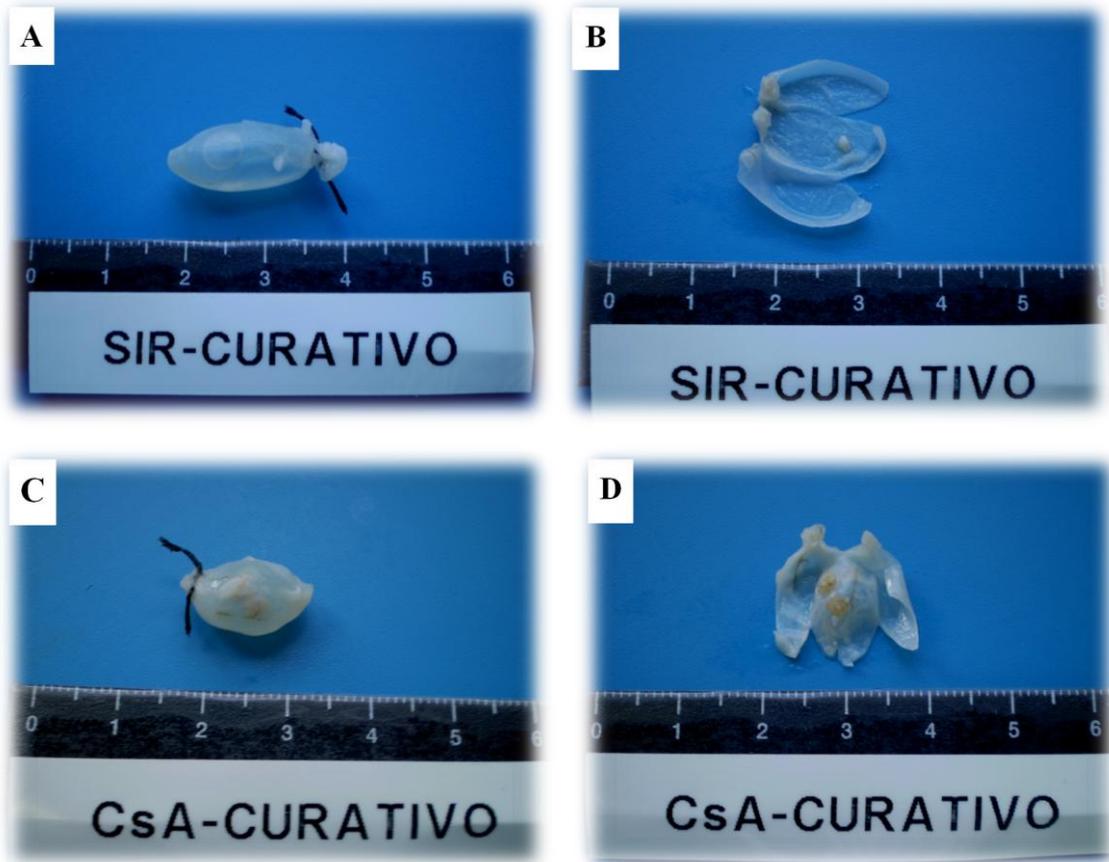


Figuras 46 A-B: Aspecto macroscópico das bexigas do grupo Ciclosporina A Controlo, distendidas com formol (A) e após cortes sagitais (B).

Macroscopicamente, as lesões tumorais nos animais a quem foi administrado o carcinogénio e tratados com imunomoduladores não se distinguiam entre si nem das do grupo BBN.

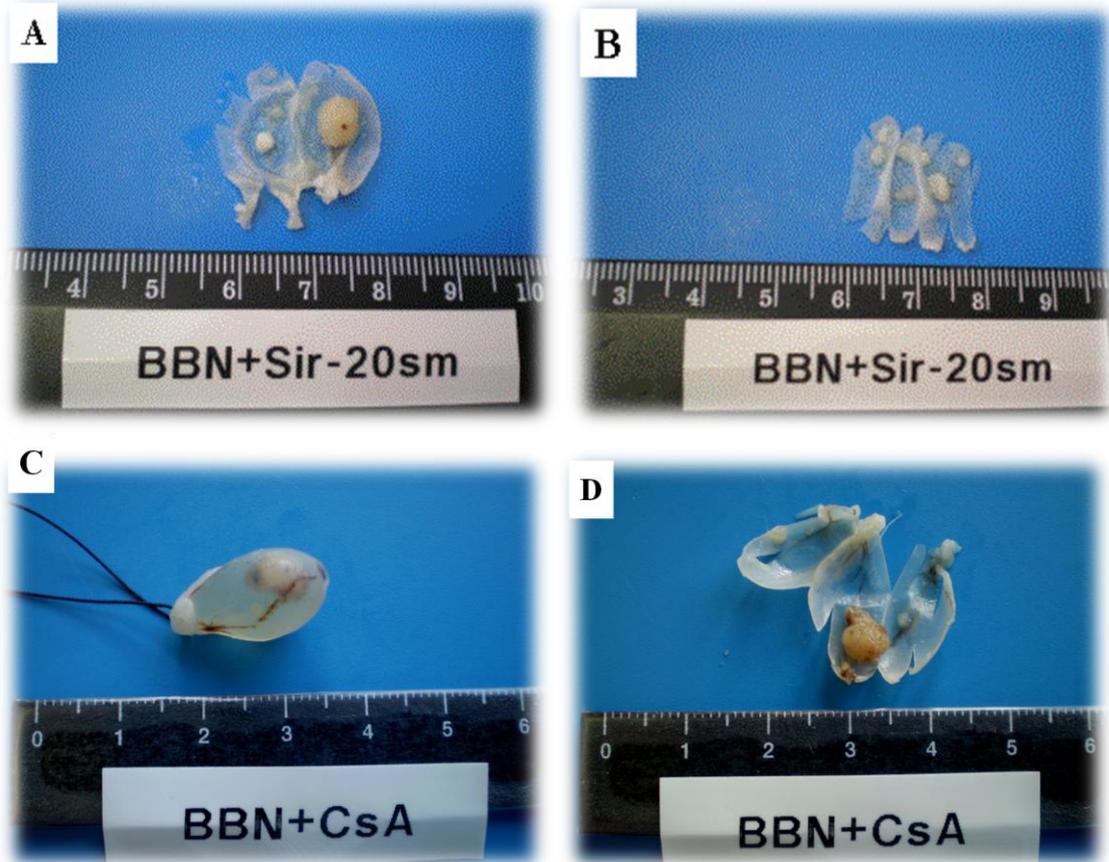
Eram lesões papilares, exofíticas e esbranquiçadas, com mucosa irregular, espessada e com hipervascularização. Tinham no geral menores dimensões do que os tumores do grupo carcinogénio, inferiores

.....
a 3-4 mm de maior eixo, frequentemente não indo além de 1-2 mm (Figs. 47A-D). Contudo, dois tumores do grupo Sir 1 PP atingiram 7-8 mm de maior eixo e dois do grupo CsA PP chegaram aos 8-9 mm.



Figuras 47 A-D: Aspecto macroscópico de bexigas com tumores de pequenas dimensões: 1-2 mm (Grupo Sir 2 PT: A, B); 3-4 mm (Grupo CsA PT: C, D).

Quando foi administrado Sir, à exceção do grupo Sir 2 PT, foram mais frequentes os tumores múltiplos, chegando mesmo a haver quatro, cinco e sete neoplasias na mesma bexiga. Apenas num caso do grupo CsA PP encontrámos mais de dois tumores simultâneos (quatro lesões) (Figs. 48A-D).



Figuras 48 A-D: Aspecto macroscópico de bexigas com múltiplos tumores (Grupo Sir 1 PP: A, B); (Grupo CsA PP: C, D).

Nas bexigas sem neoplasia, cerca de metade tinham parede vesical espessada, sendo as restantes finas e translúcidas.

Os restantes órgãos colhidos (fígado, rins, pulmões, estômago, coração) não tinham alterações macroscópicas sugestivas de doença tumoral metastática.

Os dados da avaliação macroscópica das bexigas dos ratos a quem foi administrado Sirolimus ou Ciclosporina A são apresentados nos Quadros 17 e 18, respectivamente.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Grupo	BBN	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PP	Sir 2 PT
Ratos com tumor	68% (17/25)	0% (0/4)	75% (9/12)	80% (8/10)	37,5% (3/8)
<i>p</i>	-	-	0,660	0,468	0,127
N.º de tumores					
Rato: \bar{x} (EP)	1 (0,16)	0	2,17 (0,59)	1,70 (0,47)	0,38 (0,18)
<i>p</i>	-	-	0,069	0,199	0,057
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	1,47 (0,13)	-	2,89 (0,61)	2,13 (0,48)	1,00 (0,00)
<i>p</i>	-	-	0,012	0,230	0,135
Min/Max	0/2	-	0/7	0/5	0/1
Volume Tumoral (mm³)					
Rato: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	0	31,95 (13,94)	2,57 (1,21)	0,26 (0,14)
<i>p</i>	-	-	0,627	0,275	0,026
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	100,46 (45,50)	-	39,06 (16,20)	3,21 (1,43)	0,69 (0,17)
<i>p</i>	-	-	0,713	0,006	0,016
Por tumor: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	-	15,13 (7,20)	1,56 (0,71)	0,69 (0,17)
<i>p</i>	-	-	0,025	0,000	0,016
Min/Max	0,52/732,16	-	2,06/134,68	0,52/12,60	0,52/1,04

Quadro 17: Resultados macroscópicos nos Grupos do Sirolimus (*p* vs grupo BBN).

.....
 A utilização de Sirolimus num contexto de prevenção precoce, quer na dose de 1 mg/kg/dia, quer na dose de 2 mg/kg/dia, não levou a uma diminuição da percentagem de ratos com tumor, tendo havido, pelo contrário, um aumento (Fig. 49). A mesma tendência foi observada no número médio de tumores por rato (Quadro 17).

Ao invés, a administração mais tardia de Sirolimus 2 mg/kg/dia, a partir da 9.^a semana, levou a decréscimo da percentagem de ratos com tumor de 68% para 37,5%, quando comparado com o grupo Carcinogénio, havendo, do mesmo modo, uma redução do número de tumores.

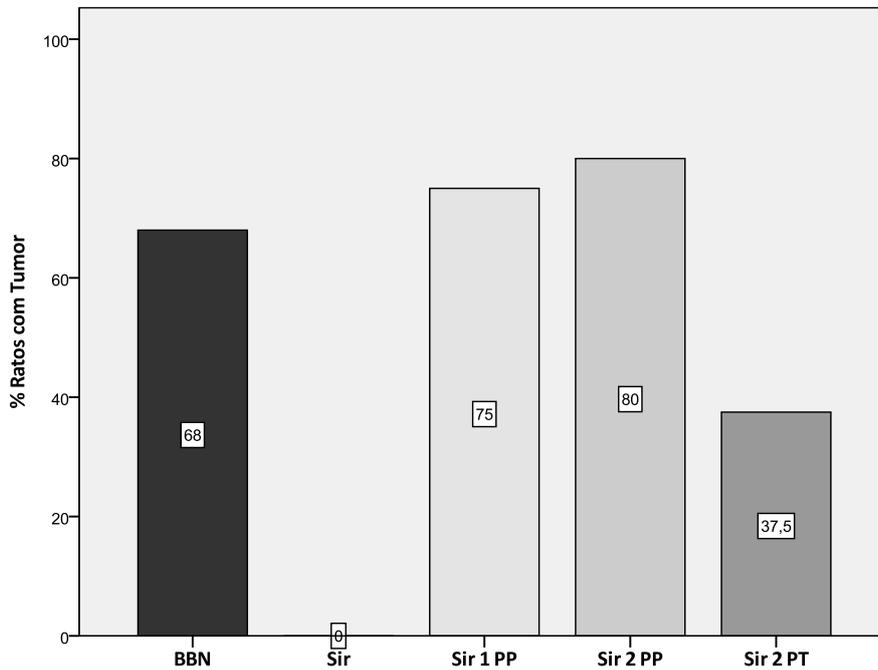


Figura 49: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos do Sirolimus.

Analisando o volume tumoral, houve uma redução em todos os grupos, quer se considere o volume tumoral por rato, o volume tumoral apenas em ratos com tumor ou mesmo o volume médio de cada tumor, embora apenas no grupo Sir 2 PT todas estas diferenças sejam estatisticamente significativas (Quadro 17 e Fig. 50).

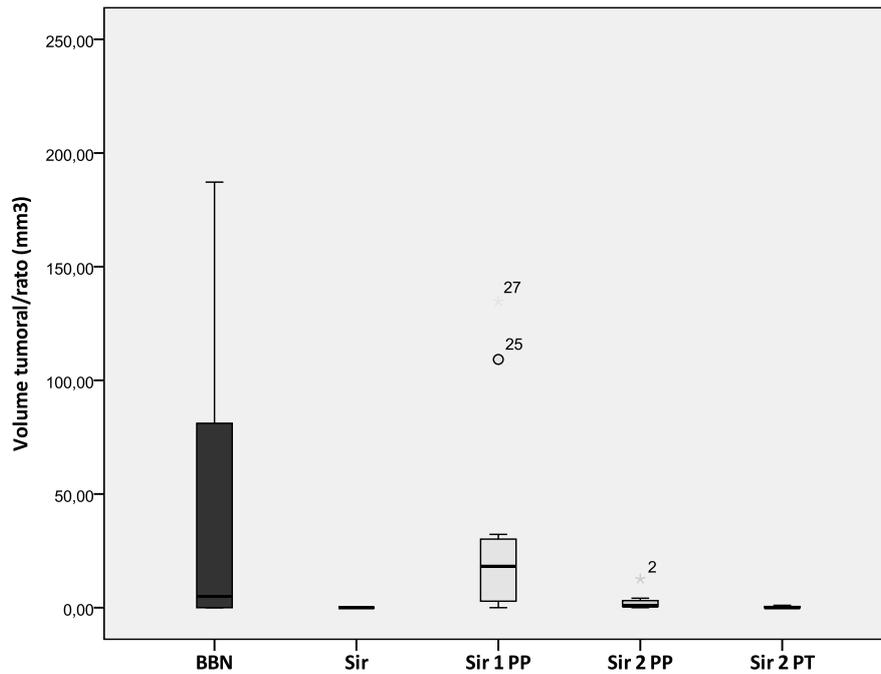


Figura 50: Volume tumoral médio/rato nos Grupos do Sirolimus.

Relativamente à Ciclosporina A, nem a sua utilização precoce (CsA PP), nem a sua utilização mais tardia (CsA PT) se associaram a uma redução estatisticamente significativa da incidência ou do número de neoplasias vesicais, embora no grupo CsA PT tenha havido uma diminuição de ambos os valores (Quadro 18 e Fig. 51).

Em ambos os grupos preventivos de Ciclosporina A houve uma redução dos volumes tumorais, bastante mais pronunciada no grupo CsA PT, embora não tenha atingido uma diferença estatisticamente significativa (Quadro 18 e Fig. 52).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Grupo	BBN	CsA	CsA PP	CsA PT
Ratos com tumor	68% (17/25)	0% (0/4)	62,5% (5/8)	50% (4/8)
<i>p</i>	-	-	0,775	0,363
N.º de tumores				
Rato: \bar{x} (EP)	1,00 (0,16)	0	1,13 (0,48)	0,63 (0,26)
<i>p</i>	-	-	0,842	0,255
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	1,47 (0,13)	-	1,80 (0,58)	1,25 (0,25)
<i>p</i>	-	-	0,929	0,434
Min/Max	0/2	-	0/4	0/2
Volume Tumoral (mm³)				
Rato: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	0	38,11 (24,26)	2,41 (1,78)
<i>p</i>	-	-	0,673	0,107
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	100,46 (45,50)	-	60,97 (36,04)	4,81 (3,30)
<i>p</i>	-	-	0,650	0,058
Por tumor: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	-	33,97 (21,61)	3,85 (1,50)
<i>p</i>	-	-	0,095	0,147
Min/Max	0,52/732,16	-	0,52/168,48	0,52/14,56

Quadro 18: Resultados macroscópicos nos Grupos da Ciclosporina A (*p* vs grupo BBN).

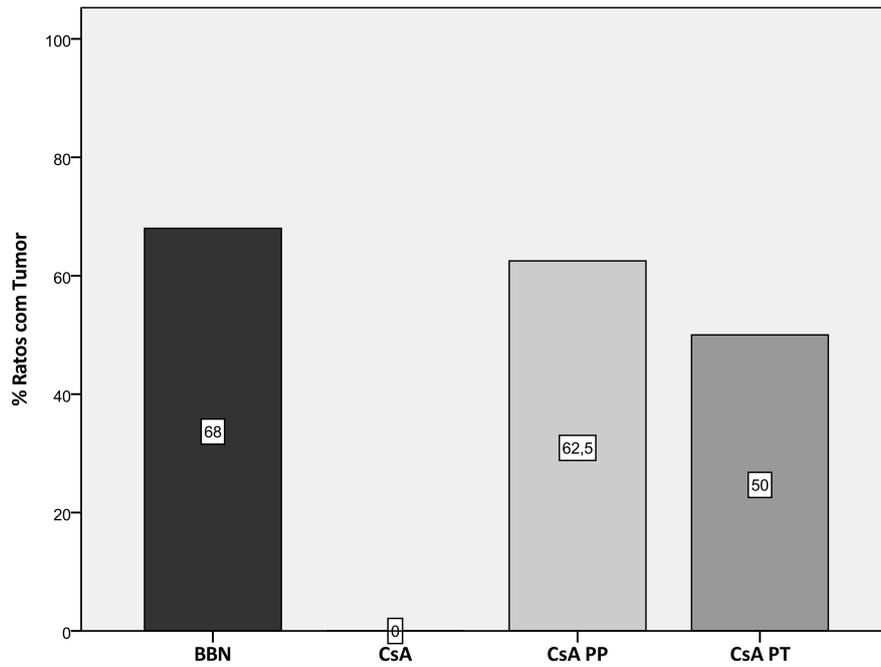


Figura 51: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos da Ciclosporina A.

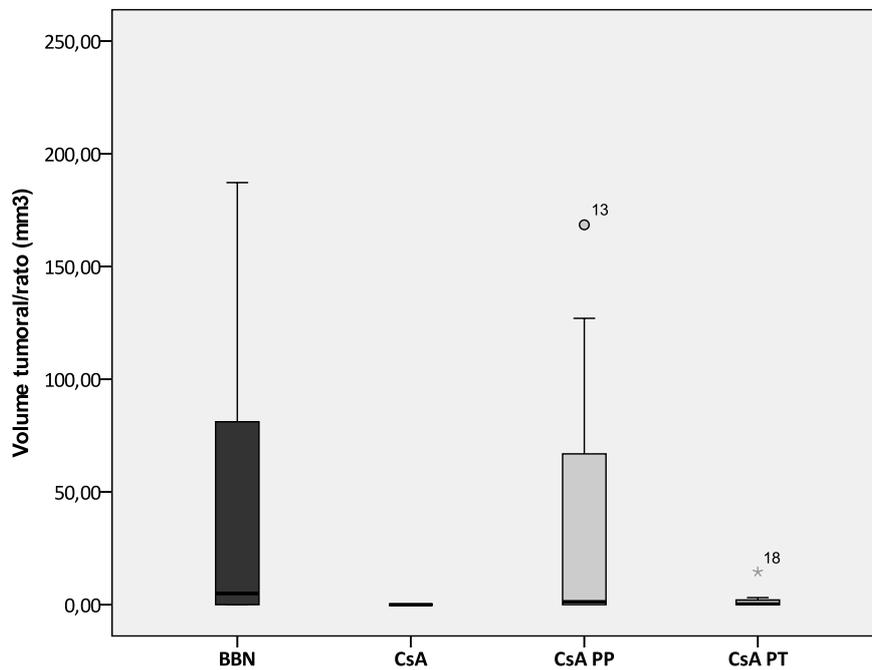


Figura 52: Volume tumoral médio/rato nos Grupos da Ciclosporina A.

1.2. Avaliação Histopatológica

Os resultados da avaliação histopatológica dos grupos do Sirolimus e da Ciclosporina A são apresentados nos Quadros 19 e 20.

As bexigas dos grupos controlos Sir e CsA eram revestidas em toda a sua extensão por urotélio normal, não tendo sido diagnosticadas alterações histológicas.

Nos restantes grupos, independentemente da existência, ou não, de lesões pré-neoplásicas ou mesmo neoplásicas, estavam presentes extensas áreas de urotélio normal em todos os animais estudados.

Analisando os grupos do Sirolimus (Quadro 19), observámos que, apesar de a diminuição das lesões de hiperplasia plana só ter ocorrido no grupo Sir 2 PT, a incidência de hiperplasia papilar foi menor em todos os grupos, embora em extensões diferentes. De igual modo, houve uma redução das lesões pré-neoplásicas, quer do Cis, quer sobretudo da displasia de alto grau nos grupos Sir 2 PP e Sir 2 PT. As lesões papilares, simples ou invertidas, também foram menos frequentes, estando mesmo totalmente ausentes dos animais do grupo Sir 2 PT, o único em que houve menos carcinomas uroteliais do que no grupo BBN.

Relativamente aos grupos da Ciclosporina A (Quadro 20), apesar de em nenhum deles se ter verificado uma redução acentuada da incidência de carcinoma urotelial, houve uma diminuição de algumas lesões hiperplásicas e pré-neoplásicas (Displasia de alto grau), bem como das lesões papilares.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Grupo	BBN (n=25)	Sir (n=4)	Sir 1 PP (n=12)	Sir 2 PP (n=10)	Sir 2 PT (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	12 (100%)	10 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	11 (91,7%)	10 (100%)	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,129	-	0,000
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	1 (8,3%)	3 (30%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,020	0,440	0,087
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	7 (58,3%)	10 (100%)	6 (75%)
<i>p</i>	-	-	0,893	0,002	0,328
Displasia	25 (100%)	0	12 (100%)	10 (100%)	8 (100%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	9 (75%)	2 (20%)	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,063	0,000	0,003
Carcinoma <i>in situ</i> (Cis)	13 (52%)	0	5 (41,7%)	3 (30%)	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	-	0,556	0,232	0,473
Papiloma	4 (16%)	0	0	1 (10%)	0
<i>p</i>	-	-	0,067	0,637	0,122
Papiloma invertido	6 (24%)	0	1 (8,3%)	0	0
<i>p</i>	-	-	0,228	0,034	0,053
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	9 (75%)	8 (80%)	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	-	0,660	0,468	0,127

Quadro 19: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos do Sirolimus (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Grupo	BBN (n=25)	CsA (n=4)	CsA PP (n=8)	CsA PT (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	5 (62,5%)	7 (87,5%)
<i>p</i>	-	-	0,002	0,087
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	1 (12,5%)	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,087	0,767
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	7 (87,5%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	0,087	0,005
Displasia	25 (100%)	0	8 (100%)	8 (100%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	5 (62,5%)	5 (62,5%)
<i>p</i>	-	-	0,020	0,020
Carcinoma <i>in situ</i> (Cis)	13 (52%)	0	2 (25%)	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,173	0,922
Papiloma	4 (16%)	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,122	0,122
Papiloma invertido	6 (24%)	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,053	0,053
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	5 (62,5%)	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,775	0,363

Quadro 20: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos da Ciclosporina (*p* vs grupo BBN).

Numa sub-análise, verificámos que as lesões histológicas pré-malignas, a displasia de alto grau (Quadro 21) e o Cis (Quadro 22), eram mais frequentes quando coexistia carcinoma urotelial.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

	Com Carcinoma	Sem Carcinoma	p
Sir 1 PP	7/9 (77,8%)	2/3 (66,7%)	0,706
Sir 2 PP	2/8 (25%)	0/2 (0%)	0,315
Sir 2 PT	3/3 100%)	1/5 (20%)	0,014
CsA PP	4/5 (80%)	1/3 (33,%)	0,184
CsA PT	3/4 (75%)	2/4 (50%)	0,462
Total	19/29 (65,5%)	6/17 (35,3%)	0,047

Quadro 21: Incidência de displasia de alto grau, nos grupos de imunomoduladores, em função da existência ou não de carcinoma urotelial.

	Com Carcinoma	Sem Carcinoma	p
Sir 1 PP	5/9 (55,6%)	0/3 (0%)	0,047
Sir 2 PP	3/8 (37,5%)	0/2 (0%)	0,201
Sir 2 PT	3/3 100%)	0/5 (0%)	0,001
CsA PP	1/5 (20%)	1/3 (33,3%)	0,676
CsA PT	2/4 (50%)	2/4 (50%)	-
Total	14/29 (48,3%)	3/17 (17,6%)	0,038

Quadro 22: Incidência de *Cis*, nos grupos de imunomoduladores, em função da existência ou não de carcinoma urotelial.

O estudo histológico dos carcinomas uroteliais nos grupos do Sirolimus não revelou diferenças estatisticamente significativas na profundidade de invasão ou no grau de diferenciação tumoral relativamente ao grupo BBN (Quadro 23). Em cinco casos do grupo Sir 1 PP coexistiam na mesma bexiga tumores de classificação histopatológica distinta: em três havia Ta baixo grau e TPBPM, num T1 alto grau associado a Ta alto grau e noutra T1 alto grau e Ta baixo grau. No grupo Sir 2 PP, apenas num caso coexistiram tumores distintos na mesma bexiga, concretamente um carcinoma T1 alto grau e um Ta alto grau. No grupo Sir 2 PT só havia um tumor por bexiga, em três animais. Quatro neoplasias do grupo Sir 1 PP e três do grupo Sir 2 PP não foram classificadas por dificuldades técnicas na preparação das lâminas ou necrose extensa.

Grupo	BBN (n=25)	Sir 1 PP (n=12)	Sir 2 PP (n=10)	Sir 2 PT (n=8)
TPBPM	4	3	1	0
<i>p</i>	-	0,519	0,652	0,235
Ta baixo grau	11	11	5	1
<i>p</i>	-	0,087	0,640	0,327
Ta alto grau	5	1	1	1
<i>p</i>	-	0,696	0,817	0,970
T1 alto grau	5	7	7	1
<i>p</i>	-	0,650	0,383	0,637

Quadro 23: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos do Sirolimus (*p* vs grupo BBN).

De igual modo, não foram encontradas diferenças histopatológicas entre os tumores dos grupos da Ciclosporina A e do BBN (Quadro 24). Numa bexiga do grupo CsA PP, coexistia um carcinoma T1 alto grau e um Ta alto grau. No grupo CsA PT, encontrámos uma neoplasia T1 alto grau associada a uma neoplasia Ta baixo grau.

Uma neoplasia do grupo CsA PP não foi classificada por dificuldades técnicas na preparação das lâminas.

Os carcinomas tinham frequentemente um crescimento invertido.

Grupo	BBN (n=25)	CsA PP (n=8)	CsA PT (n=8)
TPBPM	4	1	1
<i>p</i>	-	0,813	0,813
Ta baixo grau	11	0	2
<i>p</i>	-	0,099	0,707
Ta alto grau	5	6	1
<i>p</i>	-	0,029	0,970
T1 alto grau	5	1	1
<i>p</i>	-	0,637	0,637

Quadro 24: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos da Ciclosporina A (*p* vs grupo BBN).

2. Imunohistoquímica

A marcação imunohistoquímica para os três anticorpos, p-53, Ki67 e CD-31, nos grupos Sir 1 PP e Sir 2 PT, revelou diferenças em função da existência ou não de carcinoma urotelial concomitante (Quadro 25).

Grupo	BBN		Sir		SIR 1 PP		SIR 2 PT	
	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade
P53								
Urotélio Normal	50%	2+	0	0	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b	0	0
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	2+	-	-	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b	0 ^a /10 ^b %	0 ^a /1 ^b
Ki67								
Urotélio Normal	5%	2+	0	0	1-2 ^a /5-10 ^b %	1 ^a /2 ^b	1-2 ^a /5-10 ^b %	1 ^a /2 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	15 ^a /25 ^b %	2 ^a /3 ^b	-	-	5 ^a /25 ^b %	1 ^a /2 ^b	5 ^a /25 ^b %	1 ^a /2 ^b
CD31								
Urotélio Normal	50-75%	1+	0/<5%	0/1+	0	0	0	0
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	1 ^a /2 ^b	-	-	0 ^a /20 ^b %	0 ^a /1 ^b	0 ^a /20 ^b %	0 ^a /1 ^b

Quadro 25: Resultados da expressão imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD31, em função da % e da intensidade de células com imunomarcção, nos Grupos BBN, Sir 1 PP e Sir 2 PP. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

.....
A expressão nuclear de p53 foi sempre negativa, quer no urotélio normal, quer nas áreas hiperplásicas ou displásicas, quando não havia carcinoma (Fig. 53). Na presença de carcinoma, a reactividade era ligeira (1+) em 50% dos núcleos no grupo Sir 1 PP (Fig. 54) e em 10% no grupo Sir 2 PT, que foi também o que teve menor incidência de tumores e os de volume mais reduzido.

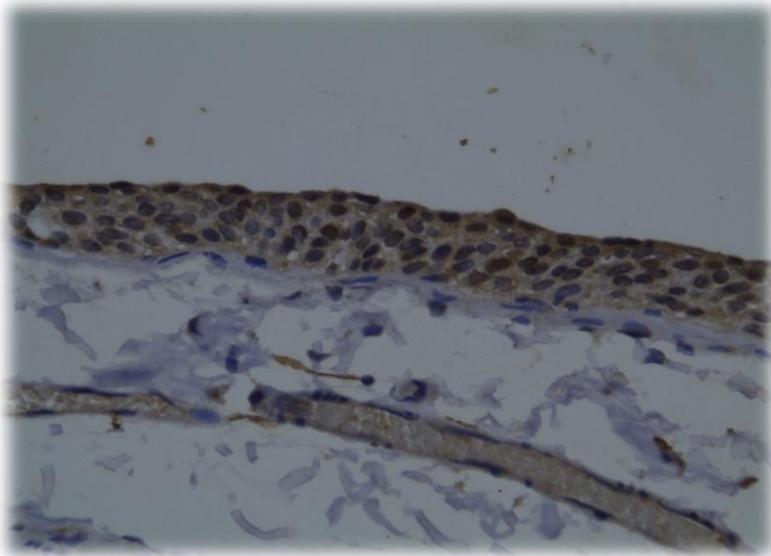


Figura 53: Imunorreactividade de p53 no urotélio normal nos grupos do Sirolimus, sem carcinoma concomitante (400X).

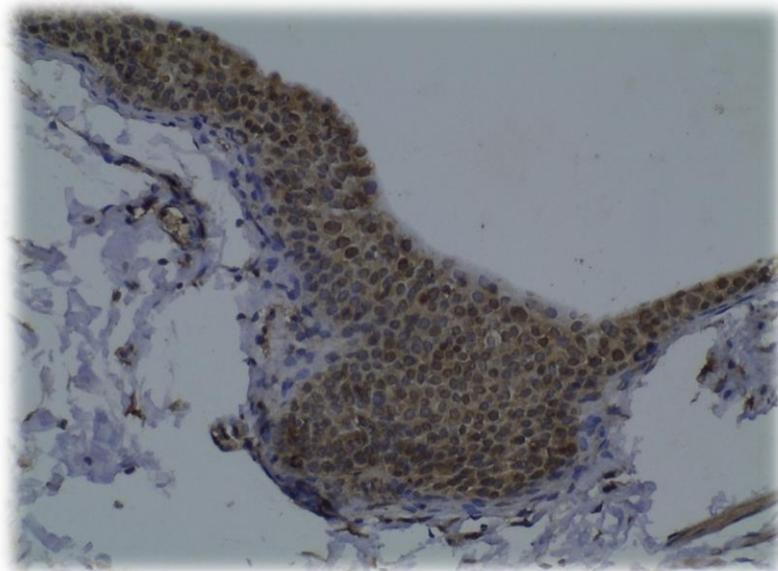


Figura 54: Imunorreactividade de p53 no urotélio hiperplásico e displásico no grupo Sir 1 PP, com carcinoma concomitante (200X).

.....
A imunoreatividade para o Ki67 foi também mais extensa e intensa quando coexistiam carcinomas uroteliais, em ambos os grupos Sir 1 PP e Sir 2 PT, como pode ser observado no quadro 25 e nas figuras 55 e 56.

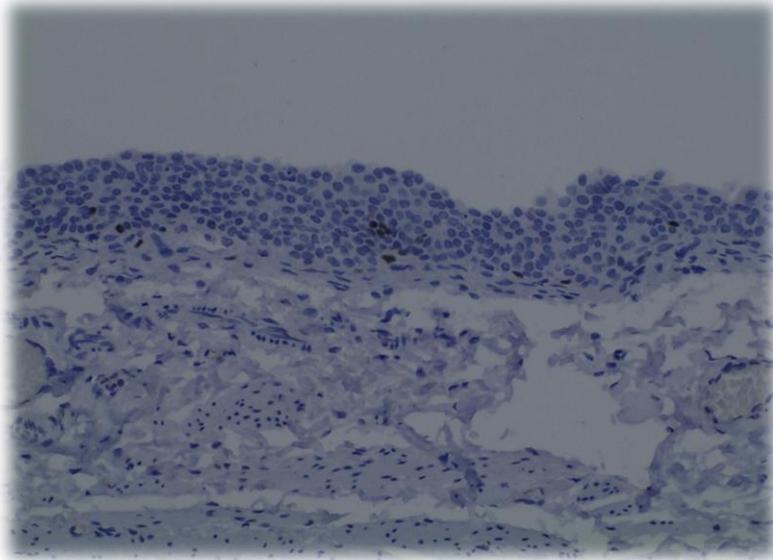


Figura 55: Imunoreatividade de Ki67 no urotélio hiperplásico e displásico nos grupos do Sirolimus, sem carcinoma concomitante (200X).

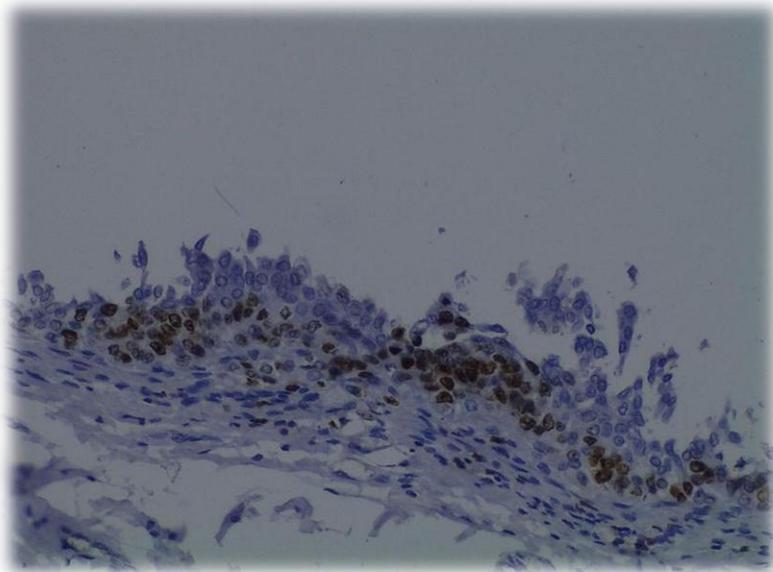


Figura 56: Imunoreatividade de Ki67 no urotélio hiperplásico e displásico nos grupos do Sirolimus, com carcinoma concomitante (200X).

Na ausência de carcinoma urotelial, a marcação de CD31 foi sempre negativa, independentemente de se tratar de urotélio normal ou de áreas de hiperplasia ou displasia (Fig. 57). Já na presença de tumor

.....
vesical, a marcação tornou-se positiva, não só nas áreas tumorais mas também nas áreas hiperplásicas ou displásicas envolventes (Fig. 58).

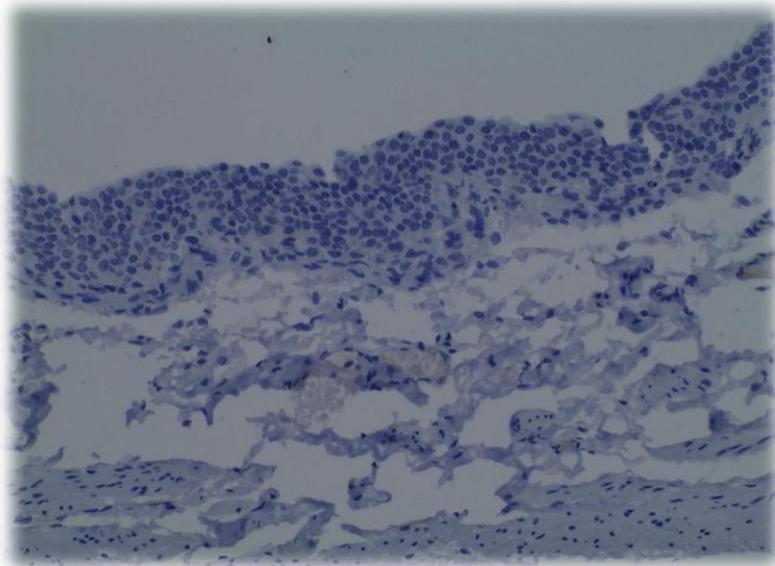


Figura 57: Imunoreactividade de CD31 no urotélio hiperplásico e displásico nos grupos do Sirolimus, sem carcinoma concomitante (200X).

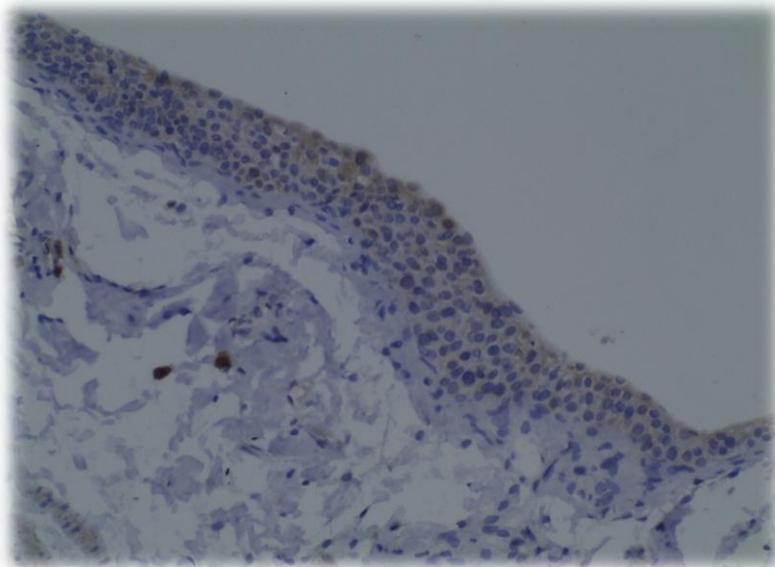


Figura 58: Imunoreactividade de CD31 no urotélio hiperplásico e displásico nos grupos do Sirolimus, com carcinoma concomitante (200X).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Nos grupos da Ciclosporina A, só obtivemos marcação imunohistoquímica para o grupo CsA PP. A imunorreactividade para p53, Ki67 e CD31 foi mais intensa e extensa quando estava presente um carcinoma urotelial (Quadro 26).

Grupo	BBN		CsA PP	
	%	Intensidade	%	Intensidade
P53				
Urotélio Normal	50%	2+	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	2+	0 ^a /75 ^b %	0 ^a /2 ^b
Ki67				
Urotélio Normal	5%	2+	5 ^a /5-10 ^b %	1 ^a /2 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	15 ^a /25 ^b %	2 ^a /3 ^b	5 ^a /20 ^b %	1 ^a /2 ^b
CD31				
Urotélio Normal	50-75%	1+	0	0
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	1 ^a /2 ^b	0 ^a /20 ^b %	0 ^a /1 ^b

Quadro 26: Resultados da expressão imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD31, em função da % e da intensidade de células com imunomarcção, nos Grupos BBN e CsA PP. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

3. Expressão Génica

Nos resultados de expressão génica dos grupos do Sirolimus, apresentados no Quadro 27, destacaríamos uma diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2* e um aumento dos genes pró-apoptose *Bax-2* e *Casp-3* no grupo Sir 2 PT, o que não se verificou em nenhum outro grupo.

Nesse mesmo grupo obteve-se igualmente uma redução de genes promotores da proliferação celular *Ki67* e *Ccnd3* assim como do proto-oncogene *Hras* e de *VEGF*.

O gene de *Cox-2* teve expressão aumentada no grupo Sir 1 PP, diminuída no grupo Sir 2 PP e ausente no grupo Sir 2 PT.

Só houve expressão de *p53* no grupo BBN.

Grupo	BBN	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PP	Sir 2 PT
Arf-1	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão	0,450 (2,388)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Bax-2	Sem expressão	0,050 (0,080)	Sem expressão	Sem expressão	4,570 (1,270)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Bcl-2	3,200 (3,110)	6,980 (2,930)	5,370 (4,540)	1,475 (0,605)	0,135 (0,085)
<i>p</i>	-	0,221	0,439	0,677	0,439
Casp-3	Sem expressão	0,010 (0)	Sem expressão	Sem expressão	4,425 (2,205)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Ccnd3	-0,325 (0,305)	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão	-0,606 (0,138)
<i>p</i>	-	-	-	-	0,317
Cox-2	1,345 (1,225)	Sem expressão	3,144 (2,005)	1,055 (0,175)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	0,221	0,852	-
Hras	1,130 (0,030)	0,080 (0,010)	Sem expressão	Sem expressão	0,881 (0,317)
<i>p</i>	-	0,317	-	-	0,317
Ki67	-0,316 (0,248)	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão	-1,222 (0,092)
<i>p</i>	-	-	-	-	0,317
p53	-0,403 (0,159)	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-	-
VEGF	0,912 (0,288)	0,080 (0,010)	1,095 (0,835)	1,800 (1,210)	0,560 (0,050)
<i>p</i>	-	0,157	0,865	0,643	0,355

Quadro 27: Resultados de expressão génica nos Grupos do Sirolimus

(*Expression Ratio*); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Quanto aos grupos da Ciclosporina, Quadro 28, há uma redução da expressão génica de *Bcl-2*, *Cox-2* e *VEGF* nos grupos CsA PP e CsA PT. Os genes *Ccnd3*, *Hras*, *Ki67* e *P53* apresentam expressão aumentada no grupo CsA PP e diminuída no grupo CsA PT.

Grupo	BBN	CsA	CsA PP	CsA PT
Arf-1	Sem expressão	Sem expressão	0,111 (0,006)	0,062 (1,088)
<i>p</i>	-	-	-	-
Bcl-2	3,200 (3,110)	0,540 (0,760)	0,365 (0,335)	0,410 (0,030)
<i>p</i>	-	0,780	0,439	0,501
Ccnd3	-0,325 (0,305)	Sem expressão	0,088 (0,021)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	0,221	-
Cox-2	1,345 (1,225)	0,617 (0,880)	0,100 (0,100)	0,030 (0,010)
<i>p</i>	-	0,821	0,662	0,647
Hras	1,130 (0,030)	Sem expressão	2,200 (1,150)	0,520 (1,370)
<i>p</i>	-	-	0,221	0,317
Ki67	-0,316 (0,248)	Sem expressão	0,340 (0,432)	-0,454 (0,052)
<i>p</i>	-	-	0,542	0,317
P53	-0,403 (0,159)	Sem expressão	0,403 (0,435)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	0,317	-
VEGF	0,912 (0,288)	0,240 (0,186)	0,305 (0,035)	0,605 (0,215)
<i>p</i>	-	0,080	0,064	0,643

Quadro 28: Resultados de expressão génica nos Grupos da Ciclosporina A (Expression Ratio); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

B: Sangue e derivados

1. Marcadores Séricos

Não houve diferenças nos valores dos marcadores séricos nos grupos BBN e controlo do Sirolimus (Sir) (Quadro 29).

No grupo Sir 1 PP todos os marcadores foram mais elevados do que no grupo BBN, com diferenças estatisticamente significativas para TGF- β , TNF- α e PCR.

Relativamente ao grupo Sir 2 PT, houve uma diminuição com significado estatístico de TGF- β e um aumento de TNF- α .

Nos marcadores inflamatórios, houve aumento de IL-1 β e uma diminuição de PCR, embora sem atingir significado estatístico, quando comparados com os resultados do grupo BBN. Não houve doseamento de IL-6 e IL-10 no grupo Sir 2 PT por dificuldades técnicas no processamento das amostras.

No grupo Controlo da Ciclosporina (CsA), obteve-se um valor de TGF- β significativamente inferior ao do grupo BBN (Quadro 30). Já no grupo CsA PP não houve diferenças relevantes relativamente aos animais do modelo carcinogénico enquanto no grupo CsA PT o valor de IL-1 β foi significativamente mais elevado.

Não houve doseamento de IL-6 e IL-10 nos grupos CsA, CsA PP e CsA PT por dificuldades técnicas no processamento das amostras.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

Grupo	BBN	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PT
TGF-β	437,271 (11,400)	403,680 (12,718)	476,888 (5,517)	340,060 (34,273)
<i>p</i>	-	0,080	0,006	0,023
TNF-α	9,912 (0,250)	10,840 (0,452)	11,262 (0,440)	15,177 (4,651)
<i>p</i>	-	0,076	0,015	0,010
PCR	111,162 (3,059)	117,700 (3,261)	123,186 (3,198)	103,214 (6,409)
<i>p</i>	-	0,189	0,018	0,227
IL-1β	17,950 (0,799)	19,050 (0,866)	19,750 (0,848)	22,833 (2,176)
<i>p</i>	-	0,416	0,145	0,024
IL-6	92,614 (4,460)	104,900 (7,674)	100,000 (9,591)	-
<i>p</i>	-	0,138	0,465	
IL-10	15,867 (0,966)	14,200 (0,500)	16,550 (0,947)	-
<i>p</i>	-	0,289	0,629	

Quadro 29: Resultados dos marcadores séricos nos Grupos do Sirolimus (em pg/ml, à exceção de PCR, em mg/ml); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	CsA	CsA PP	CsA PT
TGF-β	437,271 (11,400)	324,684 (20,371)	383,062 (29,032)	401,716 (34,227)
<i>p</i>	-	0,001	0,116	0,254
TNF-α	9,912 (0,250)	11,467 (1,910)	11,198 (0,920)	11,312 (0,432)
<i>p</i>	-	0,477	0,214	0,313
PCR	111,162 (3,059)	100,383 (5,361)	91,770 (8,596)	111,624 (1,613)
<i>p</i>	-	0,088	0,052	0,921
IL-1β	17,950 (0,799)	24,050 (2,450)	26,800 (1,850)	27,767 (4,534)
<i>p</i>	-	0,067	0,120	0,007

Quadro 30: Resultados dos marcadores séricos nos Grupos da Ciclosporina A (em g/ml, à exceção de PCR, em mg/ml); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

2. Marcadores de Equilíbrio Oxidativo

A administração isolada de Sirolimus (Grupo Sir), induziu uma peroxidação lipídica mais elevada (MDA), compensada por um valor de TAS também superior, daí tendo resultado uma relação MDA/TAS sem diferenças com o grupo do BBN (Quadro 31).

No grupo Sir 1 PP não houve diferenças nos vários marcadores de equilíbrio oxidativo estudados. Já no grupo Sir 2 PT houve um aumento do estado antioxidante (TAS), o que levou a uma relação MDA/TAS mais favorável (Fig. 59-A).

Em todos os grupos da Ciclosporina A houve um aumento de MDA, sem alterações do TAS, daí resultando uma relação MDA/TAS mais elevada do que no grupo BBN, embora só no grupo CsA essas diferenças sejam estatisticamente significativas (Quadro 32 e Fig. 59-B).

Em nenhum dos grupos se verificaram diferenças nos valores de 3-NT.

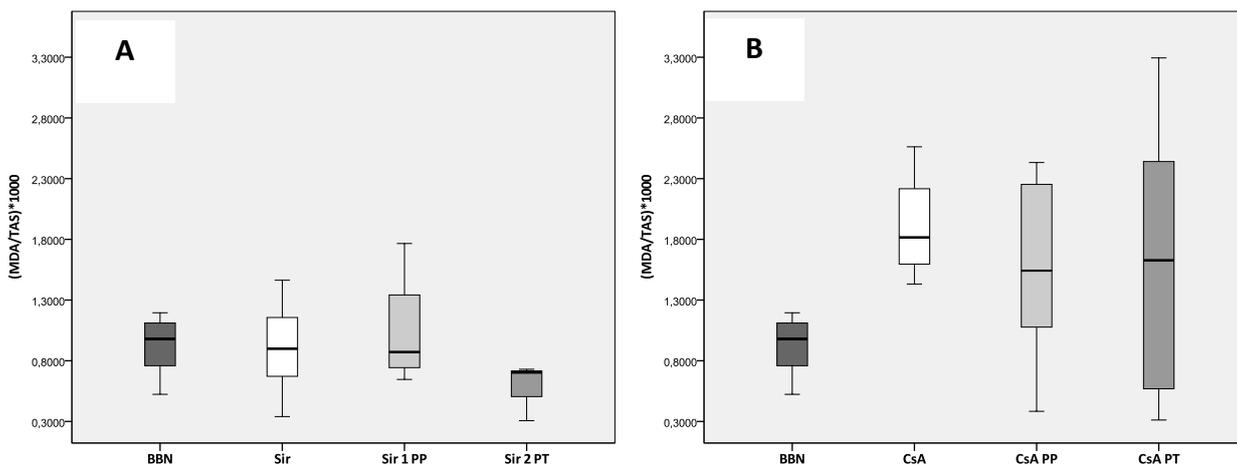


Figura 59 A-B: Valores de MDA/TAS nos grupos do Sirolimus (A) e da Ciclosporina A (B).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

.....

Grupo	BBN	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PT
MDA	0,465 (0,033)	0,645 (0,041)	0,538 (0,050)	0,413 (0,114)
<i>p</i>	-	0,012	0,309	0,530
TAS	523,500 (44,970)	894,714 (245,402)	587,071 (102,757)	709,476 (71,034)
<i>p</i>	-	0,207	0,580	0,058
MDA/TAS	0,927 (0,081)	0,906 (0,193)	1,041 (0,141)	0,580 (0,137)
<i>p</i>	-	0,910	0,496	0,054
3-NT	33,458 (3,598)	38,878 (5,772)	37,086 (6,560)	38,909 (14,773)
<i>p</i>	-	0,416	0,637	0,741

Quadro 31: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos do Sirolimus; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	CsA	CsA PP	CsA PT
MDA	0,465 (0,033)	0,809 (0,107)	0,724 (0,126)	0,651 (0,151)
<i>p</i>	-	0,009	0,079	0,137
TAS	523,500 (44,970)	434,000 (57,276)	537,775 (99,085)	490,428 (113,755)
<i>p</i>	-	0,264	0,893	0,758
MDA/TAS	0,927 (0,081)	1,906 (0,238)	1,574 (0,294)	1,649 (0,561)
<i>p</i>	-	0,001	0,072	0,269
3-NT	33,458 (3,598)	25,394 (9,730)	33,733 (4,964)	41,221 (3,584)
<i>p</i>	-	0,357	0,965	0,206

Quadro 32: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos da Ciclosporina A; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

3. Hemograma

Nos grupos do Sirolimus, os valores médios do hemograma estavam todos dentro dos intervalos de referência considerados normais para a estirpe, sexo e idade, apesar de haver diferenças estatisticamente significativas nalguns valores entre o grupo Controlo e o grupo Sir 2 PT (Quadro A3, Apêndice 8).

De igual modo, não houve alterações do hemograma nos animais dos grupos da Ciclosporina A (Quadro A4, Apêndice 8).

Numa análise individual, pudemos verificar que nenhum dos animais dos grupos do Sirolimus ou da Ciclosporina A apresentava qualquer alteração no hemograma.

4. Parâmetros Bioquímicos

Nos controlos tratados com Sirolimus, o estudo bioquímico mostrou alterações do perfil lipídico, com elevação do colesterol total e dos triglicerídeos. Neste grupo detectou-se também uma elevação de TGP e de TGO, sendo este último o único parâmetro alterado em todos os outros grupos em que foi utilizado este inibidor de *m-TOR*. Os restantes valores estavam dentro dos parâmetros normais (Quadro A5, Apêndice 8).

Nos animais a quem foi administrada Ciclosporina A, destacamos uma elevação dos valores de ácido úrico nos grupos CsA PP e CsA PT, embora sem significado estatístico. No estudo da função hepática, encontramos um aumento isolado de TGO no grupo CsA PT. A referir ainda uma redução generalizada e significativa dos triglicerídeos e, de forma menos acentuada, do colesterol total e não-HDL (Quadro A6, Apêndice 8).

.....
C: Bebida Ingerida e Pesos Corporais

Não houve diferenças no consumo semanal de bebida entre os grupos, quer consideremos a duração total do modelo experimental, quer se analisem as duas fases do estudo separadamente (Quadros 33 e 34).

Não houve diferenças na quantidade de comida consumida.

Não havia diferenças estatisticamente significativas nos pesos iniciais dos ratos dos diversos grupos.

Nos grupos do Sirolimus, verificou-se que durante a 1.^a Fase do estudo, houve um menor ganho ponderal nos grupos que estavam a tomar o fármaco (Grupos Sir e Sir 1 PP), enquanto no grupo Sir 2 PT, não houve diferenças relevantes, comparativamente ao grupo BBN. Na 2.^a Fase, houve uma recuperação ponderal no grupo Sir 1 PP, que suspendeu a toma do Sirolimus, enquanto no grupo Sir 2 PT, que iniciou a toma do medicamento, houve um atraso de crescimento, mais acentuado nas semanas finais do estudo (Quadro 35 e Fig. 60).

Os animais do grupo da Ciclosporina têm um peso ligeiramente inferior ao dos do grupo BBN, sem significado estatístico, constante ao longo do estudo e sem diferenças entre os vários grupos (Quadro 36 e Fig. 61).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

.....

Grupo	BBN	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PT
Bebida 0-20S	0,75(0,03)	0,68(0,03)	0,67(0,03)	0,80(0,04)
<i>p</i>	-	0,125	0,072	0,345
Bebida 0-8S	0,88(0,04)	0,79(0,04)	0,77(0,04)	0,91(0,07)
<i>p</i>	-	0,158	0,085	0,700
Bebida 9-20S	0,67(0,02)	0,61(0,03)	0,62(0,02)	0,73(0,03)
<i>p</i>	-	0,109	0,133	0,149

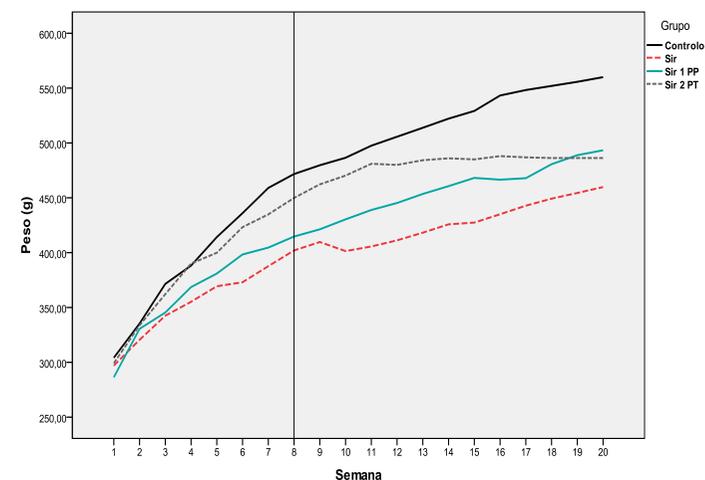
Quadro 33: Bebida média semanal por rato (em ml/g peso): durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos do Sirolimus; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	CsA	CsA PP	CsA PT
Bebida 0-20S	0,75(0,03)	0,81(0,05)	0,81(0,04)	0,75(0,06)
<i>p</i>	-	0,303	0,264	0,990
Bebida 0-8S	0,88(0,04)	0,98(0,04)	0,97(0,04)	0,99(0,06)
<i>p</i>	-	0,102	0,113	0,123
Bebida 9-20S	0,67(0,02)	0,71(0,05)	0,73(0,04)	0,61(0,06)
<i>p</i>	-	0,461	0,239	0,358

Quadro 34: Bebida média semanal (em ml) por rato: durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos da Ciclosporina A; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

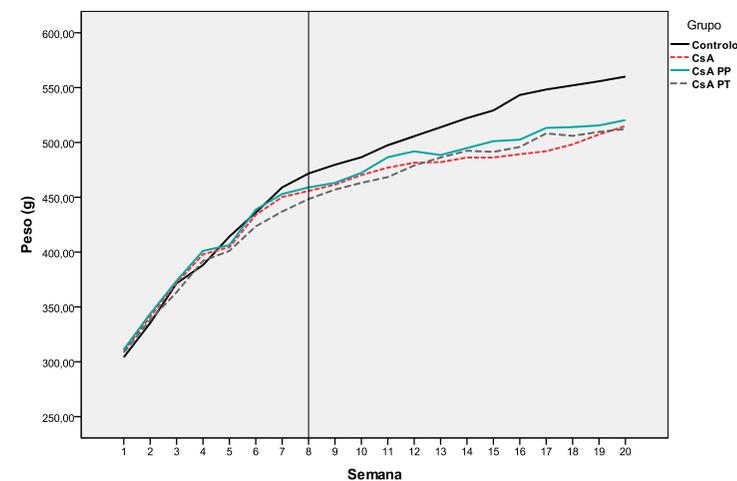
II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Imunomoduladores

	Grupo	Controlo	Sir	Sir 1 PP	Sir 2 PT
Peso inicial (g)	\bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	297,0 (5,0)	286,3 (3,3)	299,1 (2,5)
↑ peso	semana 0-8 (%)	55,07	35,35	44,82	50,40
↑ peso	semana 9-20 (%)	29,04	19,46	27,47	12,15
↑ peso	semana 0-20 (%)	84,11	54,81	72,29	62,55



Quadro 35 e figura 60: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos do Sirolimus.

	Grupo	Controlo	CsA	CsA PP	CsA PT
Peso inicial (g)	\bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	310,0 (4,7)	311,2 (2,2)	308,5 (2,3)
↑ peso	semana 0-8 (%)	55,07	47,02	47,47	45,34
↑ peso	semana 9-20 (%)	29,04	19,11	19,72	20,71
↑ peso	semana 0-20 (%)	84,11	66,13	67,19	66,05



Quadro 36 e figura 61: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos da Ciclosporina A.

III: Fármacos Inibidores das Ciclooxygenases

Os fármacos inibidores das ciclooxigenases estudados foram o Celecoxib e o AAS, tendo-se formado os seguintes grupos:

- a) Celecoxib
 - i. Celecoxib Controlo (Celecox)
 - ii. Celecoxib 1 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Celecox 1 PP)
 - iii. Celecoxib 10 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Celecox 10 PP)
 - iv. Celecoxib 10 mg/kg/dia Prevenção Tardia (Celecox 10 PT)

- b) AAS
 - i. AAS Controlo (AAS)
 - ii. AAS 25 mg/kg/dia Prevenção Precoce (AAS 25 PP)
 - iii. AAS 250 mg/kg/dia Prevenção Precoce (AAS 250 PP)

.....
A - BEXIGA

1. Anatomopatologia

1.1. Avaliação Macroscópica

Os controlos dos grupos Celecoxib e AAS não apresentaram alterações vesicais macroscópicas.

Nos restantes grupos, os tumores, quando presentes, apresentavam as características já anteriormente descritas. Contudo, devemos salientar uma parede vesical menos espessada e com hipervascularização menos marcada.

À exceção de três tumores, num rato do grupo Celecox 10 PT, que tinham volumes superiores a 40 mm³, ocupando parte significativa da bexiga, todas as outras neoplasias, dos grupos Celecoxib e AAS, tinham tamanhos reduzidos, com maior eixo inferior a 3 mm.

Num rato do grupo Celecox 10 PP e em dois do grupo AAS 25 PP havia dois tumores vesicais. Num caso do grupo Celecox 10 PT encontramos quatro tumores simultâneos, três deles de grandes dimensões, como atrás foi referido.

Nas bexigas sem neoplasia, apenas foi observado espessamento parietal e hipervascularização em dois casos, todos dos grupos do Celecoxib, sendo as outras finas e translúcidas.

Os restantes órgãos colhidos (fígado, rins, pulmões, estômago, coração) não tinham alterações macroscópicas sugestivas de doença tumoral metastática.

Os dados da avaliação macroscópica das bexigas dos ratos a quem foi administrado Celecoxib ou AAS são apresentados nos Quadros 37 e 38, respectivamente.

A utilização de Celecoxib num contexto de prevenção precoce, nas doses de 1 e 10 mg/kg/dia, levou não só a uma redução significativa do número de ratos com tumor (Fig. 62), apenas um em oito, mas também a menor número de tumores e volume tumoral (Fig. 63).

Pelo contrário, a administração mais tardia deste fármaco, entre a semana 9 e a semana 20, na dose de 10 mg/kg/dia (Grupo Celecox 10 PT) não trouxe qualquer benefício na prevenção do carcinoma vesical.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN (n=25)	Celecox (n=4)	Celecox 1 PP (n=8)	Celecox 10 PP (n=8)	Celecox 10 PT (n=8)
Ratos com tumor	68% (17/25)	0% (0/4)	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	62,5% (5/8)
<i>P</i>	-	-	0,004	0,004	0,775
N.º de tumores					
Rato: \bar{x} (EP)	1 (0,16)	0	0,13 (0,12)	0,25 (0,25)	1 (0,46)
<i>P</i>	-	-	0,007	0,021	0,562
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	1,47 (0,13)	-	1	2	1,60 (0,60)
<i>P</i>	-	-	0,371	0,317	0,497
Min/Max	0/2	-	0/1	0/2	0/4
Volume Tumoral (mm³)					
Rato: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	0	0,13 (0,13)	1,04 (1,04)	32,82 (17,25)
<i>P</i>	-	-	0,007	0,014	0,657
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	100,46 (45,50)	-	1,04	8,32	52,52 (23,98)
<i>P</i>	-	-	0,184	0,759	0,620
Por tumor: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	-	1,04	4,16 (2,08)	32,82 (16,25)
<i>P</i>	-	-	0,209	0,438	0,540
Min/Max	0,52/732,16	-	-	2,08/6,24	2,08/104

Quadro 37: Resultados macroscópicos nos Grupos do Celecoxib (*p* vs grupo BBN).

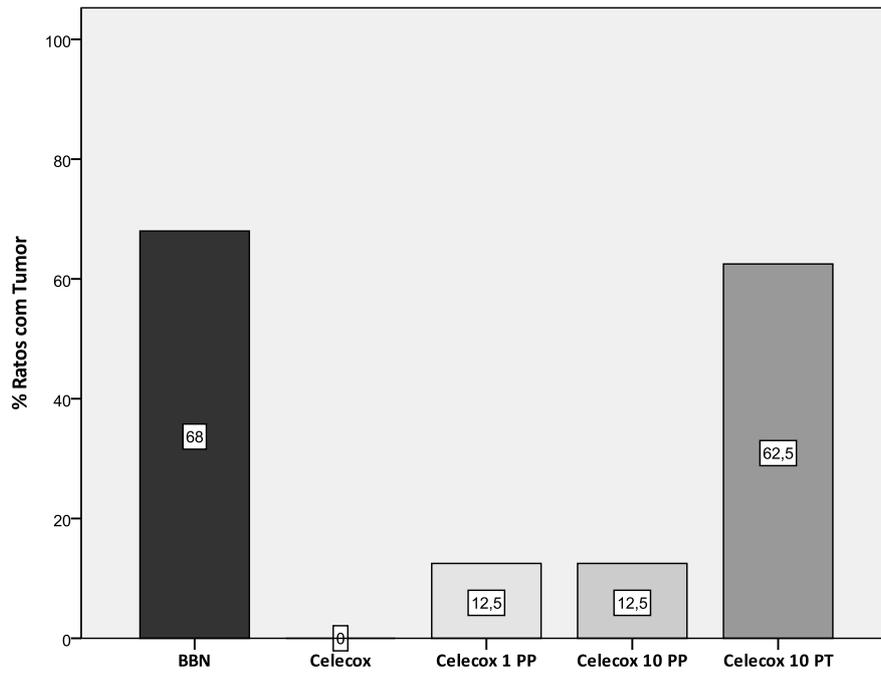


Figura 62: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos do Celecoxib.

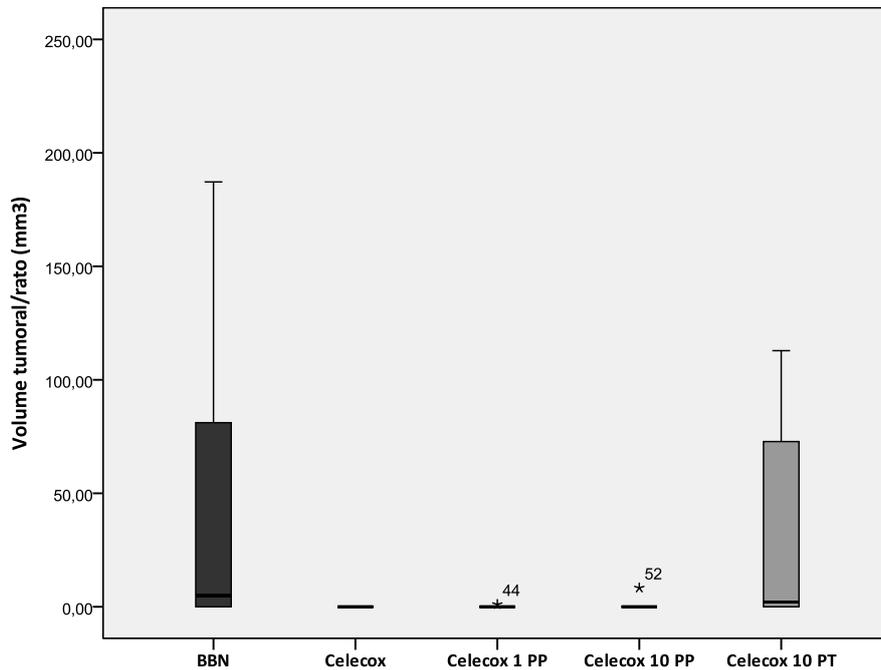


Figura 63: Volume tumoral médio/rato nos Grupos do Celecoxib.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Relativamente ao AAS, administrado entre a semana um e a semana oito, ambas as doses utilizadas se associaram a uma diminuição do tumor vesical (Fig. 64). Contudo, a dose de 250 mg/kg/dia teve uma redução mais significativa do que a dose de 25 mg/kg/dia, não só na incidência de neoplasias vesicais (12,5 vs 37,5%) mas também no número de tumores e no volume tumoral (Fig. 65).

Grupo	BBN (n=25)	AAS (n=4)	AAS 25 PP (n=8)	AAS 250 PP (n=8)
Ratos com tumor	68% (17/25)	0% (0/4)	37,5% (3/8)	12,5% (1/8)
<i>p</i>	-	-	0,127	0,004
N.º de tumores				
Rato: \bar{x} (EP)	1 (0,16)	0	0,63 (0,32)	0,13 (0,12)
<i>p</i>	-	-	0,255	0,007
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	1,47 (0,13)	-	1,67 (0,33)	1
<i>p</i>	-	-	0,542	0,371
Min/Max	0/2	-	0/2	0/1
Volume Tumoral (mm³)				
Rato: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	0	1,17 (0,66)	0,13 (0,13)
<i>p</i>	-	-	0,047	0,007
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	100,46 (45,50)	-	3,12 (1,04)	1,04
<i>p</i>	-	-	0,073	0,184
Por tumor: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	-	1,87 (0,39)	1,04
<i>p</i>	-	-	0,039	0,209
Min/Max	0,52/732,16	-	1,04/3,12	-

Quadro 38: Resultados macroscópicos nos Grupos do AAS (*p* vs grupo BBN).

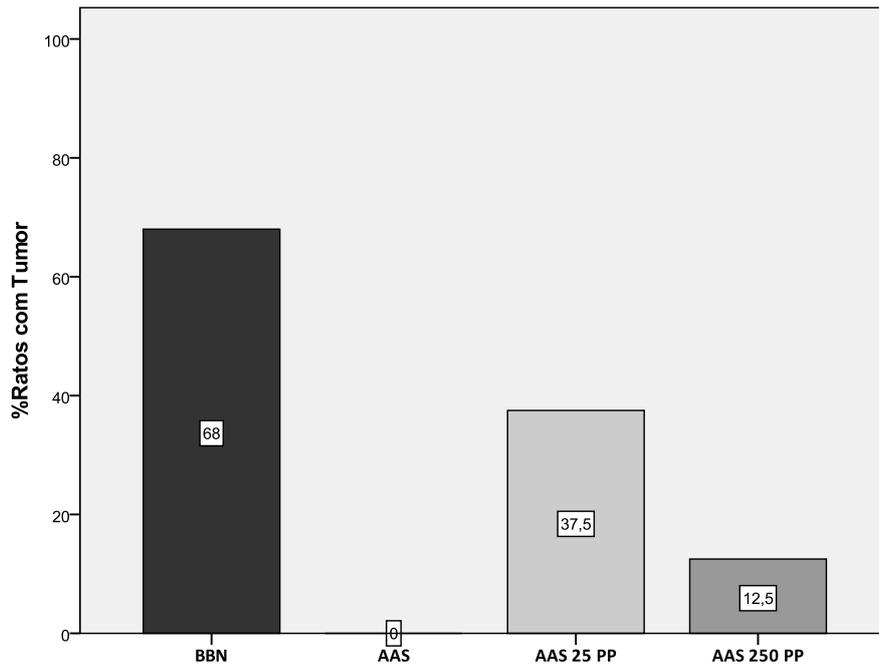


Figura 64: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos do AAS.

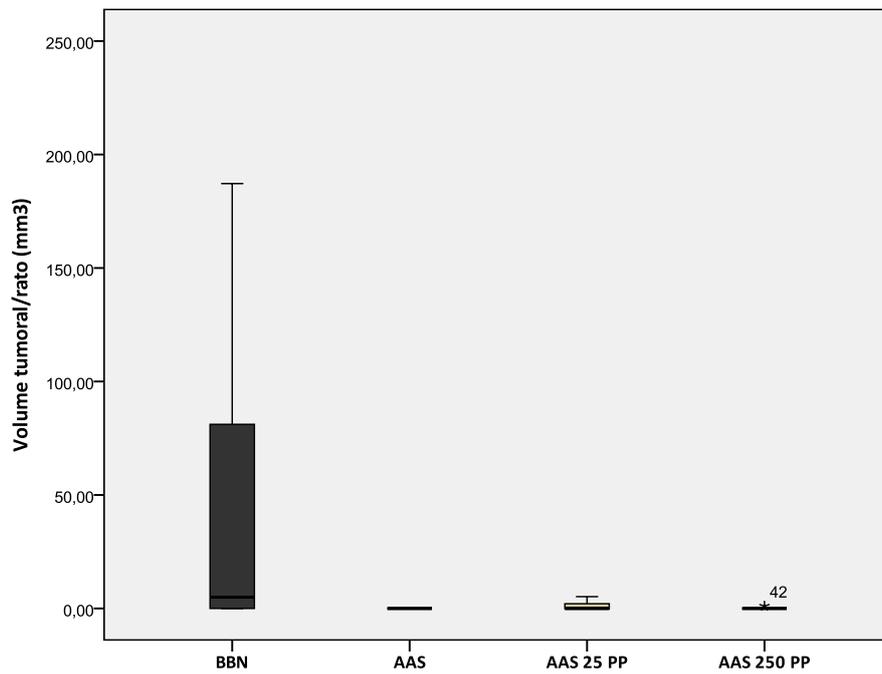


Figura 65: Volume tumoral médio/rato nos Grupos do Celecoxib.

1.2. Avaliação Histopatológica

Não foram diagnosticadas alterações histológicas no urotélio dos grupos controlos Celecox e AAS.

A administração precoce de Celecox, grupos Celecox 1 PP e Celecox 10 PP, levou a uma diminuição de todas as lesões uroteliais (Quadro 39). De forma significativa, as alterações histopatológicas mais severas, como a displasia de alto grau e o *Cis* estavam mesmo ausentes. Como já referido anteriormente, as lesões malignas ocorreram apenas num caso (em oito) em cada um destes grupos.

Pelo contrário, no grupo Celecox 10 PT não houve redução significativa das lesões hiperplásicas, metaplásicas, papilares nem, sobretudo, neoplásicas. Os dois casos de displasia de alto grau coexistiam com carcinoma urotelial.

Com a administração de AAS em simultâneo com o carcinogénio, desde a semana um do estudo, verificou-se uma prevenção das lesões uroteliais hiperplásicas, pré-neoplásicas e neoplásicas (Quadro 40). No entanto, ao contrário do Celecoxib, essa prevenção foi estatisticamente mais relevante na dose mais elevada (grupo AAS 250 PP) do que na dose mais baixa (grupo AAS 25 PP). As lesões de displasia de alto grau e de *Cis* existiam em bexigas com e sem carcinoma.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN (n=25)	Celecox (n=4)	Celecox 1 PP (n=8)	Celecox 10 PP (n=8)	Celecox 10 PT (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	8 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	5 (62,5%)	7 (87,5%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	0,002	0,087	-
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	0	0	4 (50%)
<i>p</i>	-	-	0,005	0,005	0,767
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)	2 (25%)
<i>p</i>	-	-	0,361	0,023	0,120
Displasia	25 (100%)	0	5 (62,5%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	0	0	2 (25%)
<i>p</i>	-	-	0,000	0,000	0,000
Carcinoma <i>in situ</i> (Cis)	13 (52%)	0	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,002	0,002	0,002
Papiloma	4 (16%)	0	0	0	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,122	0,122	0,807
Papiloma invertido	6 (24%)	0	0	2 (25%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,053	0,954	0,469
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)
<i>p</i>	-	-	0,004	0,004	0,775

Quadro 39: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos do Celecoxib (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN (n=25)	AAS (n=4)	AAS 25 PP (n=8)	AAS 250 PP (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	7 (87,5%)	2 (25%)
<i>p</i>	-	-	0,087	0,000
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	3 (37,5%)	0
<i>p</i>	-	-	0,745	0,005
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,361	0,023
Displasia	25 (100%)	0	5 (62,5%)	2 (25%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	3 (37,5%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,001	0,000
Carcinoma <i>in situ</i> (Cis)	13 (52%)	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,037	0,037
Papiloma	4 (16%)	0	0	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,122	0,807
Papiloma invertido	6 (24%)	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,053	0,053
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,127	0,004

Quadro 40: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos do AAS (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

.....
Como já referido anteriormente, nos grupos Celecox 1 PP e Celecox 10 PP apenas um rato em oito tinha carcinoma urotelial, um tumor no primeiro caso, dois no segundo, sendo todos Ta de baixo grau (Quadro 41). No grupo Celecox 10 PT, em quatro casos existia apenas um tumor vesical, dois TPBPM e dois T1 alto grau. No quinto rato, coexistiam quatro neoplasias na mesma bexiga, três TPBPM e um T1 alto grau. No grupo AAS 25 PP, num rato coexistiam dois carcinomas Ta de baixo grau, noutro havia dois T alto grau e, no terceiro rato, o tumor Ta baixo grau era único (Quadro 42).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN (n=25)	Celecox 1 PP (n=8)	Celecox 10 PP (n=8)	Celecox 10 PT (n=8)
TPBPM	4	0	0	5
<i>p</i>	-	0,235	0,235	0,165
Ta baixo grau	11	1	2	0
<i>p</i>	-	0,327	0,433	0,099
Ta alto grau	5	0	0	0
<i>p</i>	-	0,312	0,312	0,312
T1 alto grau	5	0	0	3
<i>p</i>	-	0,176	0,176	0,322

Quadro 41: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos do Celecoxib (*p* vs grupo BBN).

No grupo AAS 25 PP, num rato coexistiam dois carcinomas Ta de baixo grau, noutro havia dois T1 de alto grau, um deles com crescimento invertido. No terceiro rato, o tumor Ta de baixo grau era único (Quadro 42). No grupo AAS 250 PP, o único tumor encontrado era um Ta de baixo grau.

Grupo	BBN (n=25)	AAS 25 PP (n=8)	AAS 250 PP (n=8)
TPBPM	4	0	0
<i>p</i>	-	0,235	0,235
Ta baixo grau	11	3	1
<i>p</i>	-	0,207	0,327
Ta alto grau	5	0	0
<i>p</i>	-	0,312	0,312
T1 alto grau	5	2	0
<i>p</i>	-	0,754	0,176

Quadro 42: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos do AAS (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

2. Imunohistoquímica

A marcação imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD-31 nos grupos Celecox e Celecox 10 PP é apresentada no Quadro 43:

Grupo	BBN		Celecox		Celecox 10 PP	
	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade
P53						
Urotélio Normal	50%	2+	0	0	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	2+	-	-	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b
Ki67						
Urotélio Normal	5%	2+	1-2%	1+	2 ^a /5 ^b %	1 ^a /2 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	15 ^a /25 ^b %	2 ^a /3 ^b	-	-	5 ^a /25 ^b %	1 ^a /3 ^b
CD31						
Urotélio Normal	50-75%	1+	<5%	1+	5 ^a /25 ^b %	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	1 ^a /2 ^b	-	-	25 ^a /50 ^b %	1+

Quadro 43: Resultados da expressão imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD31, em função da % e da intensidade de células com imunomarcção, nos Grupos BBN, Celecox e Celecox 10 PP. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

.....
 A expressão nuclear de p53 foi sempre negativa, quer no urotélio normal, quer nas áreas hiperplásicas ou displásicas, quando não havia carcinoma. No único caso do grupo Celecox 10 PP em que existia um carcinoma, a reactividade foi ligeira (1+). O mesmo se verificou para o Ki67, com imunomarcacão mais extensa e intensa na presença de neoplasia. Quanto ao CD31, houve expressão imunohistoquímica menos intensa e mais limitada do que no grupo BBN, sobretudo nos casos sem tumor.

O estudo imunohistoquímico da COX-2, realizada apenas neste grupo de fármacos, é apresentado nos quadros 44 e 45:

Grupo	Controlo	BBN	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
Urotélio Normal	0	2+	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia	0	2+	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b
Tumor	0	3+	1+	1+	2+/3+

Quadro 44: Resultados da expressão imunohistoquímica para a COX-2, nos Grupos Controlo, BBN, Celecox, Celecox 10 PP e Celecox 10 PT. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

Grupo	Controlo	BBN	AAS 25 PP	AAS 250 PP
Urotélio Normal	0	2+	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia	0	2+	0 ^a /1 ^b	0 ^a /1 ^b
Tumor	0	3+	1+	1+

Quadro 45: Resultados da expressão imunohistoquímica para a COX-2, nos Grupos Controlo, BBN, AAS 25 PP e AAS 250 PP. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

A coloração imunohistoquímica, quando presente, atingia de forma difusa todo o urotélio, pelo que as diferenças se estabeleceram pela intensidade de marcação.

O grupo Controlo não teve imunomarcacão, em claro contraste com a marcação mais intensa no grupo Carcinogénio, não só nas áreas hiperplásicas (Fig. 66) e tumorais (Fig. 67) mas também no urotélio normal adjacente.

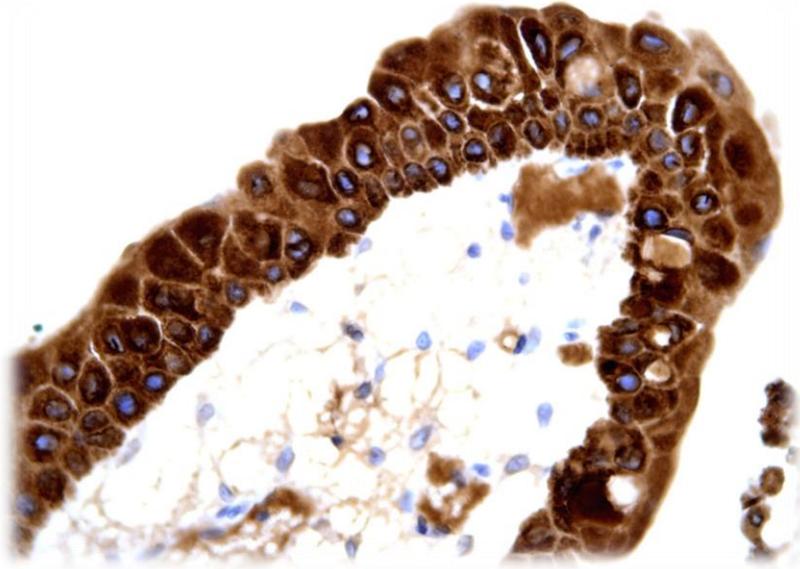


Figura 66: Imunoreatividade de Cox-2 no urotélio hiperplásico do grupo Carcinogénio (400X)

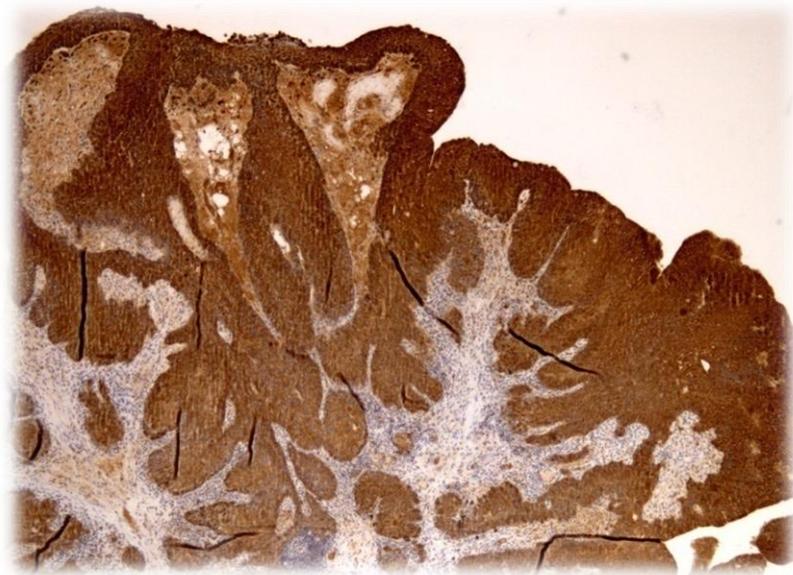


Figura 67: Imunoreatividade de Cox-2 em carcinoma do grupo Carcinogénio (50X)

Em todos os grupos em que foram administrados inibidores da Cox, a imunoreatividade para Cox-2 foi negativa quando não existia carcinoma vesical concomitante (Fig. 68). Na coexistência deste, a marcação foi ligeira, independentemente da área histológica. A exceção ocorreu no grupo Celecox 10 PT, com imunomarcação moderada (2+) a intensa (3+) nas áreas tumorais (Fig. 69).

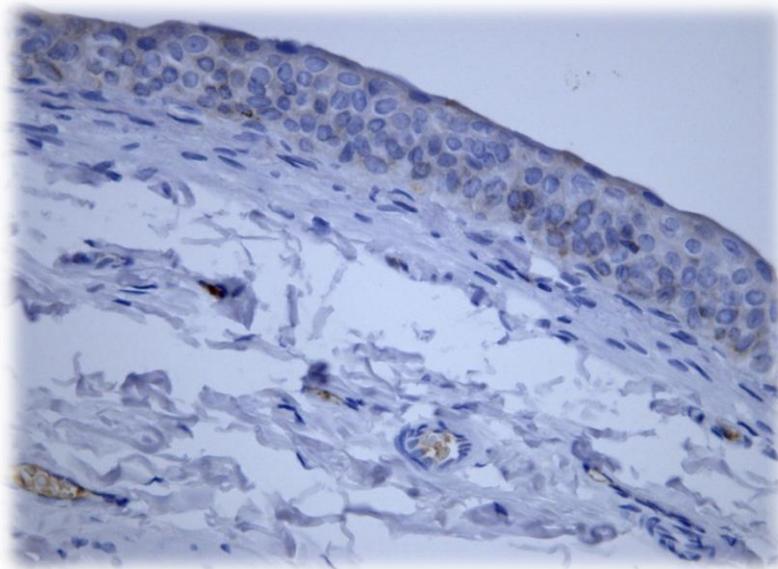


Figura 68: Imunoreactividade de Cox-2 em área hiperplásica do grupo Celecox 10 PP, sem carcinoma (200X)

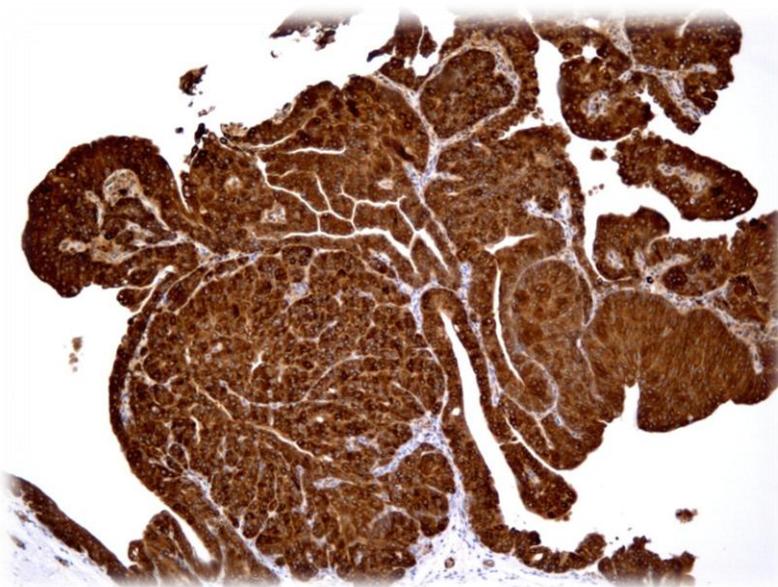


Figura 69: Imunoreactividade de Cox-2 em carcinoma do grupo Celecox 10 PT (50X)

3. Expressão Génica

Nos resultados de expressão génica dos grupos do Celecoxib (Quadro 46), há a salientar uma diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2*, do proto-oncogene *Hras* e de *Cox-2* em todos os grupos.

Nenhum grupo, à excepção do grupo BBN, teve expressão de *P53*.

Os genes *EGFr*, *TNF* e *VEGF* tiveram expressão diferente nos vários grupos.

Grupo	BBN	Celecox	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
Bcl-2	3,200(3,110)	1,940(0,560)	1,245(0,095)	1,298(0,648)	Sem expressão
<i>p</i>	-	0,854	0,643	0,650	-
Cox-2	1,345(1,225)	Sem expressão	0,630(1,020)	0,225(0,145)	0,020
<i>p</i>	-	-	0,793	0,748	0,317
EGFr	Sem expressão	-0,465(0,254)	Sem expressão	-0,849(0,065)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-	-
Hras	1,130(0,030)	0,050(0,067)	Sem expressão	0,150(0,210)	Sem expressão
<i>p</i>	-	0,117	-	0,317	-
P53	-0,403(0,159)	-	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-	-
TNF	Sem expressão	Sem expressão	0,630(0,400)	Sem expressão	1,590(0,019)
<i>p</i>	-	-	-	-	-
VEGF	0,912(0,288)	0,300(0,170)	1,140(0,440)	0,770(0,480)	0,940(0,680)
<i>p</i>	-	0,157	0,814	0,724	0,180

Quadro 46: Resultados de expressão génica nos Grupos do Celecoxib

(*Expression Ratio*); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Os resultados são semelhantes nos grupos do AAS (Quadro 47), havendo uma expressão reduzida do gene anti-apoptose *Bcl-2*, do proto-oncogene *Hras*, de *Cox-2* mas também de *VEGF* em todos os grupos. De igual modo, *P53* não foi expresso.

O gene supressor tumoral *Arf-1* adquiriu expressão nos grupos AAS 25 PP e AAS 250 PP, tal como o gene *EGFr*.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN	AAS	AAS 25 PP	AAS 250 PP
Arf-1	Sem expressão	Sem expressão	0,953 (0,966)	1,794 (0,003)
<i>p</i>	-	-	-	-
Bcl-2	3,200 (3,110)	Sem expressão	0,030 (0,030)	0,010 (0,010)
<i>p</i>	-	-	0,221	0,221
Cox-2	1,345 (1,225)	Sem expressão	0,562 (8,898)	-0,262 (0,678)
<i>p</i>	-	-	0,317	0,317
EGFr	Sem expressão	-0,383 (0,366)	-0,687 (0,114)	-0,462 (0,553)
<i>p</i>	-	-	-	-
Hras	1,130 (0,030)	Sem expressão	0,180 (0,080)	0,320 (0,480)
<i>p</i>	-	-	0,317	0,221
P53	-0,403 (0,159)	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-
VEGF	0,912 (0,288)	0,598 (2,244)	0,397 (0,493)	0,246 (2,707)
<i>p</i>	-	0,317	0,221	0,317

Quadro 47: Resultados de expressão gênica nos Grupos do AAS

(*Expression Ratio*); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

B: Sangue e derivados

1. Marcadores Séricos

O TGF- β encontrava-se diminuído em todos os grupos em estudo, quer do Celecoxib, quer do AAS (Quadros 48 e 49).

Quanto ao TNF- α , houve um aumento, embora não significativo, em todos os grupos de Celecox, à excepção do grupo Celecox 10 PT, e uma redução em todos os grupos do AAS.

Relativamente aos marcadores inflamatórios, houve uma diminuição evidente da PCR em todos os grupos em estudo, tanto para o Celecoxib como para o AAS.

Não houve doseamento de IL-1 β , IL-6 e IL-10 por dificuldades técnicas no processamento das amostras.

Grupo	BBN	Celecox	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
TGF-β	437,271 (11,400)	370,689 (19,240)	206,610 (38,823)	158,558 (24,754)	107,503 (35,601)
<i>p</i>	-	0,011	0,000	0,000	0,000
TNF-α	9,912 (0,250)	11,500 (0,955)	10,565 (0,971)	11,300 (1,097)	6,280 (0,680)
<i>p</i>	-	0,058	0,217	0,259	0,000
PCR	111,162 (3,059)	26,309 (0,859)	30,597 (0,305)	23,332 (0,456)	31,222 (0,338)
<i>p</i>	-	0,007	0,000	0,000	0,000

Quadro 48: Resultados dos marcadores séricos nos Grupos do Celecoxib (em pg/ml, à excepção de PCR, em mg/ml);

(resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

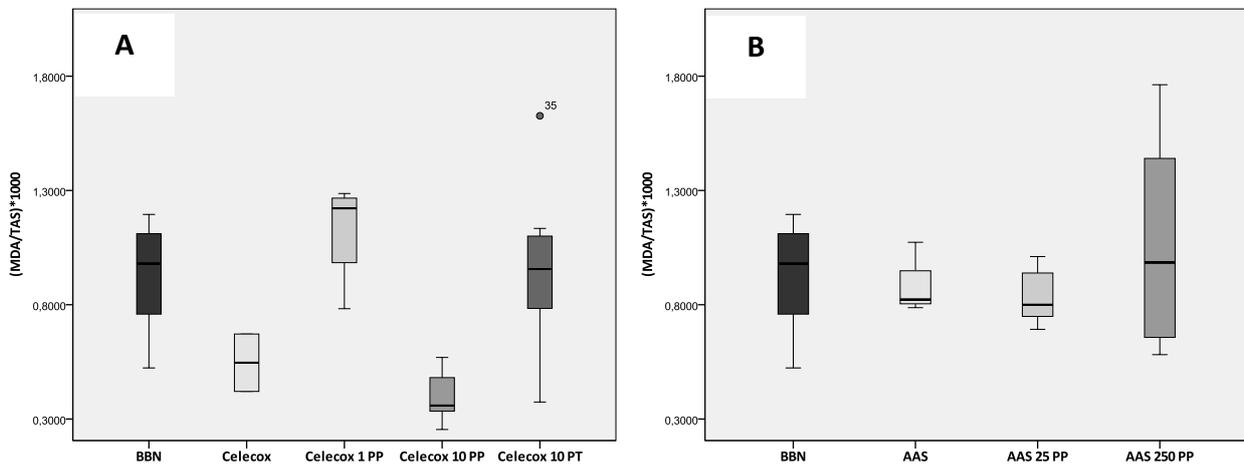
Grupo	BBN	AAS	AAS 25 PP	AAS 250 PP
TGF-β	437,271 (11,400)	196,833 (42,056)	320,276 (57,383)	139,513 (43,134)
<i>p</i>	-	0,008	0,083	0,000
TNF-α	9,912 (0,250)	8,018 (0,631)	6,381 (0,919)	9,109 (0,869)
<i>p</i>	-	0,007	0,002	0,400
PCR	111,162 (3,059)	28,648 (0,654)	27,914 (0,241)	27,669 (0,510)
<i>p</i>	-	0,000	0,000	0,000

Quadro 49: Resultados dos marcadores séricos nos Grupos do AAS (em pg/ml, à exceção de PCR, em mg/ml); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

2. Marcadores de Equilíbrio Oxidativo

A peroxidação lipídica (MDA) foi menos intensa em todos os grupos dos inibidores da Cox, com exceção do grupo Celecox 10 PT (Quadros 50 e 51). Contudo, o único que teve um perfil oxidativo significativamente mais favorável, MDA/TAS mais baixo, foi o grupo Celecox 10 PP (Fig. 70).

Relativamente ao valor de 3-NT, ele foi mais elevado nos grupos do Celecoxib, com exceção do controle, e mais baixo em todos os grupos do AAS.



Figuras 70 A-B: Valores de MDA/TAS nos grupos do Celecoxib (A) e do AAS (B).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN	Celecox	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
MDA	0,465 (0,033)	0,182 (0,020)	0,398 (0,014)	0,207 (0,018)	0,597 (0,044)
<i>p</i>	-	0,031	0,159	0,001	0,042
TAS	523,500 (44,970)	401,143 (42,260)	371,015 (38,365)	507,929 (33,266)	660,911 (42,550)
<i>p</i>	-	0,116	0,015	0,785	0,042
MDA/TAS	0,927 (0,081)	0,546 (0,126)	1,113 (0,075)	0,402 (0,042)	0,955 (0,114)
<i>p</i>	-	0,064	0,120	0,000	0,846
3-NT	33,458 (3,598)	29,425 (0,928)	61,118 (5,789)	50,134 (4,715)	67,792 (3,655)
<i>p</i>	-	0,460	0,001	0,016	0,000

Quadro 50: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos do Celecoxib; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	AAS	AAS 25 PP	AAS 250 PP
MDA	0,465 (0,033)	0,392 (0,023)	0,395 (0,036)	0,372 (0,022)
<i>p</i>	-	0,037	0,168	0,034
TAS	523,500 (44,970)	451,709 (33,049)	437,363 (24,913)	394,874 (53,567)
<i>p</i>	-	0,322	0,132	0,087
MDA/TAS	0,927 (0,081)	0,867 (0,066)	0,840 (0,046)	1,064 (0,157)
<i>p</i>	-	0,695	0,385	0,453
3-NT	33,458 (3,598)	8,593 (4,923)	11,190 (1,457)	24,033 (3,341)
<i>p</i>	-	0,005	0,002	0,088

Quadro 51: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos do AAS; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

3. Hemograma

Nenhum rato dos grupos Celecox e Celecox 10 PP teve alterações do hemograma. Já no grupo Celecox 1 PP, um rato teve anemia e leucopenia, com Hg=10 g/dl; 26% de Htc e $0,40 \times 10^3$ /dl de GB (Quadro A7, Apêndice 8). Não houve anomalias no hemograma do grupo AAS e AAS 25 PP. No grupo AAS 250 PP, um rato teve anemia e leucopenia, com Hg=7,40 g/dl; 16,90% de Htc e $0,50 \times 10^3$ /dl de GB (Quadro A8, Apêndice 8). Apesar de o valor médio de PLT nalguns grupos ser inferior, nenhum rato teve trombocitopenia.

4. Parâmetros Bioquímicos

Não foram detectados parâmetros bioquímicos anormais nos grupos Celecox e Celecox 1 PP (Quadro A9, Apêndice 8). No grupo Celecox 10 PP os valores de glicémia foram significativamente superiores aos do grupo Controlo, enquanto no grupo Celecox 10 PT as transaminases estavam mais elevadas, em especial a TGO. De referir que os triglicérideos estavam mais baixos em todos estes grupos.

Os animais dos grupos do AAS não apresentaram qualquer parâmetro anormal, apesar de no grupo AAS 250 PP os valores médios de TGP serem superiores (Quadro A10, Apêndice 8). Nestes grupos, alguns valores do perfil lipídico eram mais baixos que os do grupo Controlo.

.....
C: Bebida Ingerida e Pesos Corporais

Não houve diferenças no consumo semanal de bebida entre os grupos, quer consideremos a duração total do modelo experimental, quer se analisem as duas fases do estudo separadamente (Quadros 52 e 53).

Não houve diferenças na quantidade de comida consumida.

Não havia diferenças estatisticamente significativas nos pesos iniciais dos ratos dos diversos grupos.

Nos grupos do Celecoxib, verificou-se que durante a 1.^a Fase do estudo, houve um menor ganho ponderal nos grupos que estavam a tomar o fármaco (Grupos Celecox, Celecox 1 PP e Celecox 10 PP), enquanto no grupo Celecox 10 PT, não houve diferenças relevantes, comparativamente ao grupo BBN. Na 2.^a Fase, houve uma recuperação ponderal nos grupos Celecox e Celecox 10 PP, com estabilização no grupo Celecox 1 PP, tendo todos eles deixado de tomar o fármaco, enquanto no grupo Celecox 10 PT, que iniciou a toma do medicamento, houve um atraso de crescimento (Quadro 54 e Fig. 71).

Os animais dos grupos do AAS tiveram um atraso de crescimento, quer na 1.^a quer na 2.^a fase do estudo, com excepção do grupo AAS, que teve um crescimento relativo comparável ao do grupo BBN entre as semanas 9 e 20. (Quadro 55 e Fig. 72).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

Grupo	BBN	Celecox	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
Bebida 0-20S	0,75 (0,03)	0,72 (0,05)	0,70 (0,03)	0,76 (0,04)	0,74 (0,04)
<i>p</i>	-	0,530	0,217	0,827	0,279
Bebida 0-8S	0,88 (0,04)	0,90 (0,05)	0,77 (0,05)	0,93 (0,04)	0,88 (0,09)
<i>p</i>	-	0,689	0,109	0,401	0,528
Bebida 9-20S	0,67 (0,02)	0,59 (0,05)	0,66 (0,03)	0,65 (0,04)	0,64 (0,02)
<i>p</i>	-	0,179	0,686	0,703	0,364

Quadro 52: Bebida média semanal por rato (em ml/g peso): durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos do Celecoxib; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

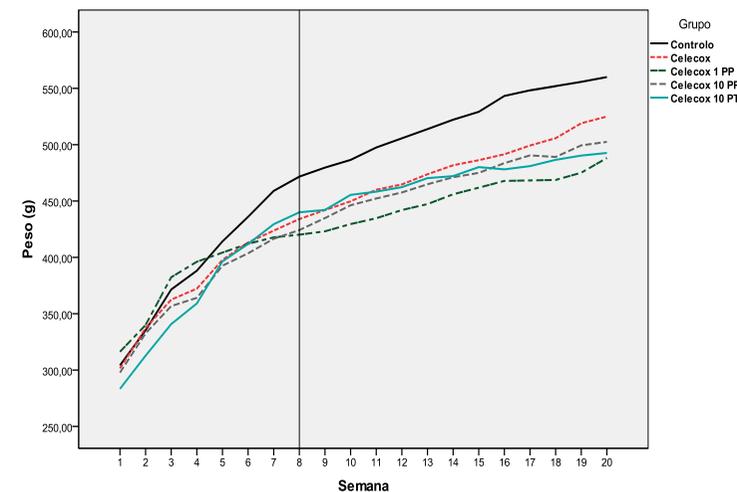
Grupo	BBN	AAS	AAS 25 PP	AAS 250 PP
Bebida 0-20S	0,75 (0,03)	0,76 (0,03)	0,72 (0,03)	0,77 (0,03)
<i>p</i>	-	0,885	0,379	0,717
Bebida 0-8S	0,88 (0,04)	0,86 (0,03)	0,77 (0,05)	0,91 (0,03)
<i>p</i>	-	0,814	0,114	0,488
Bebida 9-20S	0,67 (0,02)	0,69 (0,02)	0,68 (0,02)	0,67 (0,03)
<i>p</i>	-	0,567	0,773	0,919

Quadro 53: Bebida média semanal (em ml) por rato (em ml/g peso): durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos do AAS; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos Inibidores da Cox

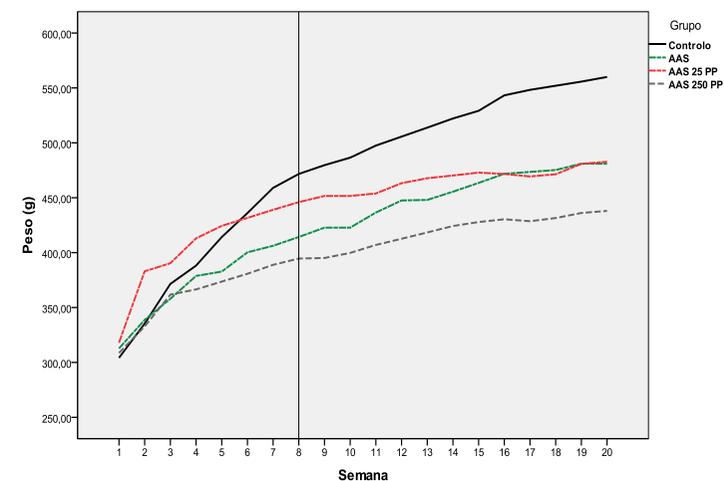
Grupo	Controlo	Celecox	Celecox 1 PP	Celecox 10 PP	Celecox 10 PT
Peso inicial (g) \bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	301,5 (5,5)	316,2 (7,4)	297,8 (4,9)	283,3 (12,3)
↑ peso semana 0-8 (%)	55,07	43,95	32,85	42,49	55,30
↑ peso semana 9-20 (%)	29,04	30,18	21,51	26,28	18,59
↑ peso semana 0-20 (%)	84,11	74,13	54,36	68,77	73,89

Quadro 54 e figura 71: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos do Celecoxib.



Grupo	Controlo	AAS	AAS 25 PP	AAS 250 PP
Peso inicial (g) \bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	312,8 (12,8)	318,0 (7,7)	308,6 (4,6)
↑ peso semana 0-8 (%)	55,07	32,45	40,25	27,87
↑ peso semana 9-20 (%)	29,04	21,35	11,56	14,05
↑ peso semana 0-20 (%)	84,11	53,80	51,81	41,92

Quadro 55 e figura 72: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos do AAS.



IV: Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

Os fármacos com "Acções Pleiotrópicas" estudados foram a Atorvastatina e Ácidos gordos Ómega 3, tendo-se formado os seguintes grupos:

- a) Atorvastatina
 - i. Atorvastatina Controlo (Atorva)
 - ii. Atorvastatina 3 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Atorva 3 PP)
 - iii. Atorvastatina 30 mg/kg/dia Prevenção Precoce (Atorva 30 PP)

- b) Ácidos gordos Ómega 3
 - i. Ácidos gordos Ómega 3 Controlo (Omega 3)
 - ii. Ácidos gordos Ómega 3 Prevenção Precoce (Omega 3 PP)

A - BEXIGA

1. Anatomopatologia

1.1. Avaliação Macroscópica

Os controlos dos grupos Atorva e Omega 3 não apresentaram alterações vesicais macroscópicas.

A avaliação macroscópica das bexigas dos restantes grupos da Atorvastatina permitiu identificar dois tumores simultâneos num animal no grupo Atorva 3 PP e dois tumores isolados no grupo Atorva 30 PP. As características macroscópicas destas lesões eram idênticas às descritas nos grupos anteriores, papilares, exofíticas e esbranquiçadas. Tinham reduzidas dimensões, não ultrapassando os 2-3 mm de maior eixo. Não havia espessamento vesical evidente e a vascularização só era visível "a olho nu" nas bexigas com tumor.

No grupo Omega 3 PP foram encontrados tumores únicos em quatro bexigas e, numa quinta, havia dois tumores simultâneos, todos eles com 1-2 mm, sendo as restantes características idênticas às já descritas.

Os restantes órgãos colhidos (fígado, rins, pulmões, estômago, coração) não tinham alterações macroscópicas sugestivas de doença tumoral metastática.

Os dados da avaliação macroscópica das bexigas dos ratos a quem foi administrada Atorvastatina ou ácidos gordos Ómega 3 são apresentados nos Quadros 56 e 57, respectivamente.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

	Grupo	BBN (n=25)	Atorva (n=4)	Atorva 3 PP (n=8)	Atorva 30 PP (n=8)
Ratos com tumor		68% (17/25)	0% (0/4)	12,5% (1/8)	25% (2/8)
<i>p</i>		-	-	0,004	0,031
N.º de tumores					
Rato: \bar{x} (EP)		1 (0,16)	0	0,25 (0,25)	0,25 (0,16)
<i>p</i>		-	-	0,021	0,022
Rato com tumor: \bar{x} (EP)		1,47 (0,13)	-	2	1
<i>p</i>		-	-	0,317	0,215
Min/Max		0/2	-	0/2	0/1
Volume Tumoral (mm³)					
Rato: \bar{x} (EP)		66,97 (31,58)	0	0,65 (0,65)	1,04 (0,79)
<i>p</i>		-	-	0,010	0,026
Rato com tumor: \bar{x} (EP)		100,46 (45,50)	-	5,20	4,16 (2,08)
<i>p</i>		-	-	0,414	0,205
Por tumor: \bar{x} (EP)		66,97 (31,58)	-	2,60 (1,56)	4,16 (2,08)
<i>p</i>		-	-	0,209	0,438
Min/Max		0,52/732,16	-	1,04/4,16	2,08/6,24

Quadro 56: Resultados macroscópicos nos Grupos da Atorvastatina (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Ações Pleiotrópicas"

Como se observa no quadro 56, a utilização precoce de Atorvastatina, nas doses de 3 e 30 mg/kg/dia, levou a uma redução significativa do número de ratos com tumor (Fig. 73), do número de tumores e do volume tumoral (Fig. 74), mais acentuada no grupo da dose mais baixa.

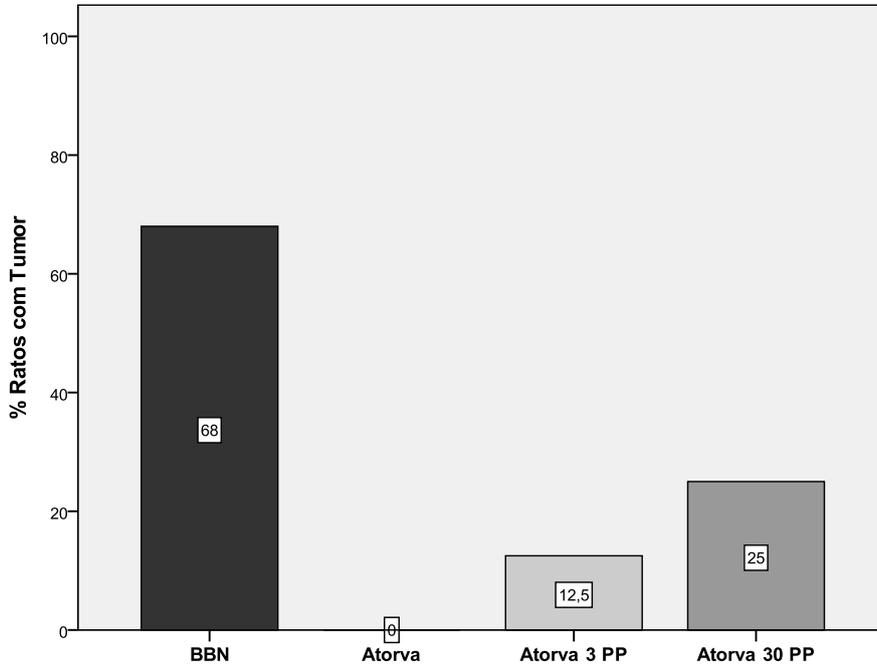


Figura 73: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos da Atorvastatina.

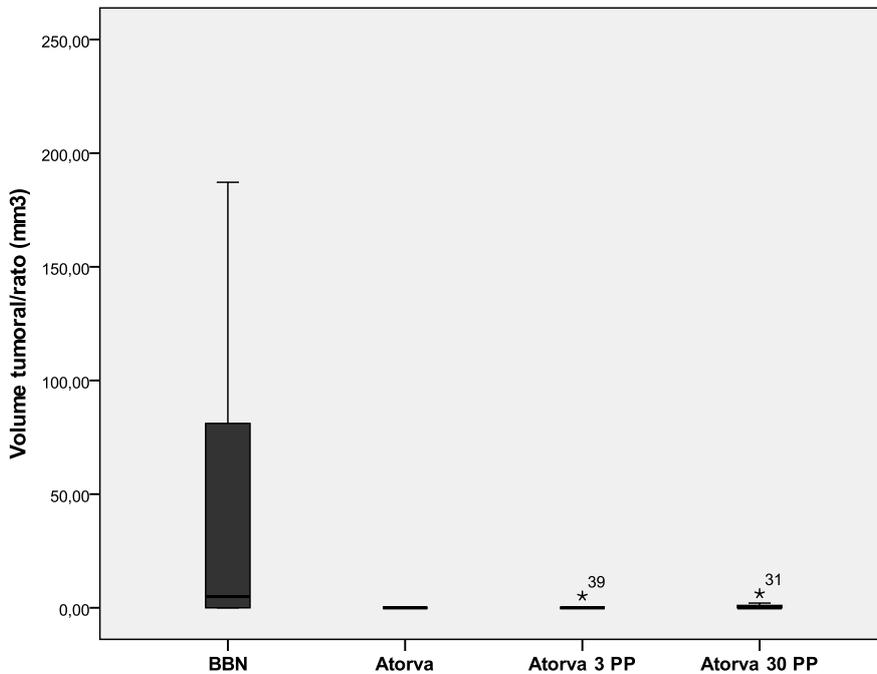


Figura 74: Volume tumoral médio/rato nos Grupos da Atorvastatina.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

Pelo contrário, a utilização de Ácidos gordos Ómega 3 na primeira fase do modelo carcinogénico (Grupo Omega 3 PP) não se associou a uma diminuição significativa da % de ratos com tumor (Fig. 75) ou do número de tumores, embora tenha havido uma redução dos volumes tumorais (Fig. 76).

Grupo	BBN (n=25)	Omega 3 (n=4)	Omega 3 PP (n=8)
Ratos com tumor	68% (17/25)	0% (0/4)	62,5% (5/8)
<i>p</i>	-	-	0,775
N.º de tumores			
Rato: \bar{x} (EP)	1 (0,16)	0	0,75 (0,25)
<i>p</i>	-	-	0,447
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	1,47 (0,13)	-	1,20 (0,20)
<i>p</i>	-	-	0,291
Min/Max	0/2	-	0/2
Volume Tumoral (mm³)			
Rato: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	0	0,72 (0,22)
<i>p</i>	-	-	0,109
Rato com tumor: \bar{x} (EP)	100,46 (45,50)	-	1,14 (0,10)
<i>p</i>	-	-	0,008
Por tumor: \bar{x} (EP)	66,97 (31,58)	-	0,94 (0,10)
<i>p</i>	-	-	0,006
Min/Max	0,52/732,16	-	1,04/1,56

Quadro 57: Resultados macroscópicos nos Grupos dos Ómega 3 (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Ações Pleiotrópicas"

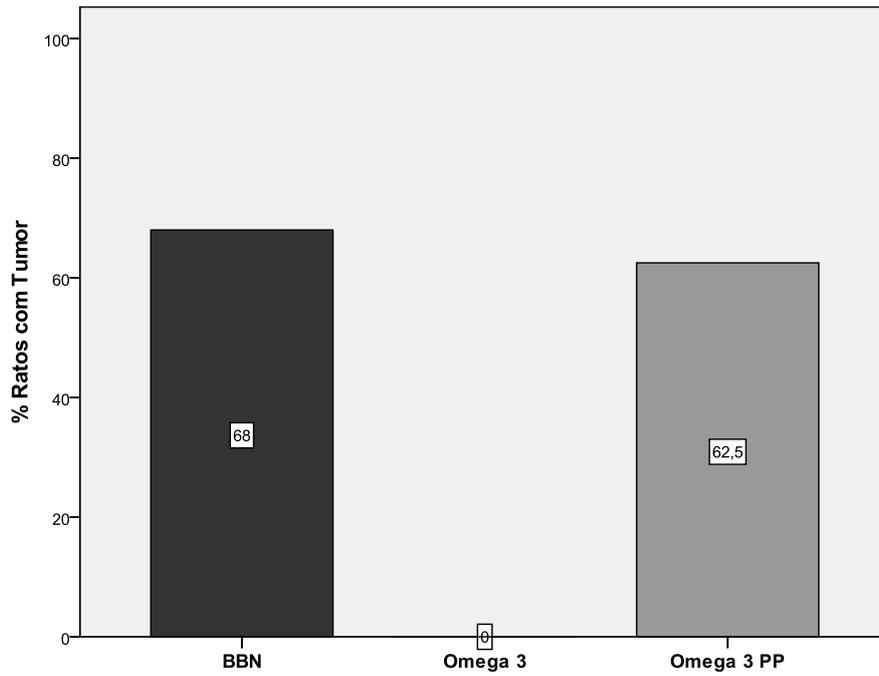


Figura 75: Percentagem de ratos com tumor vesical nos Grupos dos Ómega 3.

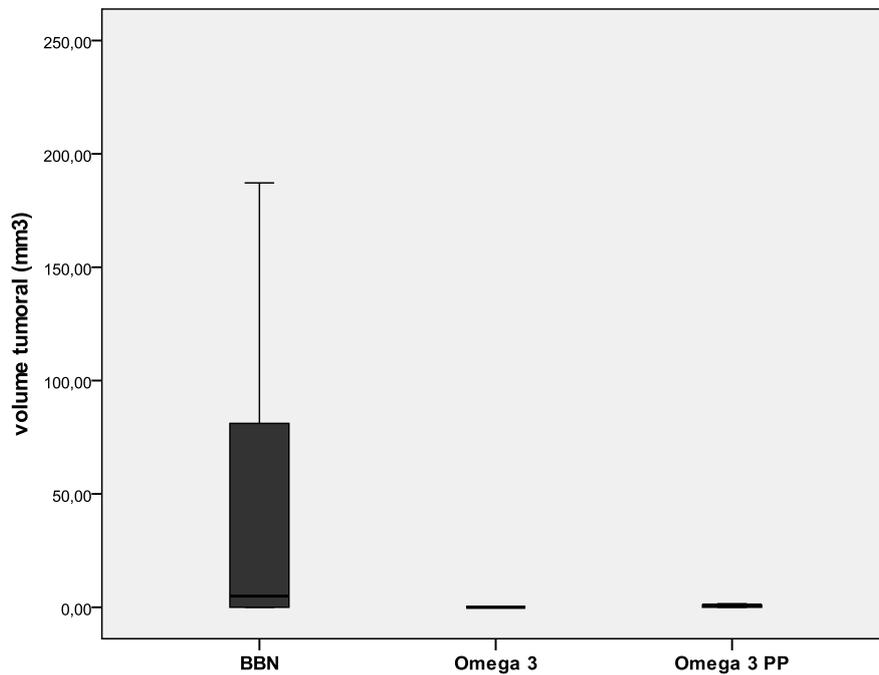


Figura 76: Volume tumoral médio/rato nos Grupos nos Grupos dos Ómega 3.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

1.2. Avaliação Histopatológica

Não foram diagnosticadas alterações histológicas no urotélio dos grupos controlos Atorva e Omega 3.

Conforme se pode ver no Quadro 58, a utilização de Atorvastatina, em qualquer uma das doses em estudo, levou a uma diminuição das lesões hiperplásicas e pré-neoplásicas, nomeadamente, a displasia de alto grau e o *Cis*. A diminuição dos carcinomas uroteliais foi evidente, ocorrendo num caso do grupo Atorva 3 PP e em dois casos do grupo Atorva 30 PP. A displasia de alto grau coexistiu sempre com carcinoma urotelial.

Grupo	BBN (n=25)	Atorva (n=4)	Atorva 3 PP (n=8)	Atorva 30 PP (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	8 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	3 (37,5%)	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	-	0,000	0,000
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	2 (25%)	0
<i>p</i>	-	-	0,328	0,005
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	3 (37,5%)	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	-	0,361	0,361
Displasia	25 (100%)	0	4 (50%)	2 (25%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	1 (12,5%)	1 (12,5%)
<i>p</i>	-	-	0,000	0,000
Carcinoma <i>in situ</i> (<i>Cis</i>)	13 (52%)	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,002	0,002
Papiloma	4 (16%)	0	1 (12,5%)	2 (25%)
<i>p</i>	-	-	0,807	0,576
Papiloma invertido	6 (24%)	0	0	0
<i>p</i>	-	-	0,053	0,053
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	1 (12,5%)	2 (25%)
<i>p</i>	-	-	0,004	0,031

Quadro 58: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos da Atorvastatina (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Ações Pleiotrópicas"

No grupo Omega 3 PP não se verificou redução significativa de nenhuma das lesões hiperplásicas (Quadro 59). Apesar de ter havido uma diminuição da displasia de alto grau e do *Cis*, tal não se traduziu numa menor incidência de carcinoma urotelial. A displasia de alto grau estava presente sempre que havia neoplasia, estando ausente nas bexigas sem tumor.

Grupo	BBN (n=25)	Omega 3 (n=4)	Omega 3 PP (n=8)
Urotélio Normal	25 (100%)	4 (100%)	8 (100%)
<i>p</i>	-	-	-
Hiperplasia plana	25 (100%)	0	7 (87,5%)
<i>p</i>	-	0,000	0,087
Hiperplasia papilar	11 (44%)	0	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	0,040	0,745
Metaplasia escamosa	14 (56%)	0	3 (37,5%)
<i>p</i>	-	0,015	0,361
Displasia	25 (100%)	0	7 (87,5%)
Displasia alto grau	24 (96%)	-	5 (62,5%)
<i>p</i>	-	0,000	0,048
Carcinoma <i>in situ</i> (<i>Cis</i>)	13 (52%)	0	0
<i>p</i>	-	0,022	0,002
Papiloma	4 (16%)	0	2 (25%)
<i>p</i>	-	0,257	0,576
Papiloma invertido	6 (24%)	0	0
<i>p</i>	-	0,156	0,053
Carcinoma urotelial	17 (68%)	0	5 (62,5%)
<i>p</i>	-	0,005	0,775

Quadro 59: Caracterização histológica das bexigas nos Grupos Ômega 3 (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

No grupo Atorva 3 PP o único rato com neoplasia tinha dois tumores, ambos Ta baixo grau (Quadro 60). Já no grupo Atorva 30 PP, um rato tinha um TPBPM e o outro um T1 alto grau.

Grupo	BBN (n=25)	Atorva 3 PP (n=8)	Atorva 30 PP (n=8)
TPBPM	4	0	1
<i>p</i>	-	0,235	0,813
Ta baixo grau	11	2	0
<i>p</i>	-	0,433	0,099
Ta alto grau	5	0	0
<i>p</i>	-	0,312	0,312
T1 alto grau	5	0	1
<i>p</i>	-	0,176	0,637

Quadro 60: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos da Atorvastatina (*p* vs grupo BBN).

No grupo Omega 3 PP, quatro ratos tinham tumores únicos, três deles T1 alto grau e um Ta alto grau. No quinto animal com tumor, coexistiam um TPBPM e um T1 alto grau (Quadro 61).

Grupo	BBN (n=25)	Omega 3 PP (n=8)
TPBPM	4	1
<i>p</i>	-	0,813
Ta baixo grau	11	0
<i>p</i>	-	0,091
Ta alto grau	5	1
<i>p</i>	-	0,970
T1 alto grau	5	4
<i>p</i>	-	0,102

Quadro 61: Classificação histopatológica dos carcinomas uroteliais nos Grupos do Ómega 3 (*p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

2. Imunohistoquímica

Só obtivemos a marcação imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD-31 para os grupos Atorva e Atorva 3 PP, apresentada no Quadro 62:

Grupo	BBN		Atorva		Atorva 3 PP	
	%	Intensidade	%	Intensidade	%	Intensidade
P53						
Urotélio Normal	50%	2+	0	0	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	2+	-	-	0 ^a /50 ^b %	0 ^a /1 ^b
Ki67						
Urotélio Normal	5%	2+	1-2%	1+	1-2%	1+
Hiperplasia/displasia/tumor	15 ^a /25 ^b %	2 ^a /3 ^b	-	-	1-2%	1+
CD31						
Urotélio Normal	50-75%	1+	5%	1+	0 ^a /25 ^b %	0 ^a /1 ^b
Hiperplasia/displasia/tumor	75%	1 ^a /2 ^b	-	-	25 ^a /75 ^b %	1 ^a /2 ^b

Quadro 62: Resultados da expressão imunohistoquímica de p53, Ki67 e CD31, em função da % e da intensidade de células com imunomarcação, nos Grupos BBN, Atorva e Atorva 3 PP. (^aSem carcinoma/^bCom carcinoma concomitante).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

A expressão nuclear de p53 foi sempre negativa, quer no urotélio normal, quer nas áreas hiperplásicas ou displásicas, quando não havia carcinoma. No único caso do grupo Atorva 3 PP em que existia um carcinoma, a reactividade foi ligeira (1+) em 50% dos núcleos. Para o Ki67 a imunomarcacão foi sempre ligeira e em apenas 1-2% das células, ao contrário do CD31, com reactividade mais abundante e intensa na presença de neoplasia.

3. Expressão Génica

Nos resultados de expressão génica dos grupos da Atorvastatina (Quadro 63), há a salientar um perfil favorecedor da apoptose, com diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2* e aumento do gene pró-apoptótico *Casp-3*. Sobressai ainda a redução generalizada do proto-oncogene *Hras*, do gene do *Cox-2* e de *VEGF* em todos os grupos, comparativamente ao grupo BBN. Nenhum grupo, à excepção do grupo BBN, teve expressão de *P53*.

Grupo	BBN	Atorva	Atorva 3 PP	Atorva 30 PP
Bcl-2	3,200 (3,110)	1,766 (0,982)	0,502 (0,644)	0,957 (0,984)
<i>p</i>	-	0,317	0,439	0,569
Casp-3	Sem expressão	31,860 (6,700)	44,740 (8,630)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-
Ccnd 3	- 0,325	Sem expressão	Sem expressão	-1,757 (0,003)
<i>p</i>	-	-	-	0,317
Cox-2	1,345 (1,225)	0,822 (0,423)	0,363 (0,656)	0,562 (0,484)
<i>p</i>	-	0,829	0,439	0,168
Hras	1,130 (0,030)	0,514 (0,054)	-0,069 (0,131)	1,060 (0,415)
<i>p</i>	-	0,317	0,317	0,624
P53	-0,403 (0,159)	Sem expressão	Sem expressão	Sem expressão
<i>p</i>	-	-	-	-
VEGF	0,912 (0,288)	0,482 (0,787)	-0,141 (0,902)	0,472 (0,045)
<i>p</i>	-	0,317	0,317	0,393

Quadro 63: Resultados de expressão génica nos Grupos da Atorvastatina

(*Expression Ratio*); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Ações Pleiotrópicas"

Nos grupos do Ômega 3 (Quadro 64), há uma diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2* e do gene *VEGF*. O gene P53 não é expresso.

Grupo	BBN	Omega 3 PP
Bcl-2 \bar{x} (EP)	3,200 (3,110)	1,380 (0,780)
<i>p</i>	-	0,322
P53 \bar{x} (EP)	- 0,403 (0,159)	Sem expressão
<i>p</i>	-	-
VEGF \bar{x} (EP)	0,912 (0,288)	0,585 (0,155)
<i>p</i>	-	0,547

Quadro 64: Resultados de expressão gênica nos Grupos do Ômega 3

(*Expression Ratio*); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

B: Sangue e derivados

1. Marcadores Séricos

O TGF- β encontrava-se diminuído em todos os grupos em estudo, quer da Atorvastatina, quer dos Ácidos Ómega 3, embora no grupo Controlo Omega 3 a diferença não fosse estatisticamente significativa (Quadros 65 e 66).

Quanto ao TNF- α , houve uma redução significativa nos grupos Atorva 3 PP, Atorva 30 PP e Omega 3. A diminuição no grupo Atorva e o aumento no grupo Omega 3 PP não atingiram significado estatístico.

Relativamente aos marcadores inflamatórios, houve uma diminuição da PCR em todos os grupos em estudo, de forma mais marcada nos grupos da Atorvastatina.

Não houve doseamento de IL-1 β , IL-6 e IL-10 por dificuldades técnicas no processamento das amostras.

Grupo	BBN	Atorva	Atorva 3 PP	Atorva 30 PP
TGF-β	437,271 (11,400)	105,792 (43,095)	187,633 (92,081)	117,785 (53,445)
<i>p</i>	-	0,000	0,042	0,002
TNF-α	9,912 (0,250)	7,654 (1,653)	5,230 (0,668)	5,715 (0,668)
<i>p</i>	-	0,082	0,000	0,000
PCR	111,162 (3,059)	30,383 (0,412)	30,629 (0,659)	30,071 (0,490)
<i>p</i>	-	0,000	0,000	0,000

Quadro 65: Resultados dos marcadores séricos tumorais e inflamatórios nos Grupos da Atorvastatina (em pg/ml, à excepção de PCR, em mg/ml); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Ações Pleiotrópicas"

Grupo	BBN	Omega 3	Omega 3 PP
TGF-β	437,271 (11,400)	363,170 (81,262)	231,387 (57,582)
<i>p</i>	-	0,459	0,001
TNF-α	9,912 (0,250)	6,200 (1,680)	13,180 (1,775)
<i>p</i>	-	0,040	0,140
PCR	111,162 (3,059)	95,030 (3,495)	90,752 (2,789)
<i>p</i>	-	0,009	0,001

Quadro 66: Resultados dos marcadores séricos tumorais e inflamatórios nos Grupos do Ómega 3 (em pg/ml, à exceção de PCR, em mg/ml);

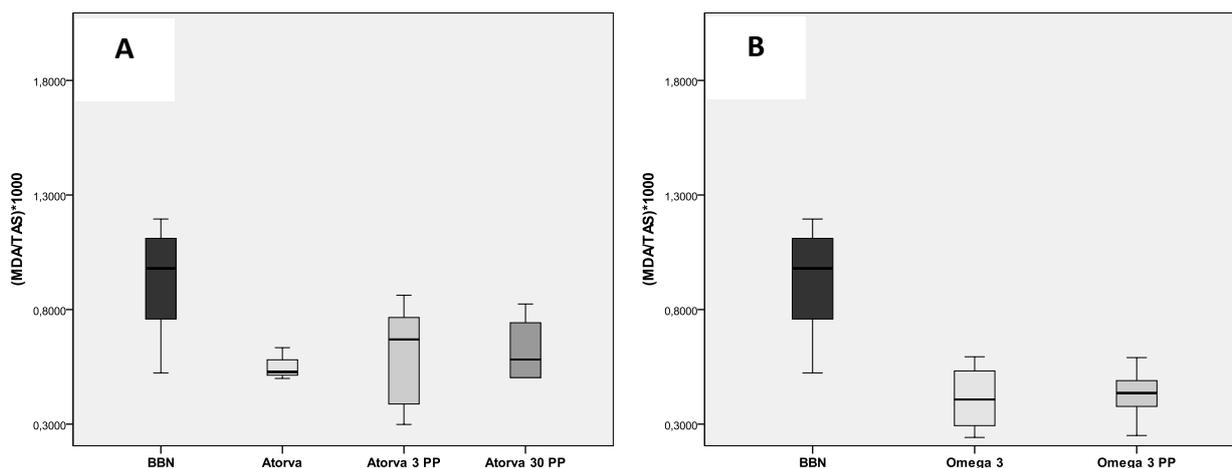
(resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

2. Marcadores de Equilíbrio Oxidativo

Não houve diferenças nos valores de MDA nos grupos da Atorvastatina mas, dado o aumento acentuado do TAS, a relação MDA/TAS foi significativamente mais baixa (Quadro 67 e Figura 77 A).

Em todos os grupos do Ómega 3, houve uma diminuição do MDA e do TAS, mais acentuada do primeiro, pelo que a relação MDA/TAS foi significativamente inferior à do grupo BBN (68 e Figura 77 B).

O valor de 3-NT foi mais elevado em todos os grupos da Atorvastatina. Não houve doseamento de 3-NT nos grupos dos Ácidos Ómega 3 por dificuldades técnicas no processamento das amostras.



Figuras 77 A-B: Valores de MDA/TAS nos grupos da Atorvastatina (A) e do Ómega 3 (B).

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

Grupo	BBN	Atorva	Atorva 3 PP	Atorva 30 PP
MDA	0,465 (0,033)	0,509 (0,011)	0,495 (0,024)	0,491 (0,033)
<i>p</i>	-	0,163	0,340	0,349
TAS	523,500 (44,970)	919,583 (50,194)	920,000 (111,920)	733,750 (54,031)
<i>p</i>	-	0,001	0,009	0,019
MDA/TAS	0,927 (0,081)	0,554 (0,041)	0,601 (0,076)	0,623 (0,077)
<i>p</i>	-	0,025	0,011	0,039
3-NT	33,458 (3,598)	175,346 (9,833)	133,135 (7,830)	150,538 (12,636)
<i>p</i>	-	0,000	0,000	0,001

Quadro 67: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos da Atorvastatina; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	Omega 3	Omega 3 PP
MDA	0,465 (0,033)	0,112 (0,009)	0,116 (0,005)
<i>p</i>	-	0,005	0,003
TAS	523,500 (44,970)	305,500 (73,993)	289,000 (39,142)
<i>p</i>	-	0,024	0,004
MDA/TAS	0,927 (0,081)	0,413 (0,077)	0,429 (0,057)
<i>p</i>	-	0,002	0,001

Quadro 68: Resultados dos marcadores séricos de equilíbrio oxidativo nos Grupos do Ómega 3; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

3. Hemograma

Todos os ratos dos grupos Atorva, Atorva 3 PP ou Atorva 30 PP tiveram hemogramas sem alterações (Quadro A11, Apêndice 8).

Os valores médios dos hemogramas dos grupos dos ácidos Ómega 3 foram normais (Quadro A12, Apêndice 8). Apesar disso, no grupo Omega 3 um rato teve anemia ligeira, com Hg=11,50 g/dl e 32,20% de Htc e um outro teve leucopenia, com $01,90 \times 10^3$ /dl de GB. No grupo Ómega 3 PP, também houve um rato com leucopenia ($1,60 \times 10^3$ /dl GB).

Apesar de o valor médio de PLT ser inferior em todos os grupos estudados, nenhum rato teve trombocitopenia.

4. Parâmetros Bioquímicos

Nos grupos Atorva e Atorva 30 PP foram detectados valores de glicémia significativamente superiores aos do grupo Controlo (Quadro A13, Apêndice 8). De forma isolada, os animais do grupo Atorva 3 PP tinham elevação das transaminases. Todos os restantes parâmetros bioquímicos eram normais. De destacar ainda uma descida significativa do valor de colesterol total nos grupos Atorva e Atorva 30 PP.

Nos dois grupos dos ácidos Ómega 3 todos os parâmetros bioquímicos doseados eram normais, apesar de haver algumas diferenças nos valores médios, comparativamente ao grupo Controlo (Quadro A14, Apêndice 8). De referir uma descida significativa dos triglicerídeos e, em menor grau, do colesterol total.

II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

C: Bebida Ingerida e Pesos Corporais

Não houve diferenças no consumo semanal de bebida entre os grupos, quer consideremos a duração total do modelo experimental, quer se analisem as duas fases do estudo separadamente (Quadros 69 e 70).

Não houve diferenças na quantidade de comida consumida.

Não havia diferenças estatisticamente significativas nos pesos iniciais dos ratos dos diversos grupos.

Verificou-se em todos os grupos da Atorvastatina uma evolução ponderal sobreponível ao grupo Controlo (Quadro 71 e Fig. 78).

Nos grupos Ómega 3 e Ómega 3 PP verificou-se durante a 1.^a Fase do estudo houve um menor ganho ponderal do que no grupo Controlo (Quadro 72 e Fig. 79). Na 2.^a Fase, depois de interrompida a toma do fármaco, o ganho ponderal relativo dos grupos Ómega 3 e Ómega 3 PP foi semelhante ao do grupo Controlo, embora no final tivessem pesos absolutos inferiores.

Grupo	BBN	Atorva	Atorva 3 PP	Atorva 30 PP
Bebida 0-20S	0,75 (0,03)	0,67 (0,03)	0,70 (0,03)	0,71 (0,03)
<i>p</i>	-	0,117	0,239	0,390
Bebida 0-8S	0,88 (0,04)	0,76 (0,04)	0,82 (0,06)	0,83 (0,06)
<i>p</i>	-	0,141	0,435	0,505
Bebida 9-20S \bar{x}	0,67 (0,02)	0,61 (0,03)	0,62 (0,02)	0,64 (0,02)
<i>p</i>	-	0,125	0,083	0,259

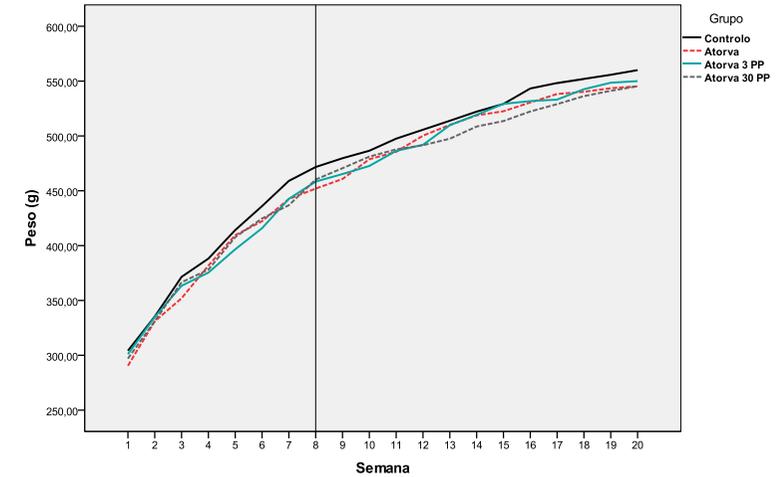
Quadro 69: Bebida média semanal por rato (em ml/g peso): durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos da Atorvastatina; (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

Grupo	BBN	Omega 3	Omega 3 PP
Bebida 0-20S	0,75 (0,03)	0,73 (0,04)	0,75 (0,04)
<i>p</i>	-	0,672	0,986
Bebida 0-8S	0,88 (0,04)	0,77 (0,09)	0,93 (0,07)
<i>p</i>	-	0,293	0,558
Bebida 9-20S	0,67 (0,02)	0,71 (0,04)	0,64 (0,02)
<i>p</i>	-	0,433	0,246

Quadro 70: Bebida média semanal (em ml) por rato: durante todo o período experimental (0-20S), durante a 1.^a fase (0-8S), durante a 2.^a fase (9-20S) nos Grupos do Ómega 3 (*p* vs grupo BBN); (resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo BBN).

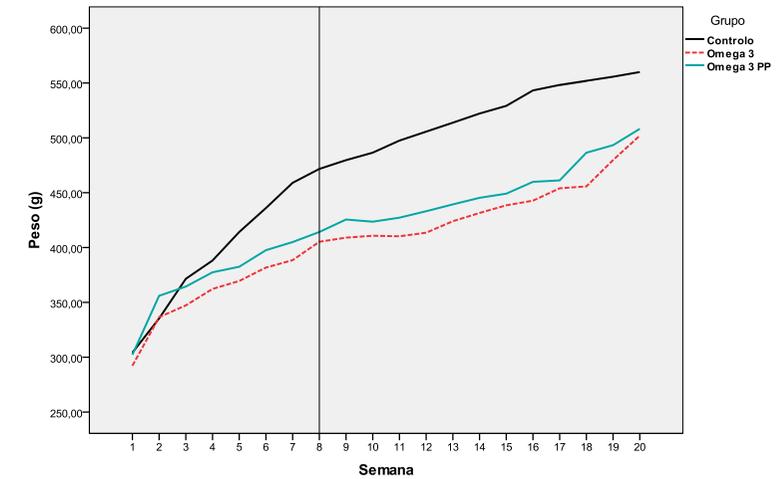
II. Estudo Experimental: Resultados dos Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

	Grupo	Controlo	Atorva	Atorva 3 PP	Atorva 30 PP
Peso inicial (g)	\bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	290,5 (7,3)	301,0 (7,5)	297,0 (2,6)
↑ peso	semana 0-8 (%)	55,07	55,99	52,28	54,98
↑ peso	semana 9-20 (%)	29,04	31,10	30,44	28,62
↑ peso	semana 0-20 (%)	84,11	87,69	82,72	83,60



Quadro 71 e figura 78: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos do Celecoxib.

	Grupo	Controlo	Omega 3	Omega 3 PP
Peso inicial (g)	\bar{x} (EP)	304,2 (3,4)	292,2 (6,3)	302,2 (7,2)
↑ peso	semana 0-8 (%)	55,07	38,67	37,03
↑ peso	semana 9-20 (%)	29,04	33,10	31,12
↑ peso	semana 0-20 (%)	84,11	71,77	68,15



Quadro 72 e figura 79: Peso inicial e evolução ponderal nos Grupos do Ómega 3.

Discussão

I: Caracterização do Modelo Experimental

A- Escolha do modelo experimental

Um modelo animal apropriado e válido para o estudo da carcinogênese vesical deve ser similar ao cancro da bexiga no humano: na sua histologia, propriedades bioquímicas, características moleculares e genéticas, história natural e comportamento biológico (Xiao et al. 1999). Quanto ao agente carcinogénico, deve afectar apenas o urotélio, não causando outra toxicidade e o seu método de administração deve ser simples e natural (Tanaka et al. 2011). A incidência de neoplasias deve ser fiável e elevada, com um tempo de indução relativamente curto (Okajima et al. 1981).

No estudo experimental desta neoplasia é possível usar cães, coelhos, cobaias, hamsters, ratos e ratinhos (Oliveira et al. 2006). O rato foi uma escolha óbvia, pela experiência da nossa equipa no seu manuseamento, pelo seu tamanho, apropriado para as condições logísticas disponíveis no nosso laboratório, pelo custo, mas também pela abundância de informação relativa às características biológicas destas espécies e dos processos tumorais que neles se induzem. São mamíferos relativamente fáceis de manter, desenvolvem cancros com facilidade em resposta a carcinogénios químicos, ao longo de meses, em vez de anos (Okajima et al. 1981).

Escolhemos machos da estirpe Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, não isogénica, o que permite o desenvolvimento de tumores heterogéneos, reflectindo mais fielmente o que se passa nos humanos (Raghavan et al. 1986, Festing 2003). Os machos têm menor variabilidade hormonal e comportamental.

Optámos por um modelo de indução de carcinogênese vesical com químicos, em detrimento de modelos de implantação tumoral ou de estudos em culturas celulares. Não obstante as desvantagens associadas à nossa escolha, incluindo o longo tempo de indução e a dificuldade na quantificação precisa do carcinogénio ingerido, é, na nossa opinião, o mais apropriado para os nossos objectivos, por ser o que mais fielmente reproduz o processo carcinogénico no humano.

Três agentes químicos são particularmente eficazes na indução de neoplasias vesicais. A N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN), a

.....
N-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]formamida (FANFT) e a N-metil-N-nitrosureia (MNU) são carcinogénios completos que, administrados pela via e nas doses adequadas e na estirpe animal correcta, produzem uma elevada incidência de tumores vesicais, sem indução (ou com indução mínima) de tumores noutros órgãos (Oliveira et al. 2006). O grau de atipia celular e a extensão da invasão aumentam com a dose e o prolongamento do período experimental (Fukushima 1991).

Escolhemos a BBN, um metabólito genotóxico da dibutilnitrosamina (DBN), como o carcinogénio a usar na nossa investigação. É um líquido amarelo, oleoso, não muito volátil, solúvel devido ao seu terminal hidroxilado. Pode ser administrada por via oral, misturado na água da bebida ou por gavagem, por instilação intravesical ou por injeção subcutânea, sendo neste caso menor a incidência de tumores (Kunze and Chowaniec 1990, Oliveira et al. 2006). Por ser uma via cómoda, reduzindo a necessidade de manipulação dos animais, optou-se pela sua administração na água da bebida.

Após a ingestão, o composto é rapidamente distribuído nos tecidos corporais, com uma semi-vida sérica de cerca de oito minutos (Bonfanti et al. 1988). A acção carcinogénica da BBN depende da formação do seu metabólito urinário, a N-butil-N-(3-carboxipropil) nitrosamina (BCPN), resultante da oxidação do grupo alcoólico da BBN a um grupo carboxílico, pelo sistema enzimático álcool/aldeído desidrogenase do fígado (Airoldi et al. 1990). Para além deste, outros compostos são eliminados na urina de ratos a quem foi administrada BBN, incluindo uma BBN conjugada com ácido glucorónico (BBN-G) e produtos resultantes da metabolização adicional da BCPN (Bonfanti et al. 1988). Alguns estudos demonstram que a própria bexiga pode ter um papel na activação da carcinogénese, com capacidade de metabolizar a BBN a BCPN, embora o potencial hepático para a activação metabólica dos carcinogénios químicos exceda em muito o da bexiga (Airoldi et al. 1987).

A administração de baixas doses de BBN durante um longo período de tempo é mais eficaz do que um menor número de fracções com maiores doses individuais (McCormick et al. 1981). Embora não se tenha detectado toxicidade sistémica com altas doses, há um aumento da citotoxicidade local e poucas células afectadas pelo carcinogénio sobrevivem, desenvolvendo-se, por isso, menos tumores. Pelo contrário, a baixas doses, BBN induz lesões potencialmente reparáveis no DNA urotelial, logo sub-letais para a célula, surgindo maior número de tumores. Por outro lado, múltiplas exposições a BBN potenciam a sua acção bifásica: como iniciador, induzindo alterações mutagénicas uroteliais em número e extensão progressivamente maiores (He et al.

.....
 2012); como promotor, estimulando o crescimento e desenvolvimento destas células até se formarem tumores. Na nossa investigação usámos BBN a 0,05% na água da bebida, a dose utilizada na grande maioria dos estudos experimentais (Ohtani et al. 1986, Masui et al. 1996, Oliveira et al. 2011, He et al. 2012).

A duração da administração de BBN nos vários trabalhos publicados variou entre as duas e as 40 semanas (Ohtani et al. 1986, Masuko et al. 1987, Oliveira et al. 2006, Oliveira et al. 2011, He et al. 2012). Nas administrações mais prolongadas, para além das 26 semanas, a incidência de tumores pode ser de 100%, conforme demonstrado num trabalho que avaliou as alterações sequenciais do urotélio ao longo do tempo (Ohtani et al. 1986). Adoptámos um protocolo de 20 semanas, já anteriormente usado noutros trabalhos e que incluía duas fases: uma inicial de indução tumoral, de oito semanas, em que é administrado o carcinogénio *ad libitum*, seguida de um período de 12 semanas sem BBN, para manifestação das lesões histológicas (Shimazui et al. 2002, Iida et al. 2004, Hattori et al. 2006). A duração mais curta tinha vantagens óbvias na gestão temporal do projecto. Por outro lado, uma vez que o objectivo principal do trabalho era estudar a capacidade preventiva de vários agentes e não a sua capacidade curativa, tinha mais interesse, na nossa óptica, uma duração que provocasse lesões pré-malignas e malignas e não apenas lesões tumorais volumosas e extensas. As duas fases do nosso modelo permitiam também manipulações farmacológicas: o estudo da prevenção precoce, simultânea com a exposição ao carcinogénio, e o da prevenção tardia.

B- Grupo Controlo: histologia vesical similar à dos humanos

As bexigas dos animais do grupo controlo não apresentaram alterações macroscópicas sugestivas de tumor vesical, sendo translúcidas, sem hipervascularização e de parede fina. O estudo histopatológico confirmou que a bexiga era revestida em toda a sua extensão por um epitélio de células de transição (urotélio) normal, não tendo sido identificadas lesões hiperplásicas, displásicas, metaplásicas, de *Cis* ou neoplásicas. As células tinham a polaridade mantida e sem atipias celulares. A incidência espontânea de carcinomas vesicais em ratos, sem exposição a carcinogénios, é rara, estando associada ao envelhecimento, a litíase vesical, a estirpes específicas ou a infecções parasitárias, não se verificando nenhuma dessas condições no

.....
nosso modelo (Boorman 1977, Deerberg et al. 1985, Antonakopoulos et al. 1991, Clayson et al. 1995). De igual modo, dado o seguimento rigoroso do protocolo experimental, com identificação e separação sem margem para dúvidas dos animais dos vários grupos, e o controlo, não só da comida e da bebida mas também de todos os materiais com os quais os animais tinham contacto, não existia a possibilidade de ingestão accidental de agentes potencialmente carcinogénicos. Outras lesões inflamatórias, hiperplásicas ou pré-neoplásicas também não ocorrem de forma natural.

Do ponto de vista histológico, a bexiga do rato é notavelmente similar à do humano, tal como também foi demonstrado no nosso estudo, consistindo na mucosa urotelial, *lamina propria*, *muscularis propria* (detrussor) e serosa, confirmando tratar-se de um bom modelo (Oyasu 1995).

Essa similitude também é encontrada no urotélio, onde se identificam, em ambos os casos, as camadas superficial, intermédia e basal (DeSesso 1995). Uma das diferenças entre as espécies diz respeito ao número de camadas intermédias, três ou quatro nos humanos, uma nos roedores (Wu et al. 2009).

C- Grupo Carcinogénio (BBN): Carcinogénese vesical

1. Anatomopatologia

À observação macroscópica, 17 animais de um total de 25 (68%) do grupo BBN tinham uma ou duas lesões sugestivas de tumor vesical, maioritariamente papilares, exofíticas, com dimensões variáveis, de 1 a 16 mm de maior eixo. Metade dos animais sem tumor visível tinham uma parede vesical espessada e com hipervascularização, claramente distinta das do grupo controlo.

O valor de 68% de tumores vesicais que obtivemos é semelhante ou até superior ao de investigações com tempo de indução equivalente (Ohtani et al. 1986, Hattori et al. 2006), sendo apropriado para os nossos objectivos. Uma das nossas preocupações era confirmar a reprodutibilidade do modelo carcinogénico e, por isso, este decorreu em dois períodos distintos: no primeiro obtivemos uma incidência tumoral de 66,7% (8/12), no segundo de 69,2% (9/13). O aspecto exofítico e papilar era expectável uma vez que no rato a maioria dos tumores são deste tipo (Cohen 1998).

.....

O estudo histológico confirmou que a carcinogénese urotelial do rato tem um conjunto de alterações morfológicas que se assemelham à que encontramos no Homem e que começam pela hiperplasia simples (Cohen 2002), presente em 100% dos nossos animais. A hiperplasia traduz a existência de uma agressão vesical e é um mecanismo que visa repor a integridade da barreira urotelial e manter uma alta resistência transepitelial (Visnjar et al. 2012). Em 11 casos, assumiu mesmo a configuração papilar, com frequentes figuras mitóticas, reflectindo um aumento da actividade proliferativa, o que indicia a hiperplasia papilar e os papilomas como lesões precursoras da neoplasia papilar urotelial, sobretudo de baixo grau (Chow et al. 2000, Readal and Epstein 2010). Os papilomas invertidos, raros nos humanos, foram identificados em seis casos. Dada a extensa invaginação na *lamina propria*, podem confundir-se com tumores invasivos. Contudo, uma observação cuidada permite excluir atipias celulares, alterações do urotélio de revestimento ou invasão muscular. Podem progredir a carcinomas de alto grau (Cohen 2002).

Com a progressão das lesões pré-neoplásicas para carcinomas, há uma prevalência crescente de áreas de metaplasia escamosa, identificada em 56% das bexigas deste grupo (Cohen 2002). A displasia urotelial, com desorganização arquitectural e citológica, tradutora de alterações genéticas mais profundas e maior risco de carcinomas invasivos, estava presente em todas as bexigas, maioritariamente (96%) de alto grau. O *Cis*, uma lesão altamente maligna, factor de risco para recidiva e progressão, foi diagnosticado em 52% dos animais do grupo BBN (Palou et al. 2012).

O facto de no nosso estudo a hiperplasia papilar, os papilomas, a displasia de alto grau e o *Cis* serem mais frequentes nos animais com tumores, é um indicador adicional da sua associação ao processo de malignização, podendo, por isso, ser usados como marcadores da eficácia preventiva dos agentes testados.

Nos 17 animais com tumores, nove tinham apenas uma lesão e oito tinham duas. Estes 25 carcinomas vesicais eram diferentes do ponto de vista histopatológico, tendo diferentes graus de diferenciação e de invasão:

- 15 eram papilares e de baixo grau: quatro TPBPM; 11 Ta de baixo grau.
- 10 eram de alto grau: cinco estavam limitados à mucosa e cinco invadiam a *lamina propria*.

Na literatura, a carcinogénese vesical no rato é descrita como sendo essencialmente do tipo papilar, iniciando-se pela hiperplasia simples e evoluindo gradualmente a hiperplasia papilar, papilomas e,

.....
 finalmente, a carcinomas papilares (Ohtani et al. 1986, Cohen 1998, Cohen 2002).

Os resultados do nosso modelo reproduzem adequadamente esta via papilar e não invasiva da carcinogénese urotelial, frequentemente multifocal e recidivante, o que o torna adequado para estudos destinados a avaliar a capacidade preventiva de fármacos. Por outro lado, no nosso modelo também está representada a via mais agressiva da carcinogénese urotelial, com lesões não papilares como a displasia e o Cis, ou carcinomas de alto grau.

Em resumo, o nosso modelo tem lesões representativas da dupla via da carcinogénese vesical, embora com predomínio da via papilar (Fig. 80).

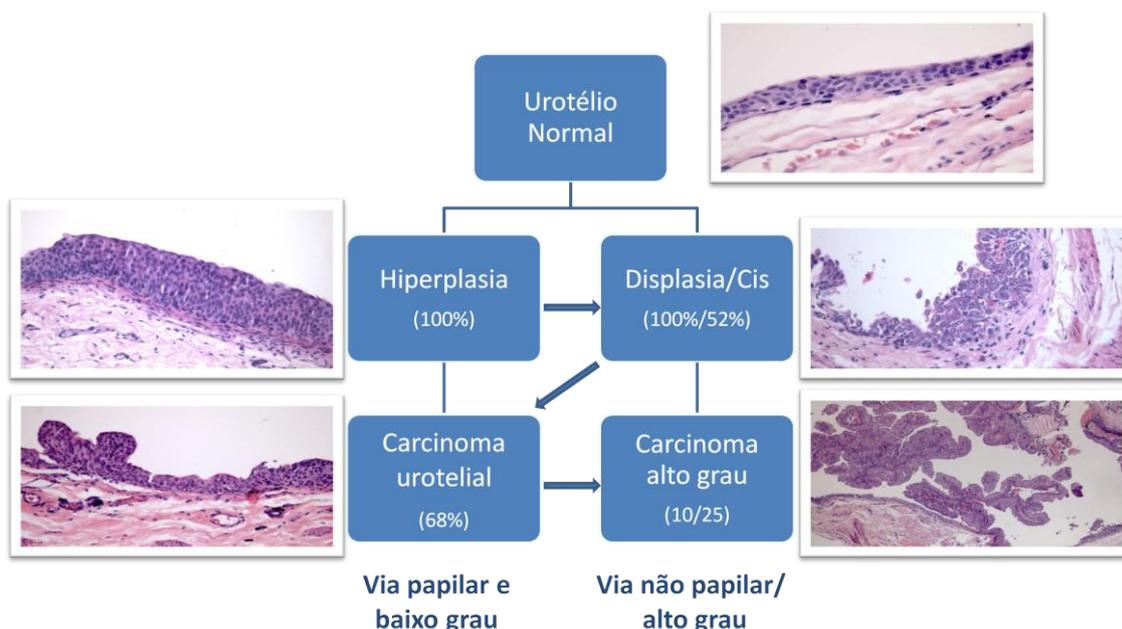


Figura 80: Representação esquemática da via da dupla carcinogénese vesical no nosso modelo experimental.

2. Imunohistoquímica

A avaliação histopatológica permite uma classificação correcta das lesões uroteliais, sejam elas pré-tumorais ou tumores já estabelecidos. Contudo, com a realização de exames adicionais no material histológico obtém-se uma melhor caracterização, quer em termos de agressividade, quer em termos de definição do seu significado prognóstico, para além de uma visão mais aprofundada sobre o processo de malignização urotelial.

Neste contexto, o estudo imunohistoquímico ocupa um lugar de destaque, tendo sido identificados vários marcadores com potencial interesse no carcinoma urotelial da bexiga (Rosenblatt et al. 2008).

.....
Escolhemos três marcadores imunohistoquímicos:

- *p53*, envolvido na via de regulação do ciclo celular (Mitra et al. 2012).
- Ki67, um marcador celular de proliferação (Scholzen and Gerdes 2000).
- *CD31* ou *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)*, um marcador da angiogénese (DeLisser et al. 1997, Cao et al. 2009).

Escapar à senescência celular e tornar-se imortal é um dos pré-requisitos para a transformação maligna de uma célula. O *p53* é um regulador do ciclo celular, estando envolvido no controlo da estabilidade genética, proliferação celular, senescência e apoptose (Vousden and Lane 2007). As mutações de *p53* são eventos genéticos precoces nas formas mais agressivas do carcinoma da bexiga, sendo consideradas marcadores de progressão e de mau prognóstico (Esrig et al. 1994, Shariat et al. 2010).

Vários estudos demonstraram a elevada correlação entre a acumulação nuclear de *p53* diagnosticada por imunohistoquímica e a detecção de mutações por sequenciação de DNA, confirmando a validade do nosso estudo (McShane et al. 2000).

No nosso modelo experimental, não houve expressão nuclear aberrante de *p53* nas bexigas do grupo controlo, reflectindo a preservação da integridade desta via supressora tumoral nestes animais. Pelo contrário, a imunomarcagem foi positiva no urotélio dos animais do grupo BBN. Embora a positividade fosse mais extensa nas lesões pré-tumorais e nos tumores (75% dos núcleos), consequência de alterações mutagénicas mais extensas, ela também foi detectada em 50% do urotélio sem alterações histológicas, com intensidades de marcação semelhantes. Este facto é tradutor da acção genotóxica do carcinogénio em todo o urotélio vesical, levando a disrupções da integridade do DNA, mutações de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, induzindo o já anteriormente descrito processo de cancerização do terreno (Braakhuis et al. 2003).

Os nossos resultados confirmam os obtidos noutros modelos experimentais com roedores, evidenciando o papel regulador deste gene e associando-se a perda das suas funções a uma maior incidência de carcinomas (Lee et al. 1999, Iida et al. 2007).

A função de barreira do urotélio exige uma adequada estabilidade estrutural, com ciclos celulares extremamente lentos e velocidades de replicação extremamente baixas (Wu 2009). Em circunstâncias normais, esta homeostasia é mantida pelo equilíbrio dinâmico de factores

.....

promotores e inibidores da proliferação celular e de regulação da apoptose. As células cancerígenas, ao desregulararem este equilíbrio, tornam-se senhoras do seu destino (Hanahan and Weinberg 2011) e o índice proliferativo é um indicador prognóstico dos carcinomas, incluindo o urotelial (Popov et al. 2004, Valera et al. 2007, Kahraman et al. 2012, Ferguson et al. 2013). Na análise dos nossos resultados, pudemos verificar que no urotélio vesical do grupo controlo, a imunopositividade de *Ki67*, um marcador do índice proliferativo, era ligeira e atingia apenas 1-2% das células, reflectindo a normal multiplicação urotelial lenta, o que contrastava com a marcação mais abundante (5%) e intensa (2+) no urotélio histologicamente normal do grupo BBN. Apesar de as lesões ainda não serem visíveis, o desequilíbrio da homeostasia proliferativa já se verificava. Nas áreas histologicamente alteradas os valores eram ainda mais elevados, com especial destaque para os tumores, onde havia uma maior proporção de células na fase activa do ciclo celular (25%), sendo a marcação muito intensa (3+).

A angiogénese é um dos elementos críticos no crescimento e progressão tumorais (Folkman 1995). A neovascularização, resultante da actividade combinada do microambiente tumoral e de moléculas de sinalização, preenche não apenas as necessidades metabólicas crescentes do tumor como fornece também potenciais vias de disseminação neoplásica (Hanahan and Weinberg 2011, Chen et al. 2012, Chouaib et al. 2012, Roudnicky et al. 2013). Vários estudos confirmam que o grau de vascularização está associado à agressividade e ao prognóstico dos tumores uroteliais (Theodoropoulos et al. 2004, Chikazawa et al. 2008, Ajili et al. 2012). Por outro lado, a inibição desta neoangiogénese pode constituir um alvo terapêutico no cancro da bexiga, justificando-se a investigação experimental e clínica neste campo (Black and Dinney 2007, Elfiky and Rosenberg 2009). Estes factos justificam plenamente o estudo da vascularização no nosso modelo carcinogénico. O *CD31* ou *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)* é um membro das superfamílias das imunoglobulinas e é expresso na superfície das células endoteliais, sendo usado como marcador da angiogénese (DeLisser et al. 1997, Cao et al. 2009). A marcação imunohistoquímica no urotélio do grupo controlo era limitada a menos de 5% das células e quando presente era ligeira (1+). Este facto, tradutor de uma angiogénese pouco abundante, justifica-se pela reduzida necessidade de nutrientes em relação com o baixo índice de proliferação, conforme anteriormente documentado na marcação pelo *Ki67*. Pelo contrário, no grupo carcinogénico, há positividade de *CD31* para a maioria do urotélio

.....
(50-75% das células), mais extensa e com marcação mais intensa (2+) nas áreas tumorais, em concordância com a vascularização aumentada nestas lesões.

3. Expressão Génica

O estudo do perfil de expressão génica dos tumores da bexiga tem permitido uma mais profunda compreensão dos mecanismos biológicos e das vias moleculares envolvidas na carcinogénese urotelial (Blaveri et al. 2005, Mitra et al. 2009, Bartsch et al. 2010). Foi igualmente demonstrado que a acção preventiva de alguns agentes se deve a uma modulação dessa expressão génica, reforçando a utilidade da investigação neste campo (Kim et al. 2011).

O processo celular envolvido na malignização vesical melhor estudado é a regulação do ciclo celular, primariamente controlado pelas vias do *p53* e do *Rb* (Mitra et al. 2007, Bartsch et al. 2010). No nosso estudo, houve expressão génica de *p53* no grupo BBN, contrariamente ao grupo controlo. Esta expressão aberrante, tradutora da perda do controlo da proliferação celular, contribuiu para o desenvolvimento neoplásico verificado nesses animais. A ausência de expressão de *Rb* no tecido vesical do grupo carcinogénio também era expectável, uma vez que nos cancros da bexiga ocorrem frequentemente mutações que o inactivam (Tanaka et al. 2011). A maioria dos sinais anti-proliferativos destinados a manter a homeostasia tecidular usam a via do retinoblastoma e a sua perda associa-se a um crescimento celular desregulado (Mitra et al. 2006).

Outros resultados da expressão génica obtidos no nosso modelo experimental estão em concordância com o que vem referido na literatura, justificando o desenvolvimento neoplásico por desequilíbrios dos reguladores positivos e negativos do crescimento celular: A sobreexpressão do proto-oncogene *Hras*, indutor de uma rápida proliferação celular e da evolução da hiperplasia urotelial para neoplasias papilares (Zhang et al. 2001, Ouerhani and Elgaaied 2011), do gene anti-apoptose *Bcl-2*, limitando a morte celular programada indispensável à normal homeostasia tecidular (Gonzalez-Campora et al. 2007) e do gene *VEGF*, o mais crucial na angiogénese, associado a recidivas mais precoces, formas tumorais mais invasivas e pior prognóstico (Zu et al. 2006, Nakanishi et al. 2009). A expressão aumentada de *Cox-2* está em concordância com os resultados anteriores, correlacionando-se positivamente com o processo de malignização e contribuindo para a patogénese tumoral por mecanismos diversos,

.....
 incluindo aumento da proliferação celular, resistência à apoptose, imunossupressão do hospedeiro e angiogénese tumoral (Mohammed et al. 1999, Zhang et al. 2008).

4. Sangue e Derivados

4.1. Marcadores Séricos

Os valores de *TGF-β* significativamente mais elevados no grupo BBN do que no grupo controlo estão em concordância com os resultados obtidos em humanos e em modelos experimentais (Miyamoto et al. 1995, Eder et al. 1996, Hersey 1999). Nalguns estudos com linhas celulares, o aumento de *TGF-β* permitia a fuga à imunovigilância e a formação de tumores (Torre-Amione et al. 1990).

A superfamília de *TGF-β* é constituída por um grande número de proteínas com acção chave na proliferação, diferenciação e apoptose celular, podendo ter um papel duplo, consoante o contexto celular (Massague and Chen 2000, Elliott and Blobbe 2005, Kubiczkova et al. 2012). No epitélio normal actua como supressor tumoral, inibindo a proliferação e induzindo a apoptose; durante o desenvolvimento tumoral, estes efeitos perdem-se e nas fases mais tardias tem uma função pro-oncogénica. As próprias células tumorais são capazes de produzir e secretar *TGF-β*, imunodeprimindo portadores de cancro, na ausência de tratamentos citotóxicos (Helmy et al. 2007).

A elevação de *TNF-α* no grupo carcinogénico revela o papel desta citocina na resposta aguda à agressão, assumindo uma posição coordenadora da resposta imunitária, promovendo a mobilização de células hematopoiéticas e mesenquimatosas, organizando microambientes celulares e tecidulares dinâmicos e reversíveis, limitadores do processo inflamatório (Locksley et al. 2001). Estas propriedades, conjuntamente com a sua acção mediadora da morte celular, tornam o *TNF-α* um potencial actor no processo carcinogénico, existindo considerável evidência da sua influência na patogénese do cancro da bexiga (Marsh et al. 2003).

O significativo aumento dos marcadores inflamatórios, em concreto a PCR e a *IL-6*, nos animais com malignização urotelial estão em concordância com o conhecido papel da inflamação na carcinogénese vesical (Michaud 2007, Yang et al. 2008).

4.2. Marcadores de Equilíbrio Oxidativo

É conhecida a influência do *stress* oxidativo na carcinogénese vesical. O aumento de radicais livres de oxigénio e/ou diminuição de anti-oxidantes lesa não só macromoléculas, como lípidos e proteínas, mas também directamente o DNA celular (Gecit et al. 2012, Wei et al. 2012). Para além das mutações genéticas, alterações epigenéticas, nomeadamente a hipometilação, também contribuem para o processo neoplásico. (Patchsung et al. 2012). A agressão oxidativa promove ainda a angiogénese e aumenta a migração celular, o que favorece o desenvolvimento e a metastização do tumor (Nishikawa 2008).

A maior peroxidação lipídica (MDA) no grupo do BBN foi compensada por um aumento equivalente do estado anti-oxidante total (TAS), sendo a relação MDA/TAS semelhante à do grupo controlo. Assim, apesar dos pressupostos do parágrafo anterior, o *stress* oxidativo teve um papel fisiopatológico menor no nosso modelo de desenvolvimento tumoral.

5. Perfil de Segurança e Bem-estar Animal

Durante todo o período experimental não houve em nenhum dos animais do grupo BBN e controlo sinais ou sintomas de doença e as evoluções ponderais foram praticamente sobreponíveis. De igual modo, não houve alterações no hemograma e no estudo bioquímico. A segurança e bem-estar animal foram assegurados.

II: Fármacos Imunomoduladores

A. Inibidor de *mTOR*: Sirolimus

Os carcinomas uroteliais englobam duas variantes fenotípicas com comportamentos biológicos distintos, tal como foi discutido em capítulos anteriores. Os tumores papilares não invasivos de baixo grau derivam da via do *FGFR3*, mediada essencialmente pela activação de (*RTK*)-*Ras* (Wu 2005) mas também de mutações do eixo *PI3K/AKT/mTOR* (Korkolopoulou et al. 2012).

A cascata de sinalização *PI3K/AKT/mTOR* desempenha um papel fulcral na homeostasia celular (Fig. 81) e a sua desregulação está envolvida em muitos processos carcinogénicos (Cully et al. 2006).

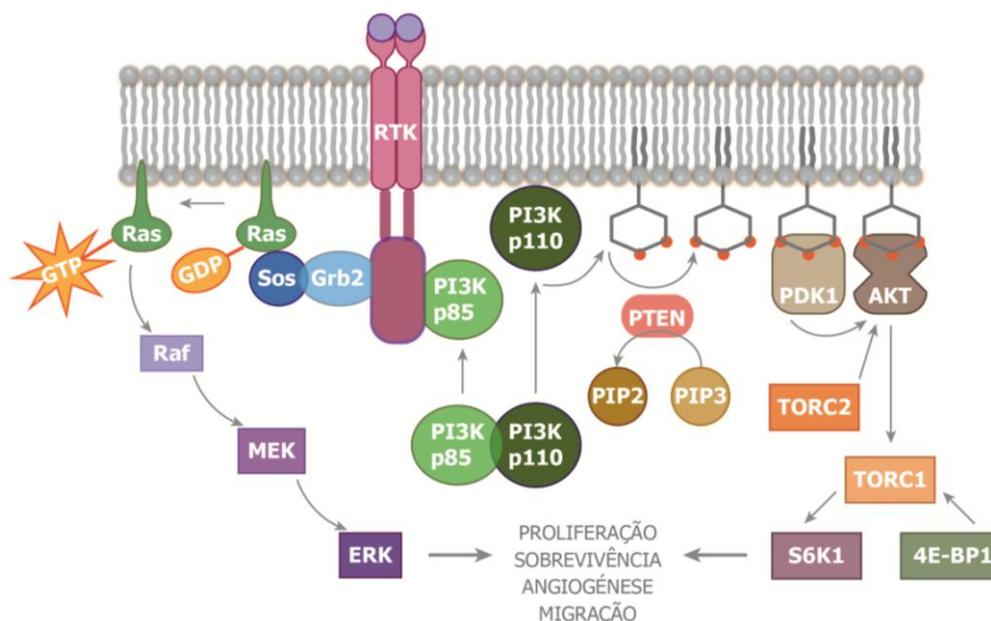


Figura 81: Papel do eixo *PI3K/AKT/mTOR* na regulação da homeostasia celular.

As *PI3K* são efectoras *major* de receptores de tirosina-cinase (*RTK*) como *FGFR*, *EGFR*, *ILGFR-1* e *PDGF*, transdutoras de sinais estimuladores de *AKT* que, por sua vez, regula a actividade de um vasto conjunto de alvos citosólicos e nucleares, incluindo outras cinases e factores de transcrição, nomeadamente o *mammalian target of rapamycin (mTOR)* (Korkolopoulou et al. 2012). O *mTOR* é uma serina-treonina cinase com acção crítica em várias funções celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, a resposta celular à agressão e a reparação do DNA (Hidalgo and Rowinsky 2000). Engloba dois complexos multi-proteicos: *TORC2* envolvido na activação de *AKT* e *TORC1* que regula as acções de

.....
 moléculas como *4E-BP1* e *S6K1*, importantes não só no crescimento, proliferação, sobrevivência e apoptose celulares mas também na síntese proteica e na angiogénese (Gust and So 2009, Hansel et al. 2010).

A activação aberrante destas vias afecta a dinâmica celular e pode facilitar a transformação neoplásica, tendo sido encontrada uma actividade aumentada de *mTOR* em vários tumores, incluindo o carcinoma urotelial (Wu et al. 2004, Vignot et al. 2005, Robb et al. 2007, Wan and Helman 2007, Sheppard et al. 2012, Provenzano et al. 2013, Weijenberg et al. 2013). A sua inibição pode repor o equilíbrio proliferativo, tornando este eixo um alvo primordial no desenvolvimento de novas estratégias anti-cancro.

Com base no que atrás foi referido, decidimos usar o Sirolimus, um inibidor de *mTOR*, na nossa investigação. Embora este fármaco já tivesse demonstrado actividade anti-neoplásica em vários tumores, ainda não tinha sido usado no cancro da bexiga na altura em que iniciámos o nosso projecto (Dudkin et al. 2001, Yu et al. 2001, Wan and Helman 2007, Cloughesy et al. 2008). As primeiras publicações referentes aos efeitos do Sirolimus num modelo de carcinogénese vesical surgem em 2008, da nossa autoria (Parada et al. 2008, Parada et al. 2008), seguidos no ano de 2009 por resultados de outros grupos (Oliveira et al. 2009, Pinto-Leite et al. 2009).

O Sirolimus (também conhecido como Rapamicina) é uma lactona macrocíclica produzida pelo *Streptomyces hygroscopicus*, descoberto no solo da região *Vai Atari* na Ilha da Páscoa (*Rapa Nui*), inicialmente descrito como tendo acção antifúngica sobre *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton granulosum* e uma actividade antibacteriana marginal, limitada a alguns Gram positivos como o *Staphylococcus aureus* (Vezina et al. 1975).

O Sirolimus é um potente imunossupressor usado na transplantação de órgãos, sendo a prevenção das rejeições a sua principal indicação clínica (Mota 2005). Liga-se intracelularmente à imunofilina citosólica *FKBP-12*, formando um complexo que inibe a activação de *mTOR*, bloqueando a progressão *G1-S* do ciclo a várias linhas celulares, incluindo linfócitos T e B, e inibindo citocinas promotoras de proliferação e de diferenciação, nomeadamente linfocinas (Sehgal 1998). Para além disso, interrompe as respostas das células B, reduzindo a produção de imunoglobulinas, evita a proliferação de células mesenquimatosas e preserva a apoptose das células T (Luo et al. 1992, Sehgal 2003).

Este fármaco é administrado por via oral, numa única toma diária, é rapidamente absorvido (máximo 2 h), tem uma ampla distribuição

tecidual, uma longa semi-vida (~60 h) e uma proporcionalidade entre a dose administrada e a concentração sanguínea, estando estas concentrações relacionadas com a acção imunossupressora e com as reacções adversas (Yatscoff 1996, Trepanier et al. 1998). A metabolização é hepática, pela enzima 3A4 do citocromo P450, simples desmetilação e hidroxilação, podendo haver interacções medicamentosas com fármacos metabolizados pelo mesmo sistema. Mais de 90% da eliminação dá-se por via gastrintestinal, sendo a eliminação renal mínima (2%). As concentrações sanguíneas recomendadas variam em função do tempo de transplante, sendo necessário o seu doseamento regular para ajustar as dosagens terapêuticas (Kahan et al. 2000).

Nos estudos em ratos, as doses de Sirolimus por via oral variaram entre 0,4 e 6,4 mg/kg/dia, sendo a dose de 1,0 mg/kg/dia das mais referidas (Napoli et al. 1997, Podder et al. 2001, Stepkowski 2003, Bai et al. 2004). Atendendo a estes dados, à dificuldade do ajustamento da dose e à relação proporcional entre dose administrada e concentração sanguínea, optámos por utilizar duas dosagens: 1,0 e 2,0 mg/kg/dia.

Decidimos também testar a eficácia deste agente numa administração precoce, simultânea com o carcinogénio, até à semana oito (prevenção precoce) e numa administração tardia, pós-carcinogénio, da semana nove até ao sacrifício dos animais (prevenção tardia).

A administração precoce de Sirolimus, nas doses de 1 e 2 mg/kg/dia, não se associou a uma redução da incidência de neoplasias vesicais, havendo, pelo contrário, um aumento, de 68% no grupo BBN para 75% no grupo Sir 1 PP e 80% no grupo Sir 2 PP. A reforçar esta tendência negativa, os tumores múltiplos foram mais frequentes, embora mantendo as características macroscópicas, chegando mesmo a haver quatro, cinco ou sete neoplasias na mesma bexiga, o que se traduziu num número médio de tumores por rato mais elevado, sobretudo na dose mais baixa. O único dado positivo obtido foi uma redução no tamanho e volume dos tumores, muito mais significativa na dose mais elevada.

Estes resultados contrastaram com o efeito preventivo obtido no grupo Sir 2 PT, a única dosagem utilizada nesta fase. Houve não apenas uma redução no número de ratos que desenvolveram tumor vesical, três em oito (37,5%), como também uma redução do número médio de tumores e, sobretudo, do volume tumoral, que não ultrapassou os 1,04 cm³ (Parada et al. 2011).

Os resultados tão díspares obtidos com a administração do mesmo agente, o Sirolimus, inclusive na mesma dose, 2 mg/kg/dia, mas em

.....
períodos temporais distintos, prevenção precoce ou tardia, são intrigantes e surpreenderam.

À semelhança dos humanos, animais imunocompetentes são capazes de reconhecer e eliminar células cancerígenas, não apenas antes do desenvolvimento tumoral mas também após a sua formação, a denominada *imunovigilância do cancro* (Arum et al. 2010). Os linfócitos T citotóxicos reconhecem antigénios de superfície específicos de células tumorais, eliminando-as. Além disso, as células tumorais que não expressam uma ou mais moléculas de histocompatibilidade de classe I são alvo das células *natural-killer* (Karre 2002, Helmy et al. 2007). Contudo, os tumores podem ocorrer mesmo em indivíduos sem compromisso imunológico. Embora haja considerável diversidade nas interacções tumor-hospedeiro, as células malignas podem escapar à imunovigilância devido ao surgimento de variantes celulares fracamente imunogénicas (imunoselecção) e/ou pela subversão imunológica (imunosubversão) (Zitvogel et al. 2006, Reiman et al. 2007). Há indicações de que o tumor urotelial desencadeia uma resposta imunológica e é susceptível à imunoterapia, o que está na base, aliás, do uso do BCG nesta neoplasia (Sherif et al. 2010).

Perante estes conceitos, a questão que se coloca é: porque é que a administração precoce de Sirolimus leva a um aumento na incidência e no número de tumores enquanto a sua administração mais tardia tem o efeito inverso?

Sabemos que este fármaco tem duas acções aparentemente opostas no processo neoplásico: uma acção imunossupressora facilitadora da carcinogénese e uma acção anti-proliferativa, inibidora desse processo. É no equilíbrio desta balança que devemos procurar as respostas.

Uma função natural do sistema imunológico é detectar células aberrantes em fase ainda pré-neoplásica e erradicá-las. A infiltração por linfócitos T é um fenómeno documentado na maioria senão mesmo na totalidade dos tumores e estudos comprovam que esta infiltração ocorre numa fase muito precoce da doença (Reiman et al. 2007). Em muitos casos esta infiltração linfocitária correlaciona-se de forma directa com a evolução neoplásica, sendo o volume tumoral menor e a sobrevivência maior quando ela ocorre (Pages et al. 2005, Sato et al. 2005). A administração do Sirolimus na fase inicial do processo de indução carcinogénica vai bloquear a activação do processo imunológico, nomeadamente a proliferação e diferenciação de linfócitos T e a reparação do DNA, o que dificulta a *imunovigilância do cancro*. A não erradicação de células displásicas e neoplásicas numa fase precoce

.....
permite o desenvolvimento de múltiplos nichos tumorais. Isso explica o facto de nos grupos Sir 1 PP e Sir 2 PP haver maior incidência de neoplasias, ser maior o número médio de tumores e serem mais frequentes os tumores múltiplos. A acção anti-proliferativa deste fármaco nesta fase inicial do processo de malignização é menos importante, não só porque não impede os processos de indução e progressão neoplásica mas também porque a carga tumoral é ainda pouco relevante. Apesar disso, ela reduz o crescimento celular, daí os volumes médios serem inferiores aos do grupo BBN, de forma mais marcada no grupo Sir 2 PP.

Pelo contrário, com a utilização do Sirolimus apenas a partir da nona semana, a resposta imunológica inicial do hospedeiro não é inibida, não havendo a potenciação tumoral verificada na administração precoce. A imunossupressão tem assim um papel menos nefasto, sobressaindo o efeito positivo da inibição da proliferação das células carcinogénicas. Isso explica que no grupo Sir 2 PT haja uma redução de todos os parâmetros: incidência, número de tumores e, de forma muito acentuada, volume tumoral.

A análise histológica revela que há, em todos os grupos, uma redução da extensão das lesões hiperplásicas, da displasia de alto grau e do *Cis*, embora de forma mais acentuada na dose de 2mg/kg/dia e na administração tardia. Essa diferença torna-se flagrante se nos debruçarmos sobre os carcinomas uroteliais em que temos apenas dois de alto grau no grupo Sir 2 PT, contra oito nos grupos Sir 1 PP e Sir 2 PP. Estes dados reforçam a hipótese anterior, isto é, a quimioprevenção em tempos diferentes condiciona não apenas variações quantitativas nos tumores mas também diferenças na sua agressividade histológica.

O facto de a incidência de displasia de alto grau e do *Cis* ser significativamente mais elevada nos ratos com cancro, o mesmo se verificando nos grupos da CsA, apenas consolida a sua associação à carcinogénese vesical, fazendo parte de um contínuo no processo de malignização, conforme já havíamos expressado na descrição do modelo experimental.

O estudo imunohistoquímico traz-nos dados adicionais sobre potenciais acções do Sirolimus na carcinogénese vesical. Verificámos que nos ratos expostos a BBN, sem qualquer administração farmacológica adicional, havia uma imunopositividade moderada (2+) para *p53* em todas as bexigas, não apenas em áreas com alterações histológicas mas mesmo em áreas de urotélio aparentemente normal, traduzindo alterações mutagénicas generalizadas. O Sirolimus permite uma preservação

.....
relativa da integridade desta via supressora tumoral. Embora esse efeito positivo já se faça sentir no grupo Sir 1 PP, ele é mais marcado na dose mais elevada e na administração mais tardia, Sir 2 PT, em que há apenas uma positividade ligeira (1+) e limitada (10%) para p53 nas áreas histologicamente alteradas de bexigas com tumor, traduzindo uma reposição da estabilidade e controlo do ciclo celular que contribuiu para a diminuição da carga tumoral neste grupo.

A importância da homeostasia da replicação celular na prevenção de carcinomas ficou bem evidenciada pelos resultados da marcação para Ki67. As bexigas em que não houve desenvolvimento neoplásico foram aquelas em que a acção anti-proliferativa deste fármaco se fez notar, com marcações mais ligeiras e localizadas, reflexo de ciclos celulares mais lentos. Neste caso, os resultados não diferiram em função da dosagem ou do momento da administração, o que vem ao encontro da hipótese inicial de que as diferenças na incidência tumoral tenham uma significativa base imunológica. Logicamente, a marcação para CD31 também foi muito menor do que no grupo BBN, em concordância com a conhecida inibição da angiogénese pelo bloqueio de mTOR.

Os resultados da expressão génica confirmam que a prevenção tumoral conseguida no grupo Sir 2 PT se deveu, em grande parte, a um reequilíbrio na regulação do crescimento celular tendo-se verificado:

- Uma diminuição de genes promotores da proliferação, como o *Ki67* ou da progressão G1-S do ciclo celular, como o *CCND3*.
- Uma diminuição do proto-oncogene *Hras* e uma expressão aumentada do gene supressor tumoral *Arf-1*, silenciado no grupo BBN.
- Ausência de expressão aberrante de *P53* ou de *Cox-2*.
- Uma recuperação da apoptose celular, confirmada pela expressão aumentada dos genes pró-apoptóticos *Bax* e *Caspase 3*, com diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2*.
- Uma diminuição de *VEGF*, promotor da angiogénese e da migração celular.

Nos marcadores séricos verificou-se a mesma tendência. O grupo de prevenção farmacológica mais tardia foi o único em que se observou uma diminuição de *TGF-β*, com conhecidas acções proto-oncogénicas e promotor de microambientes pró-tumorais (Dumont and Arteaga 2002, Leivonen and Kahari 2007) e um aumento de *TNF-α*. A elevação significativa desta citocina é tradutora de uma forte activação da resposta imunitária à agressão tumoral, que não foi comprometida neste grupo, ao contrário dos grupos de prevenção precoce (Locksley et al. 2001).

.....
A acção anti-inflamatória deste fármaco na prevenção tumoral parece ser pouco relevante, dado que não se obtiveram resultados consistentes, verificando-se uma diminuição da PCR mas um aumento de *IL-1 β* .

É conhecida a acção lesiva dos radicais livres de oxigénio sobre o DNA e outras biomoléculas, favorecedora da carcinogénese (Halliwell 2007). Por isso, não foi surpreendente que o único grupo em que se verificou uma diminuição do *stress* oxidativo, pela redução de MDA/TAS, tenha sido aquele em que houve uma diminuição de todos os parâmetros de desenvolvimento tumoral. Contudo, a contribuição relativa deste mecanismo de acção na prevenção tumoral é difícil de estabelecer.

As reacções adversas do Sirolimus são conhecidas (EMA , Saunders et al. 2001). Não se verificou nenhuma forma de mielotoxicidade. Conforme esperado, houve uma elevação dos parâmetros lipídicos, o efeito secundário mais comum, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, mas apenas nos controlos do Sirolimus. A elevação de transaminases hepáticas, que não aparece habitualmente descrita, pode compreender-se nos grupos expostos simultaneamente ao carcinogénio e ao fármaco, dada a metabolização hepática dos dois compostos mas o facto de ter sido mais acentuada nos controlos é de difícil explicação. Contudo, não teve repercussões visíveis no bem-estar e comportamento animal.

Durante a toma do Sirolimus, os ratos tiveram um menor crescimento e uma evolução ponderal mais lenta, consequências prováveis da sua acção inibidora da proliferação celular. Mas, mais uma vez, sem aparente repercussão na saúde animal.

B. Inibidor da Calcineurina: Ciclosporina A (CsA)

A descoberta da CsA em 1972 na Suíça e a sua introdução como imunossupressor na prática clínica no final dessa década, constituiu um marco na história da transplantação, permitindo reduzir de forma drástica as rejeições agudas e praticamente duplicar a sobrevivência do enxerto renal no 1.º ano, para valores superiores a 90% (Tedesco and Haragsim 2012).

A acção imunossupressora resulta da sua ligação intracelular a uma imunofilina, a ciclofilina, inibindo a calcineurina, uma fosfatase serina-treonina dependente do cálcio/calmodulina. Esta inibição impede a desfosforilação de vários factores de transcrição, nomeadamente do factor nuclear de linfócitos T activados e da sua subsequente translocação para o núcleo, num processo mediado pela *IL-2*. O bloqueio

.....
a este nível impede a activação de promotores de linfócitos T e a resposta imunológica em geral (Shaw et al. 1995, Naesens et al. 2009). A CsA é administrada maioritariamente por via oral tendo a grande variabilidade inter-individual na sua absorção intestinal sido mitigada pelas novas formulações com microemulsões. A utilização endovenosa e tópica também são possíveis. O metabolismo é primariamente hepático, pelas enzimas 3A4 e 3A5 do citocromo P450. Os metabólitos são eliminados na biliar, com excreção renal inferior a 5%. Tem uma semi-vida de 6,4 a 8,7 horas (Shaw 1989, Tedesco and Haragsim 2012).

Decidimos utilizar a CsA no nosso estudo para servir de "contraponto" ao Sirolimus: um inibidor da calcineurina e um inibidor de *mTOR*, os dois grupos de imunomoduladores mais importantes na terapêutica anti-rejeição, apesar de o mecanismo de acção dos primeiros não incluir putativos efeitos anticarcinogénicos. Aliás, a utilização de CsA tem sido associada a várias neoplasias, principalmente cancros de pele (não melanomas) e doenças linfoproliferativas, nalguns casos, com regressão tumoral após descontinuação do fármaco (Penn and First 1986, Tjon et al. 2010, Muellenhoff and Koo 2012). Não foi demonstrado que a CsA fosse genotóxica, induzindo mutações genéticas, aberrações cromossómicas ou disfunção da reparação do DNA, nas várias populações celulares estudadas (Zwanenburg and Cordier 1994) e o potencial carcinogénico está associado intrinsecamente à imunossupressão, sendo provavelmente dependente da dose (Ryffel 1992). Contudo, também foi referida uma promoção tumoral por acção celular directa, com envolvimento da produção de *TGF-β*, incluindo alterações da morfologia, motilidade e crescimento celular (Hojo et al. 1999).

Não obstante estes dados, tem sido referida a capacidade deste inibidor da calcineurina de reverter a resistência de alguns tumores a agentes de quimioterapia (Sarisozen et al. 2012), tendo sido utilizado em ensaios clínicos (Cabot et al. 1999, Kruijtzter et al. 2002, Morgan et al. 2007). Por outro lado, estudos experimentais demonstraram mesmo uma acção anti-tumoral (Saydjari et al. 1988, Sakai et al. 2004, Masuo et al. 2009, Jiang et al. 2012, Sarisozen et al. 2012).

Este comportamento bipolar da CsA relativamente ao cancro tornou o seu estudo no nosso modelo animal ainda mais atractivo.

À semelhança do Sirolimus, as doses de CsA utilizadas em modelos experimentais com ratos variaram entre 1,0 e 30,0 mg/kg/dia (Wagner et al. 1987, Podder et al. 2001). Optámos pela dose de 5 mg/kg/dia, previamente avaliada em estudos farmacocinéticos (Wassef et al. 1985), num contexto de prevenção precoce e prevenção tardia.

.....
A quimioprevenção com CsA, precoce e tardia, não se revelou eficaz, não tendo havido uma redução significativa de nenhum dos três parâmetros macroscópicos avaliados: percentagem de ratos com tumor, número de tumores ou volume tumoral. Apesar da ausência de melhoria estatisticamente relevante, é possível identificar uma tendência mais favorável no grupo de administração mais tardia do fármaco, o grupo CsA PT: os três componentes atrás referidos tiveram valores mais baixos do que no grupo BBN e no grupo CsA PP. Atendendo à sua acção imunossupressora, a nossa justificação para este facto é idêntica à do Sirolimus. O bloqueio precoce da imunovigilância impede a eliminação de células tumorais com o conseqüente desenvolvimento neoplásico, enquanto na sua administração mais tardia a acção nefasta desta imunodeficiência é menos relevante na carcinogénese.

A análise histológica revela uma redução da extensão de algumas lesões hiperplásicas e da displasia de alto grau, embora na mais agressiva das lesões, o *Cis*, esse benefício não se tenha verificado. Se analisarmos especificamente os carcinomas uroteliais, confirma-se a falta de capacidade preventiva deste fármaco. No total, nove em treze (69,3%) dos carcinomas são de alto grau: sete em oito no grupo CsA PP e dois em cinco no grupo CsA PT.

A interpretação dos resultados dos nossos exames complementares, à luz dos vários mecanismos envolvidos na carcinogénese vesical, permite uma maior compreensão sobre a reduzida capacidade anti-tumoral deste fármaco.

Se olharmos para o crescimento celular nos animais tratados com CsA podemos constatar que não há um reequilíbrio da dinâmica proliferativa alterada pelo carcinogénio. Na imunomarcagem de *Ki67* os resultados pouco se distinguem dos do grupo BBN, com positividade nunca inferior a 5%, mesmo na ausência de tumor, podendo chegar a 20% em zonas de urotélio patológico. A expressão génica de *Ki67* está mesmo aumentada no grupo CsA PP. Verifica-se um comportamento semelhante na expressão de *Hras* e estes dados podem justificar a incidência tumoral mais elevada no grupo CsA PP.

A expressão aumentada de *Ccnd3*, gene promotor da progressão do ciclo, contribui para a manutenção do desequilíbrio de renovação celular. De referir que a diminuição da expressão do gene *Bcl-2*, inibidor da apoptose celular, não foi suficiente para repor esse equilíbrio e inibir o desenvolvimento de tumores.

A integridade das vias supressoras tumorais, corrompida pela nitrosamina, é reposta pela CsA em extensão muito menor do que a

.....
conseguida com administração de Sirolimus, conforme se pode comprovar pelo estudo imunohistoquímico e de expressão génica de p53.

O papel da CsA na angiogénese não aparece normalmente referido e, por isso, poderia parecer surpreendente a acção anti-angiogénica verificada no nosso trabalho. A marcação imunohistoquímica de CD31 atinge praticamente os valores obtidos nos animais do grupo Controlo, discutidos no capítulo anterior, apenas estando presente no urotélio tumoral, com positividade ligeira (1+) e pouco extensa (20%), sendo negativa em todos os casos restantes. Contudo, é possível encontrar várias referências a esta capacidade anti-angiogénica da CsA (Norrby 1992, Iurlaro et al. 1998) que já justificou, aliás, o seu uso no tratamento de lesões psoriáticas (Bruzese and Pepe 2009). De referir ainda que a sub-regulação de *VEGF*, observada no nosso trabalho, já havia sido apontada por outros autores como um dos mecanismos envolvidos neste processo (Shah et al. 2008). No entanto, esta acção inibidora da neovascularização não foi suficiente para a prevenção tumoral.

Apesar de o valor de *TGF-β* ter sido significativamente mais baixo nos controlos da CsA, essa acção protectora não se verificou na presença do carcinogénio. Dos restantes marcadores séricos há a destacar uma elevação da *IL-1β*. Para além deste efeito pró-inflamatório, este fármaco também induziu um estado pró-oxidante, por aumento da peroxidação lipídica (MDA) e ambas estas acções são favorecedoras do processo neoplásico.

Os efeitos secundários da CsA estão amplamente descritos, não só nos humanos (Keown et al. 1982, Melnikov et al. 2011, Panicker et al. 2012) mas também no rato (Catanzaro et al. 2010). Aliás, os efeitos cardiovasculares deste fármaco em modelos animais já foram objecto de publicação pelo nosso grupo (Reis et al. 2009, Sereno et al. 2012). Do ponto de vista analítico, não houve anomalias no hemograma. As alterações nos parâmetros bioquímicos foram ligeiras e neste estudo a CsA não afectou de forma notória a saúde e o bem-estar animal. A progressão ponderal não diferiu significativamente da dos controlos.

III: Fármacos Inibidores das Ciclooxygenases

A inflamação é um processo fisiológico crucial na resposta a agressões diversas e na subsequente reposição da homeostasia funcional e anatómica. Contudo, uma activação inflamatória exacerbada ou persistente pode ser causa de doenças e existe evidência crescente da sua participação na etiopatogenia do cancro da bexiga (Tanaka et al. 2011, Czachorowski et al. 2012). Pudemos constatar isso no nosso modelo, com uma elevação dos marcadores inflamatórios no grupo carcinogénico.

As ciclooxygenases (Cox) são enzimas chave na produção de eicosanóides, como as prostaglandinas e os tromboxanos, metabólitos do ácido araquidónico, essenciais na inflamação e em numerosos processos biológicos, incluindo a ovulação, angiogénese, agregação plaquetar e função imunológica (Williams et al. 1999). Existem duas isoformas, a Cox-1 e a Cox-2. Enquanto a Cox-1 é encontrada constitutivamente em grande parte dos tecidos, sendo mediadora da síntese de prostaglandinas requeridas para funções fisiológicas normais, a maioria dos tecidos, à excepção da placenta, da macula densa e do cérebro, não expressam Cox-2 em condições normais. Contudo, a sobreexpressão de Cox-2 pode ser induzida por citocinas, hormonas, factores de crescimento e outros estímulos proliferativos (Czachorowski et al. 2012). Isto ocorre não só em processos inflamatórios mas também em muitos cancros, incluindo o carcinoma de células de transição. Para além desta expressão aumentada, a Cox-2 participa activamente no processo carcinogénico e a sua inibição pode contribuir para a quimioprevenção tumoral (Subbaramaiah and Dannenberg 2003, de Groot et al. 2007). Esta capacidade tinha já sido demonstrada noutros tumores, dos quais se destaca o carcinoma colo-rectal (Rosenberg et al. 1998, de Heer et al. 2008, Narayanan et al. 2009).

Estes dados levaram-nos a testar este tipo de fármacos no nosso modelo animal. Optámos pelo Celecoxib, um inibidor selectivo da Cox-2, e pelo Ácido Acetilsalicílico (AAS), um inibidor da Cox-1 e da Cox-2. Estudos populacionais e caso-controlo confirmaram o efeito protector dos anti-inflamatórios não esteróides (AINE) no cancro da bexiga (Castelao et al. 2000, Blumentals et al. 2004) e embora alguns trabalhos experimentais já fizessem referência ao seu uso neste tumor, os mecanismos de acção permanecem pouco esclarecidos e nenhum grupo fez uma comparação directa entre os inibidores selectivos e não selectivos

.....
da Cox-2 ou entre baixas e altas doses (Okajima et al. 1998, Hattori et al. 2006).

Após a administração esofágica do Celecoxib numa solução líquida, o que aconteceu no nosso trabalho, a absorção dá-se rapidamente ao longo de todo o tracto gastrintestinal e a concentração máxima é atingida na maioria dos tecidos ao fim de uma hora, com uma elevada biodisponibilidade. Liga-se extensamente às proteínas, maioritariamente à albumina, e é metabolizado no fígado pela isoenzima 2C9 do citocromo P450 (CYP2C9), embora o CYP3A4 também desempenhe um papel *minor*. Tem uma semi-vida sanguínea de 4,2 horas e é eliminado após biotransformação quase total (97%) a compostos inactivos, o ácido carboxílico e metabólitos glucorónidos, maioritariamente nas fezes (88 a 94%), o restante na urina (Davies et al. 2000, Paulson et al. 2000, Paulson et al. 2001, Gong et al. 2012).

Alguns estudos experimentais prévios noutros tumores demonstraram uma eficácia quimiopreventiva do Celecoxib em baixas doses, embora mostrassem igualmente uma maior acção para doses crescentes (Abou-Issa et al. 2001, Ravoori et al. 2008). Nesse sentido, decidimos usar uma dose de 10 mg/kg/dia, comprovadamente eficaz na prevenção experimental do carcinoma gástrico (Hu et al. 2004) e uma dose de 1 mg/kg/dia, com um perfil de segurança previsivelmente mais favorável.

Quanto ao AAS, a absorção gastrintestinal, quando administrado em solução, é praticamente completa nos ratos. Contudo, apenas cerca de um quarto da dose o é de forma intacta e a biodisponibilidade é muito variável. Sofre um efeito de primeira passagem, primariamente intestinal e, menos importante, hepática, sendo hidrolisado a salicilato por esterases. O fármaco é rapidamente eliminado, com uma $\frac{1}{2}$ variável em função da dose, de apenas oito minutos num estudo experimental com uma dose oral de 200 mg/kg. O metabolismo de AAS, numa dose oral variável de 10-100 mg/kg, resultou numa excreção urinária de 81-91% nas primeiras 24 horas, essencialmente como salicilato. Outros metabólitos foram o ácido salicilúrico, gentísico e glucorónidos salicil fenólico e acil (Iwamoto et al. 1982, Wientjes and Levy 1988, Patel et al. 1990).

Embora alguns trabalhos confirmem uma relação dose efeito crescente na acção antitumoral do AAS, à semelhança do Celecoxib (Li et al. 1999), há referência a uma acção paradoxal, com efeitos benéficos para doses baixas, 12,5-25 mg/kg, e nefastos para doses elevadas, 200-400 mg/kg (Arrieta et al. 2001). Daí termos optado pela dose de 25 mg/kg/dia, que provou não induzir lesões gástricas por via oral (Ligumsky et al. 1983) e pela dose de 250 mg/kg/dia.

.....
A administração do Celecoxib durante a fase de indução carcinogénica associou-se a uma redução muito significativa da incidência de cancro da bexiga, apenas num rato em oito (12,5%), não só na dose mais elevada, grupo Celecox 10 PP, mas também na dose reduzida, grupo Celecox 1 PP, não se verificando a relação directa dose-efeito anteriormente referida. Este dado é particularmente importante, ao confirmar a eficácia de doses baixas, associadas a menor toxicidade.

A quimioprevenção precoce com o AAS revelou-se igualmente positiva, embora com maior eficácia na dose mais elevada, com uma incidência tumoral de 37,5% no grupo AAS 25 PP e 12,5% no grupo AAS 250 PP.

Merece igual destaque o facto de todas as neoplasias atrás mencionadas terem tamanho reduzido, com maior eixo inferior a 3 mm.

Estes achados macroscópicos tiveram uma expressão equivalente na análise histológica, confirmando-se uma redução significativa das lesões pré-neoplásicas, nomeadamente da hiperplasia papilar, dos papilomas, da displasia de alto grau e do *Cis*, que estavam mesmo ausentes nos grupos do Celecoxib. Nos grupos do AAS verificou-se novamente uma relação crescente dose-efeito.

Os carcinomas uroteliais nestes grupos, para além de menos frequentes e menos volumosos, também eram histologicamente menos invasivos e mais diferenciados, predominantemente *Ta de baixo grau*. Vários trabalhos encontraram uma expressão aumentada de *Cox-2* em tumores com estadios e graus de diferenciação mais avançados (Hammam et al. 2008, Czachorowski et al. 2012). A nossa marcação imunohistoquímica para a *Cox-2* reproduziu estes dados, tendo-se verificado uma intensa expressão (3+) nos tumores do grupo BBN, histologicamente mais agressivos, grande parte deles de *alto grau*. Por outro lado, a positividade em áreas uroteliais "normais" e "hiperplásicas" confirma que a participação desta ciclooxygenase no processo carcinogénico ocorre desde o início, não sendo apenas um "produto final" da malignização. Compreende-se assim que a inibição desta via pelo Celecoxib e pelo AAS tenha condicionado uma menor expressão de *Cox-2*, associada a uma menor agressividade tumoral. A análise dos nossos resultados mostra que com a quimioprevenção precoce a marcação ou era negativa ou apenas ligeira (1+) nos raros animais em que se desenvolveu o tumor.

O estudo de expressão génica reforça os dados da imunohistoquímica, tendo-se verificado uma diminuição da *expression ratio* de *Cox-2* superior a 50% em todos os grupos estudados, relativamente ao grupo BBN.

.....

Todos estes dados sugerem uma acção protectora dos inibidores da Cox-2 no cancro da bexiga, quer a inibição seja selectiva ou não, quando utilizados numa fase precoce do processo carcinogénico. Embora esta ciclooxigenase não seja por si só um iniciador tumoral, pode contribuir para a progressão neoplásica por aumento do crescimento e invasão celular, inibição da apoptose, estímulo pró-angiogénico e supressão da resposta imunitária (Trifan and Hla 2003, Youssef et al. 2011). A inibição destes processos pró-carcinogénicos está na base da capacidade anti-tumoral dos agentes utilizados (Subbaramaiah and Dannenberg 2003, de Groot et al. 2007).

Com a utilização do Celecoxib e do AAS no nosso modelo experimental, a prevenção neoplásica deu-se por modulação de várias vias:

- a) Proliferação e progressão do ciclo celular: a activação da via do ácido araquidónico leva à produção de substâncias promotoras da proliferação, motilidade e invasão celulares (Trifan and Hla 2003, Singh et al. 2005, de Groot et al. 2007). Com a manipulação farmacológica conseguimos uma inibição destes estímulos proliferativos, demonstrada pela imunomarcagem mais ligeira e limitada de *Ki67*, pelos resultados da expressão génica de *EGFr* e pela redução dos valores séricos de *TGF-β*. Esta capacidade foi demonstrada noutras neoplasias, como o cancro da próstata (Katkooi et al. 2013). Conseguiu-se também uma recuperação parcial da integridade do ciclo celular, com reposição da função supressora de *p53*, evidenciada pela imunohistoquímica e expressão génica, do gene supressor *ARF-1*, nos grupos do AAS, bem como pela diminuição acentuada do proto-oncogene *Hras*.
- b) Apoptose: uma das mais importantes características anti-neoplásicas referidas para os inibidores da Cox-2 advém da sua capacidade em recuperar a apoptose celular, quer por aumento de proteínas pró-apoptóticas, quer por redução de proteínas anti-apoptóticas (Jendrossek et al. 2003, Agarwal et al. 2013) como foi demonstrado no nosso trabalho, com diminuição de *Bcl-2* em todos os grupos tratados com inibidores da Cox. De realçar o decréscimo mais intenso de *Bcl-2* com a dupla inibição de Cox-1 e Cox-2 pelo AAS.
- c) Angiogénese: os prostanóides regulam a angiogénese em doenças inflamatórias e carcinomas e a sua modulação é uma das estratégias justificativas do uso destes fármacos na terapêutica anti-tumoral (Salvado et al. 2012). A validade deste mecanismo foi por nós confirmada, com redução da expressão de *CD31* nos

tecidos tratados com Celecoxib e do gene *VEGF* em todos os grupos do AAS, traduzindo uma actividade angiogénica menos intensa. A neoangiogénese é um passo essencial no crescimento e metastização tumoral e a inibição deste processo poderá explicar o facto de as neoplasias nestes animais não terem ultrapassado os 3 mm de maior eixo.

- d) Imunomodulação: as prostaglandinas podem inibir a blastogénese de linfócitos T e a actividade citolítica das células *Natural killer* contribuindo para um efeito imunossupressor, o que é negativo num contexto de oncogénese, como já ficou demonstrado quando abordámos os fármacos imunossupressores (Trifan and Hla 2003). O bloqueio da sua síntese pode recuperar essa competência imunológica, contribuindo para a acção anti-carcinogénica dos inibidores da *Cox* (Veltman et al. 2010). No nosso estudo observámos uma activação de *TNF- α* com a administração de Celecoxib, tradutora da resposta imunitária à agressão carcinogénica.

Apesar de muitos mecanismos ainda não estarem completamente esclarecidos, sabe-se que nem todas as acções anti-tumorais destes fármacos se devem a efeitos dependentes da via da ciclooxigenase. Há mecanismos autónomos que incluem, por exemplo, a inibição da cascata de sinalização *PI3K/AKT*, já anteriormente discutida a propósito dos inibidores da *mTOR*, e que regula a actividade de várias cinases e factores de transcrição (Gowda et al. 2013), a supressão da ciclina D1 (Dhawan et al. 2008), a regulação da adesão celular através da expressão de Caderina E (Adhim et al. 2011) e, obviamente, a própria acção anti-inflamatória, observada também nos nossos animais, com uma redução significativa da *PCR*.

A administração de Celecoxib na segunda fase do estudo, Celecox 10 PT, não foi eficaz. Não houve redução na incidência de lesões hiperplásicas, pré-neoplásicas ou neoplásicas e também não ocorreu a diminuição da agressividade ou volume dos tumores. Dados estes resultados, decidimos não prosseguir com o estudo de Celecox de baixa dose ou de AAS num contexto de quimioprevenção tardia.

Provavelmente, os mecanismos anti-carcinogénicos destes fármacos, discutidos nos parágrafos anteriores, só se revelam efectivos numa fase inicial de indução tumoral e não numa fase em que a oncogénese já está estabelecida. Teriam, assim, uma acção protectora/lentificadora dos processos conducentes a mutações genéticas, revelando-se incapazes da sua reversão numa fase mais tardia da progressão tumoral, em que o desequilíbrio proliferativo já estivesse estabelecido. Isto justifica

.....
o perfil de doentes que mais poderiam beneficiar da acção preventiva destes agentes: doentes com alto risco de desenvolver esta neoplasia e doentes com história prévia de tumores vesicais não músculo-invasivos. Uma questão que se pode colocar é o porquê da utilização neste modelo experimental do AAS, um inibidor não selectivo, quando a evidência aponta a *Cox-2* como sendo a envolvida na oncogénese. Para além das questões de segurança, que abordaremos posteriormente, e do facto de algumas acções serem independentes dos produtos do ácido araquidónico, a selectividade dos inibidores da *Cox-2* não é total e importa saber até que ponto uma dupla inibição não poderia ter efeitos aditivos na prevenção tumoral (Gee et al. 2006, Axelsson et al. 2010). Por outro lado, a proteína *Cox-1* também pode ser detectada imunohistoquimicamente em células neoplásicas e há mesmo um estudo que refere uma sobreexpressão de *Cox-1* num modelo de carcinoma colorectal (Gustafson-Svard et al. 1996). Apesar destes conceitos, no nosso modelo a utilização de AAS não teve maior eficácia do que o Celecoxib na prevenção tumoral e ao contrário deste, só obteve eficácia máxima para altas doses, perdendo na comparação directa.

A acção dos inibidores da *Cox* no equilíbrio oxidativo teve uma acção marginal na quimioprevenção tumoral dado que, à excepção do grupo Celecox 10 PP, não houve um perfil oxidativo mais favorável em nenhum dos restantes.

Embora não tenha havido alterações no comportamento animal sugestivas de doença ou sofrimento, houve dois ratos do grupo AAS 250 PP que tiveram anemia. Pelo contrário, não houve alterações dos parâmetros bioquímicos estudados, nomeadamente das provas de função renal. Merece igualmente referência o menor ganho ponderal associado à toma destes fármacos, sem relação com a dose.

IV: Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

A. Atorvastatina

Foi há mais de um século que White sugeriu que o colesterol "...may, in some way or other, be associated with the regulation of proliferation..." (White 1909) tendo Chen afirmado, décadas mais tarde "...se a síntese de colesterol é necessária, em condições normais, para a proliferação celular, existe a possibilidade de que a sua síntese anormal contribua para uma proliferação desregulada, isto é, um estado de malignidade" (Chen et al. 1978). As células cancerígenas exibem, geralmente, níveis elevados de Hidroximetilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductase, presumivelmente para satisfazer as suas necessidades aumentadas de isoprenóides e de lípidos (Liao 2002, Campbell et al. 2006).

As estatinas, inibidores competitivos da HMG-CoA reductase, impedem a conversão de HMG-CoA a mevalonato, um passo precoce e essencial na síntese de colesterol. Independentemente deste efeito na diminuição do colesterol, as estatinas têm outras propriedades, denominadas pleiotrópicas, de que a acção anti-inflamatória é um exemplo, potencialmente úteis na redução do risco de malignidade. Contudo, a sua relação com o cancro não é consensual (Brown 2007, Solomon and Freeman 2008).

Existe abundância de dados pré-clínicos que fornecem uma variedade de mecanismos plausíveis para as acções anti-neoplásicas destes agentes mas as evidências clínicas são conflituosas (Murtola et al. 2008, Gonyeau and Yuen 2010, Brown et al. 2012, Lochhead and Chan 2013). Vários estudos, quase exclusivamente retrospectivos e observacionais, mostram que as estatinas reduzem o risco de desenvolver vários cancros, principalmente o colo-rectal, da mama e da próstata (Poynter et al. 2005, Shannon et al. 2005, Clancy et al. 2013). No outro extremo, apesar de menos frequentes, há mesmo trabalhos que associam o uso destes fármacos a um risco aumentado de neoplasia (Goldstein et al. 2008, Eaton et al. 2009, Chang et al. 2011). Contudo, meta-análises dos ensaios clínicos na área da prevenção de doenças cardiovasculares sugerem uma associação neutra entre o uso de estatinas e o risco de cancro (Dale et al. 2006, Kuoppala et al. 2008, Tan et al. 2013). É provável, no entanto, que o uso mais prolongado destes fármacos, em doses mais elevadas, em associação ou em sub-

.....
 grupos de doentes geneticamente definidos, possa ter uma quimioprevenção efectiva.

As referências bibliográficas à relação estatinas-cancro da bexiga são escassas e os resultados díspares (Kaye and Jick 2004, Coogan et al. 2007, Vinogradova et al. 2011, Kuo et al. 2012) mas uma meta-análise recente sugere não haver associação entre o uso de estatinas e esta neoplasia (Zhang et al. 2013).

Um estudo experimental despertou a nossa atenção: em duas linhas celulares humanizadas de carcinoma de células de transição, a atorvastatina exibiu significativa actividade anti-proliferativa e pró-apoptótica (Kamat and Nelkin 2005). Estas acções, a que se somam outras propriedades pleiotrópicas destas substâncias, pareceram-nos potencialmente úteis para combater os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na carcinogénese vesical, já amplamente discutidos, e justificaram o seu uso. Tanto quanto nos é possível saber, fomos o primeiro e, até à data, o único grupo a publicar resultados com o uso da atorvastatina num modelo experimental de cancro da bexiga (Parada et al. 2012).

As estatinas diferem consideravelmente quanto à sua origem, hidro ou lipofilia, dosagens e metabolismo. A atorvastatina é uma estatina de origem sintética, lipofílica. A absorção após a administração oral é das mais baixas dentro deste grupo, cerca de 30% e o *Tmax* ocorre ao fim de 2-4 horas, meia hora nos ratos. A biodisponibilidade é baixa, cerca de 12% e a ligação às proteínas plasmáticas é superior a 98%. A metabolização é hepática, pelo *CYP3A4*, com produção de metabólitos activos excretados maioritariamente na biliar. Para além de substrato, é também um inibidor do *CYP3A4*. A eliminação renal é residual (2%) (Lau et al. 2006, Dong et al. 2008, Gazzero et al. 2012).

Na literatura consultada, as doses de atorvastatina usadas em modelos experimentais com rato variaram entre 0,5 e 30 mg/kg/dia (Oktem et al. 2007, Schmechel et al. 2009). À semelhança de um trabalho de prevenção de complicações neurológicas pós-AVC, decidimos estudar a eficácia da Atorvastatina a baixa dose (3 mg/kg/dia) e a alta dose (30 mg/kg/dia) (Hayashi et al. 2004).

A tentativa de quimioprevenção precoce dos carcinomas uroteliais, através da administração simultânea de Atorvastatina com a nitrosamina durante a primeira fase do estudo, revelou-se eficaz. Houve uma redução significativa da incidência de neoplasias de 68% no grupo BBN para 12,5% no grupo Atorva 3 PP e para 25% no grupo 30 PP, associando-se ainda uma significativa diminuição do tamanho dos tumores, que não ultrapassavam os 3 mm de maior eixo. A avaliação histopatológica

.....
 comprova que a diminuição dos carcinomas não é um acaso, mas resulta de uma reversão/lentificação de todo o processo oncogénico, com extensa redução das lesões hiperplásicas e de displasia de alto grau e o desaparecimento das lesões de *Cis*. Mesmo nos carcinomas diagnosticados nestes animais, a sua agressividade foi reduzida, dado que apenas um era um T1 de alto grau.

Não existe consenso sobre os mecanismos que justificam estas propriedades anti-carcinogénicas das estatinas mas grande parte dos autores considera-a independente da acção sobre os níveis de colesterol, por acção essencialmente extra-hepática (Brown 2007, Bianco et al. 2012). A inibição da HMG-CoA reductase leva não apenas a uma diminuição da síntese de colesterol mas também a uma redução de outros intermediários da via do mevalonato, incluindo os isoprenóides farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato (Gazzerro et al. 2012, Lochhead and Chan 2013). Estes isoprenóides são necessários para a actividade biológica de várias proteínas celulares, incluindo as guanosina trifosfatases *Ras* e *Rho*, fortemente implicadas na carcinogénese (Pylyayeva-Gupta et al. 2011, Rathinam et al. 2011). Estes oncogenes são promotores da "imortalidade", migração e invasão celular e a sua inibição teria óbvios efeitos anti-cancerígenos, confirmados nos nossos resultados. Pudemos observar uma redução da expressão génica de *Hras*, decorrente da inibição "a montante" das suas vias moduladoras, uma normalização da via do *P53*, confirmada na expressão génica e imunohistoquímica, uma atenuação de estímulos de progressão do ciclo celular, como o gene *CCND3* e uma normalização da proliferação, como demonstrado pela marcação mínima para o *Ki67*, com valores no grupo Atorva 3 PP idênticos aos do grupo Controlo. Merece igualmente destaque a hipoexpressão de *Cox-2*, semelhante ao que havíamos verificado com os fármacos inibidores da *Cox*, o que constitui um contributo adicional para a quimioprevenção tumoral.

A morte celular programada, perdida durante o processo carcinogénico, foi reposta com a utilização deste fármaco, conforme verificado no nosso trabalho, com um aumento da expressão do gene *Casp-3*, pró-apoptose, e diminuição do gene *Bcl-2*, inibidor da apoptose, de forma idêntica ao descrito noutros trabalhos (Agarwal et al. 1999, Wang et al. 2000), confirmando os efeitos pró-apoptóticos das estatinas, em que a atrás referida modulação da isoprenilação tem um papel central (Demierre et al. 2005, Corcos and Le Jossic-Corcos 2013).

Há quem defenda que as acções anti-cancerígenas das estatinas resultam da diminuição prolongada do colesterol circulante (Solomon and Freeman 2008). Segundo estes autores, para além de uma reduzida penetração

.....
 tumoral destes compostos, a inibição da HMG-CoA reductase dá-se primariamente no fígado e não nas células neoplásicas, o que torna improvável que a inibição da síntese de isoprenóides aí ocorra. Os efeitos anti-tumorais surgiriam indirectamente pela diminuição das LDL circulantes, o que levaria a menor sobrevivência e crescimento celular. A homeostasia dos níveis de colesterol depende de múltiplos factores mas uma família de reguladores membranares de factores de transcrição, *Sterol-regulatory element binding protein (SREBP)*, desempenha um papel chave, induzindo vários genes envolvidos na biossíntese e captação de lípidos (Goldstein et al. 2006). Quando os níveis de colesterol são considerados adequados, estes reguladores são inibidos, levando a uma inactivação de genes lipogénicos (Goldstein et al. 2002). Vários estudos ligaram o sistema *SREBP* à via AKT, já referida nesta discussão, como integrante da cascata de sinalização *PI3K/AKT/mTOR* que desempenha um papel fulcral na homeostasia celular (Altomare and Testa 2005). O raciocínio é lógico: uma descida do colesterol levaria a uma inibição de *SREBP* e consequentemente do eixo *PI3K/AKT/mTOR*, o que se traduziria numa diminuição da proliferação e sobrevivência celular, factos observados no nosso modelo tumoral.

Atendendo à influência desta via em várias linhas celulares, seria expectável que o seu bloqueio pelas estatinas, embora de forma indirecta, tivesse uma acção inibidora da angiogénese. Isso mesmo foi confirmado na nossa investigação: para além de uma redução generalizada de *VEGF*, a imunomarcacão urotelial pelo *CD31* no grupo Atorva 3 PP foi menos extensa do que a do grupo BBN. A sub-regulação de *VEGF* pelas estatinas já havia sido observada em diversos tipos celulares, incluindo células tumorais, endoteliais e de músculo liso (Dulak and Jozkowicz 2005). Nos vários trabalhos que se têm debruçado sobre os efeitos das estatinas na angiogénese, a referência ao seu comportamento bifásico é quase uma constante: acção anti-angiogénica a altas doses e acção pró-angiogénica a baixas doses, ao proteger as células endoteliais da senescência e morte celular, facto comprovado em estudos experimentais em ratos, utilizando doses de 0,5 e 2,5 mg/kg/dia de atorvastatina (Weis et al. 2002, Spyridopoulos et al. 2004, Colakoglu et al. 2010, Elewa et al. 2010).

Outras características pleiotrópicas que reforçam o potencial anti-carcinogénico destes fármacos são a sua acção anti-inflamatória e anti-oxidante (Dulak and Jozkowicz 2005, Yasui et al. 2007, Quist-Paulsen 2010, Chan et al. 2013).

A activação persistente e patológica de respostas inflamatórias tem efeitos pró-tumorais sendo a sua inibição pela atorvastatina, com uma

.....
redução de *PCR* superior a 72% em todos os grupos, um contributo adicional para a quimioprevenção tumoral demonstrada. Esta acção envolve não apenas uma diminuição da migração e adesão leucocitária mas também a modulação da expressão e função de mediadores da resposta imunitária, incluindo a redução de citocinas pró-inflamatórias, como o *TGF-β*, algo que também foi evidente nos nossos resultados (Schonbeck and Libby 2004).

A atorvastatina melhorou ainda, de forma significativa, o equilíbrio oxidativo dos animais em estudo, através de um reforço da sua capacidade anti-oxidante, *TAS*, reproduzindo aquilo que vem referido noutros trabalhos (Wassmann et al. 2002, Kotamraju et al. 2007, Chan et al. 2013).

Um dado extremamente importante no nosso estudo foi a demonstração de que a capacidade de prevenção tumoral também se consegue com uma dose baixa, sem perda de eficácia, o que contraria as afirmações de outros autores, de que o potencial anti-tumoral das estatinas implica o seu uso em altas doses, com maior risco de toxicidade associada (Dulak and Jozkowicz 2005).

Relativamente à segurança do fármaco e ao bem-estar animal pudemos constatar que todos os ratos tiveram uma boa evolução ponderal, sem sinais aparentes de doença e que as alterações analíticas registadas foram ligeiras e sem consequências clínicas.

B. Ácidos Ómega 3

Os ácidos gordos poli-insaturados ómega 3 são biologicamente importantes, nomeadamente na função e estrutura das membranas fosfolipídicas, na sinalização celular e no metabolismo lipídico. Os principais são o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosahexanoico (DHA) e provêm essencialmente de peixes gordos como o salmão, a cavala, o arenque, o linguado e a sardinha. Dada a referência crescente aos seus benefícios na prevenção e tratamento de numerosas doenças, são amplamente publicitados os suplementos de óleos de peixe ricos em ácidos gordos ómega 3.

As evidências mais fortes para as suas acções protectoras surgem na área das doenças cardiovasculares, incluindo uma redução da mortalidade associada ao enfarte agudo do miocárdio e da incidência de acidentes vasculares cerebrais (Kris-Etherton et al. 2003, Saravanan et al. 2010). Os potenciais mecanismos associados à redução do risco cardiovascular incluem uma menor susceptibilidade à arritmia ventricular, uma acção anti-trombogénica, redução dos triglicerídeos,

.....
relaxamento endotelial, estabilização da placa aterosclerótica e ligeiro efeito hipotensor (Connor 2000, Roth and Harris 2010).

Também há referências ao uso destes ácidos na maculopatia associada ao envelhecimento, em doenças neurodegenerativas e em patologias em que a inflamação é um componente chave, como a artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal ou asma (Fetterman and Zdanowicz 2009).

Tem-se acumulado considerável conhecimento sobre os possíveis efeitos benéficos da utilização de ácidos gordos ómega 3 no tratamento de vários tumores, como o do cólon, da mama, da próstata, do pulmão, no melanoma, na leucemia ou no neuroblastoma, quer como agentes únicos, quer em associação com diferentes fármacos anti-neoplásicos ou radioterapia (Hardman 2004, Calviello et al. 2009, Fasano et al. 2010, Cao et al. 2012, Heinze and Actis 2012). No entanto, os dados sobre o uso destas substâncias na prevenção neoplásica têm sido inconsistentes (Norat et al. 2005, MacLean et al. 2006), decorrendo um ensaio para esclarecer o seu verdadeiro papel na prevenção primária do cancro (e das doenças cardiovasculares) (Manson et al. 2012).

A melhoria da caquexia frequentemente associada aos tumores é outra virtude que lhes é atribuída (Yeh et al. 2013).

Os trabalhos que se debruçam sobre a relação entre estes compostos e o cancro da bexiga são escassos. Há referência à capacidade do DHA induzir morte celular imunogénica numa linha celular de cancro da bexiga (Molinari et al. 2011) e a uma sinergia *in vitro* entre uma formulação solúvel de ácidos gordos ómega 3 e a epirrubicina e a mitomicina para uso nas instilações intra-vesicais adjuvantes (Mackie et al. 2006). A deficiência crónica de ácidos gordos essenciais parece induzir hiperplasia de células de transição e maior tendência para a carcinogénese do tracto urinário (Eynard 1998), dados já anteriormente sugeridos pelos seus níveis séricos mais baixos em doentes com cancro da bexiga (McClinton et al. 1991). Um estudo populacional caso-controlado recente refere que o consumo de ácido linolénico, um ácido gordo ómega 3 encontrado em óleos vegetais, pode ter um papel protector contra o carcinoma vesical (Brinkman et al. 2011).

No nosso estudo utilizámos uma formulação líquida de suplementos de óleo de peixe, na dose de 600 mg/kg/dia, 360 mg de EPA e 240 mg de DHA. A absorção oral é variada, dependendo das formulações utilizadas. É extremamente elevada sob a forma de ácidos gordos livres, superior a 90%, devido à capacidade de os enterócitos absorverem directamente os ácidos gordos ómega 3, sendo pouco superior 20% nas formas etil e ester por requererem hidrólise prévia pela lipase pancreática. A co-absorção com outras gorduras dietéticas, a absorção sob a forma de

.....
 micelas em vez da absorção directa através da parede intestinal e a acção variável da lipase gástrica e da absorção gástrica, podem afectar adicionalmente a biodisponibilidade destas substâncias (Lawson and Hughes 1988, Ackman 1992). Após a absorção, o EPA e o DHA são incorporados em fosfolípidos plasmáticos e ésteres de colesterol (Levantesi et al. 2010). Os ácidos gordos ómega 3 são metabolizados por três vias principais: transportados para o fígado para incorporação nas lipoproteínas e depois dirigidos para as reservas lipídicas periféricas; os fosfolípidos das membranas celulares são substituídos por fosfolípidos lipoproteicos, permitindo ao EPA actuar como precursor de eicosanóides das vias ciclo e lipo-oxigenase; finalmente, como todos os outros ácidos gordos, são oxidados para preencher as necessidades energéticas das células (Hoy and Keating 2009).

No nosso estudo observámos resultados contrastantes. Se, por um lado, não se observou uma diminuição da incidência tumoral e do número médio de tumores, por outro lado, a redução do volume tumoral foi muito significativa, de um volume tumoral médio/rato com tumor de 100,46 mm³ no grupo BBN para 1,14 mm³ no grupo Ómega 3 PP. Esta disparidade manteve-se na avaliação histopatológica, com redução significativa das lesões pré-malignas mais graves, a displasia de alto grau e o *Cis* mas que não se traduziu em menos carcinomas uroteliais ou com menor agressividade: dos seis tumores, quatro eram T1 de alto grau.

Atendendo aos potenciais mecanismos anti-carcinogénicos atribuídos a estes compostos, que incluem a modulação da produção de eicosanóides, da inflamação, da angiogénese e da susceptibilidade à apoptose, em tudo semelhantes às acções pleiotrópicas das estatinas, havia a expectativa de os resultados serem idênticos aos destas, expectativa reforçada pelo observado noutros modelos (Hardman 2004). A comprovação experimental da capacidade preventiva dos ácidos ómega 3 provém essencialmente de modelos de carcinogénese colo-rectal. Estudos em roedores a quem foram administrados suplementos destes compostos referiram, de forma consistente, reduções de 20 a 50% na incidência neoplásica e de 30 a 70% na multiplicidade tumoral (Hendrickse et al. 1995, Fini et al. 2010, Cockbain et al. 2012).

Isto reforça a nossa opinião de que os resultados insuficientes obtidos no nosso modelo se podem dever à utilização de doses inadequadas uma vez que a dose óptima aconselhada não está estabelecida e que a relação dose-resposta tumoral necessita de investigação adicional. De igual modo, a duração óptima de suplementação com estes compostos ainda não foi definida, existindo

.....
 considerável variação nos diversos estudos, indo de quatro semanas a quatro meses (Cockbain et al. 2012). É possível que, após esclarecimento destas dúvidas, a quimioprevenção experimental do carcinoma vesical com ácidos ómega 3 seja mais eficaz, à semelhança das estatinas.

Apesar das considerações prévias, algumas das virtudes anti-neoplásicas destas substâncias também se verificaram no nosso trabalho. A expressão génica aberrante de *p53* deixou de se observar, traduzindo um certo reequilíbrio da proliferação e do controlo do ciclo celular e a reposição de uma apoptose funcional, limitadora de uma expansão tumoral descontrolada, nomeadamente por sub-expressão do gene anti-apoptose *Bcl-2*, também foi por nós comprovada (Wendel and Heller 2009). A redução de *VEGF* confirma a inibição da angiogénese atribuída a estes ácidos gordos e que decorre de vários mecanismos, incluindo alterações na produção de prostaglandinas e inibição da proteína cinase C. Estes dados configuram um claro exemplo de *nutrigenómica*, isto é, a forma como determinados nutrientes condicionam a expressão de genes, influenciando directamente um largo espectro de doenças (Massaro et al. 2010).

Uma das mais importantes acções destes nutrientes resulta da modulação da actividade das *Cox*. Quando presente, o EPA actua como um substrato alternativo e preferencial para a *Cox-2*, em detrimento do ácido araquidónico, e o DHA inibe a actividade da *Cox-2*, o que contribui para uma menor síntese de prostaglandinas E_2 e de outras citocinas pró-tumorais, para além de uma inibição da resposta inflamatória (Hawcroft et al. 2010, Vecchio et al. 2010). A significativa diminuição de *TGF- β* e de *PCR* no grupo Omega 3 PP decorrem destes processos. A acção anti-inflamatória resulta também de mediadores lipídicos derivados de EPA e de DHA, incluindo *resolvinas* e *protectinas*.

O *stress* oxidativo contribui para o processo carcinogénico na medida em que radicais livres de oxigénio lesam o DNA, proteínas e lípidos. No nosso estudo, os ácidos gordos poli-insaturados ómega 3 contrariaram esse processo pró-carcinogénico através de uma melhoria do equilíbrio oxidativo, reproduzindo o descrito noutros trabalhos (An et al. 2009, Jones et al. 2013, Kusunoki et al. 2013). Embora não se tenha observado um aumento da capacidade anti-oxidante total (TAS), contribuíram para uma redução mais significativa da peroxidação lipídica (MDA), de tal modo que a relação foi benéfica.

Os ácidos gordos ómega 3 têm um excelente perfil de segurança. Os animais não apresentaram sinais de doença ou efeitos secundários. Os valores analíticos não registaram alterações relevantes e, como seria

II. Estudo Experimental:Discussão

.....
expectável, houve uma descida significativa do valor dos triglicerídeos e, em menor grau, do colesterol total, o que confere uma vantagem adicional.

.....

Conclusões do Estudo Experimental

I: Modelo Experimental

1. No nosso modelo de carcinogénese vesical no rato, induzido pela ingestão de N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN) a 0,05% na água da bebida durante oito semanas, a incidência de carcinoma urotelial da bexiga no final do estudo foi de 68%.
2. A carcinogénese urotelial do rato tem alterações histológicas similares às do humano, incluindo lesões hiperplásicas, displásicas, *Cis* e carcinomas uroteliais.
3. O nosso modelo tem lesões representativas da dupla via da carcinogénese vesical: a via papilar e não invasiva, frequentemente multifocal, predominante, mas também a via não papilar, mais agressiva.
4. Os dados referidos nos pontos anteriores tornam este modelo apropriado para o estudo da prevenção farmacológica do carcinoma urotelial da bexiga.
5. O processo de carcinogénese vesical no nosso modelo inclui:
 - 5.1. Desregulação do ciclo celular: mutações *p53*; expressão aumentada de *Cox-2*.
 - 5.2. Aumento da proliferação celular: imunomarcção mais abundante e intensa para *Ki67*; sobreexpressão do proto-oncogene *Hras*; elevação de *TGF- β* .
 - 5.3. Inibição da apoptose: sobreexpressão do gene anti-apoptose *Bcl-2*; elevação de *TNF- α* .
 - 5.4. Aumento da angiogénese: positividade de *CD31* para a maioria do urotélio e com marcação mais intensa nas áreas tumorais; sobreexpressão do gene *VEGF*.
 - 5.5. Desregulação da imunovigilância tumoral: expressão aumentada de *Cox-2*; elevação de *TGF- β* ; elevação de *TNF- α* .
 - 5.6. Acção pró-inflamatória: aumento dos marcadores inflamatórios *PCR* e *IL-6*.
6. Segurança e bem-estar animal: Os animais do grupo BBN não tiveram alterações analíticas, menor ganho ponderal ou repercussões negativas no seu bem-estar e comportamento, quando comparados com os animais do grupo controlo.

.....

II: Fármacos Imunomoduladores

Sirolimus

1. A administração precoce de Sirolimus, nas doses de 1 e 2 mg/kg/dia, não se associou a uma redução da incidência de neoplasias vesicais, havendo, pelo contrário, um aumento. Os tumores múltiplos também foram mais frequentes sendo a redução do volume tumoral o único dado positivo observado.
2. A administração de Sirolimus 2 mg/kg/dia na segunda fase do estudo, prevenção tardia, associou-se a uma diminuição de todos os parâmetros tumorais, incluindo a incidência de carcinomas (37,5%), o número médio de tumores, o volume tumoral e a agressividade histológica.
3. O Sirolimus tem duas acções aparentemente opostas no processo neoplásico: uma acção imunossupressora facilitadora da carcinogénese e uma acção anti-proliferativa, inibidora desse processo.
 - 3.1. A sua administração na fase inicial do processo carcinogénico vai bloquear a *imunovigilância do cancro*, nomeadamente a proliferação e diferenciação de linfócitos T e a reparação do DNA. A não erradicação de células displásicas e neoplásicas numa fase precoce permite o desenvolvimento de múltiplos nichos tumorais.
 - 3.2. Com a sua utilização apenas a partir da nona semana, a resposta imunológica inicial do hospedeiro não é inibida, não havendo a potenciação tumoral verificada na administração precoce, sobressaindo o efeito positivo da inibição da proliferação das células carcinogénicas.
4. Mecanismos de acção anti-neoplásica observados no Grupo Sir 2 PT:
 - 4.1. Reposição do controlo do ciclo celular: diminuição das mutações *p53*; sem expressão aberrante de *Cox-2*; diminuição do gene promotor da progressão G1-S do ciclo celular *CCND3*.
 - 4.2. Redução da proliferação celular: redução da imunomarcagem e da expressão génica de *Ki67*; diminuição do proto-oncogene *Hras* e expressão aumentada do gene supressor tumoral *Arf-1*; diminuição de *TGF-β*.
 - 4.3. Recuperação da apoptose celular, com aumento dos genes pró-apoptóticos *Bax* e *Caspase 3* e diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2*.

-
- 4.4. Acção anti-angiogénica: marcação para *CD31* muito menor do que no grupo BBN; diminuição de *VEGF*.
 - 4.5. Acção anti-oxidante: diminuição do stress oxidativo, pela redução de MDA/TAS.
 - 4.6. Acção anti-inflamatória parece ser pouco relevante.
 5. Segurança e bem-estar animal: Alguns animais a quem foi administrado este fármaco apresentaram elevação do colesterol total e dos triglicéridos, assim como das transaminases hepáticas. A sua toma associa-se também a uma menor evolução ponderal. Dois ratos do grupo Sir 2 PP morreram na fase 2 do estudo, por causas não esclarecidas.

Ciclosporina A

1. A quimioprevenção com CsA 5 mg/kg/dia, precoce e tardia, não se revelou eficaz, não tendo havido uma redução estatisticamente significativa de nenhum dos três parâmetros macroscópicos avaliados: percentagem de ratos com tumor, número de tumores ou volume tumoral. Também não se verificou uma diminuição do *Cis* ou da agressividade dos carcinomas.
2. Apesar disso, houve uma tendência mais favorável no grupo de administração mais tardia do fármaco, o grupo CsA PT: os três componentes atrás referidos tiveram valores mais baixos do que no grupo BBN e no grupo CsA PP. A nossa justificação para este facto é idêntica à do Sirolimus. O bloqueio precoce da imunovigilância impede a eliminação de células tumorais, enquanto na sua administração mais tardia esta imunodeficiência é menos relevante na carcinogénese.
3. Mecanismos de acção que justificam a reduzida capacidade anti-tumoral deste fármaco:
 - 3.1. Ciclo celular: Reposição da integridade das via supressora tumoral de *p53*, em extensão muito menor do que a conseguida com administração de Sirolimus.
 - 3.2. Proliferação celular não foi reduzida: sem redução da imunomarcação e da expressão génica de *Ki67*, comparativamente ao grupo BBN, estando até aumentada no grupo CsA PP; comportamento semelhante na expressão de *Hras*; sem diminuição de *TGF-β*.
 - 3.3. Acção pró-inflamatória: elevação da *IL-1β*.
 - 3.4. Acção pró-oxidante, por aumento da peroxidação lipídica (MDA).

-
4. Observados alguns efeitos anti-neoplásicos, no entanto, insuficientes para a obtenção de uma prevenção tumoral eficaz:
 - 4.1. Apoptose celular: diminuição do gene inibidor da apoptose celular *Bcl-2*, mas insuficiente para repor o equilíbrio proliferativo e inibir o desenvolvimento de tumores.
 - 4.2. Acção anti-angiogénica: marcação para *CD31* atinge praticamente os valores do grupo Controlo; diminuição de *VEGF*.
 5. Segurança e bem-estar animal: A administração deste fármaco não teve repercussões visíveis no bem-estar e comportamento animal. Analiticamente observou-se uma elevação dos valores de ácido úrico e um aumento isolado de TGO no grupo CsA PT.

III: Fármacos Inibidores das Ciclooxygenases

1. A administração precoce do inibidor selectivo da *Cox-2* Celecoxib, em ambas as doses de 1 e 10 mg/kg/dia, associou-se a uma redução muito significativa de todos os parâmetros tumorais: incidência (12,5%), número e volume dos tumores. A histologia confirmou estes resultados positivos, com uma redução significativa de todas as lesões pré-neoplásicas e mesmo eliminação total das mais agressivas, a displasia de alto grau e o *Cis*. Os carcinomas uroteliais também eram histologicamente menos invasivos e indiferenciados, predominantemente *Ta de baixo grau*.
2. A prevenção tardia com Celecoxib, 10 mg/kg/dia não foi eficaz. Não houve redução na incidência de lesões hiperplásicas, pré-neoplásicas ou neoplásicas e também não ocorreu a diminuição da agressividade ou volume dos tumores.
 - 2.1. Os mecanismos anti-carcinogénicos só se revelaram eficazes numa fase inicial de indução tumoral, com uma acção protectora/lentificadora dos processos conducentes a mutações genéticas, incapazes da sua reversão numa fase mais tardia, com o desequilíbrio proliferativo já estabelecido.
3. A quimioprevenção precoce com o inibidor da *Cox-1* e *Cox-2* AAS foi obtida com ambas as doses utilizadas, 25 e 250 mg/kg/dia. Contudo, apenas na dose mais elevada se verificou uma redução estatisticamente significativa dos três parâmetros macroscópicos estudados, incidência (12,5 vs 37,5%), número e volume tumoral. À semelhança do Celecoxib, observou-se uma redução das lesões pré-neoplásicas e da agressividade dos carcinomas, numa relação crescente dose-efeito.

-
4. Mecanismos de prevenção neoplásica do Celecoxib e do AAS:
 - 4.1. Inibição da via da *Cox-2*: menor imunomarcção para *Cox-2* e diminuição da *expression ratio* de *Cox-2* superior a 50% em todos os grupos estudados.
 - 4.2. Ciclo celular: recuperação parcial da integridade do ciclo celular, com reposição da função supressora de *p53* e do gene supressor *ARF-1*.
 - 4.3. Redução da proliferação celular: imunomarcção mais ligeira e limitada de *Ki67*; diminuição do proto-oncogene *Hras* e do gene *EGFr*; redução dos valores séricos de *TGF-β*.
 - 4.4. Apoptose celular: recuperação da apoptose celular por diminuição do gene anti-apoptose *Bcl-2*.
 - 4.5. Acção anti-angiogénica: menor marcação para *CD31*; diminuição de *VEGF*.
 - 4.6. Acção anti-inflamatória: redução de *PCR*.
 - 4.7. Equilíbrio oxidativo: acção marginal na quimioprevenção tumoral dado que apenas no grupo Celecox 10 PP se obteve um perfil oxidativo favorável.
 5. Segurança e bem-estar animal: Um animal do grupo Celecox 1 PP e um outro do grupo AAS 250 PP desenvolveram anemia e leucopenia. No grupo Celecox 10 PP os valores de glicémia foram significativamente superiores aos do grupo Controlo e no grupo Celecox 10 PT houve elevação das transaminases, em especial a TGO. Nos grupos AAS e AAS 250 PP os valores dos triglicérideos foram significativamente mais baixos do que no grupo controlo. Durante a toma destes fármacos os animais tiveram um menor ganho ponderal.

IV: Fármacos com "Acções Pleiotrópicas"

Atorvastatina

1. A prevenção precoce dos tumores da bexiga com a Atorvastatina foi eficaz nas duas doses estudadas, com uma redução muito significativa de todos os parâmetros tumorais: incidência, número e volume dos tumores. A dose mais baixa, 3 mg/kg/dia, obteve até uma redução mais acentuada da incidência tumoral do que a dose de 30 mg/kg/dia: 12,5% vs 25%. Houve ainda uma extensa redução das lesões hiperplásicas, da displasia de alto grau, o desaparecimento do *Cis* e a atenuação da malignidade dos carcinomas uroteliais.
2. Mecanismos de prevenção neoplásica da Atorvastatina:

-
- 2.1. Inibição da via da Cox-2: hipoeexpressão de Cox-2.
 - 2.2. Ciclo celular: normalização da via do *P53*, confirmada na expressão génica e imunohistoquímica; atenuação de estímulos de progressão do ciclo celular, como o gene *CCND3*.
 - 2.3. Proliferação celular: normalização da proliferação, com marcação mínima para o *Ki67*; redução da expressão génica de *Hras* e dos valores séricos de *TGF-β*.
 - 2.4. Apoptose celular: aumento da expressão do gene *Caspase 3*, pró-apoptose, e diminuição do gene *Bcl-2*, inibidor da apoptose.
 - 2.5. Acção anti-angiogénica: menor marcação para *CD31*; diminuição de *VEGF*.
 - 2.6. Acção anti-inflamatória: redução de *PCR*.
 - 2.7. Equilíbrio oxidativo: melhoria do equilíbrio oxidativo, através de um reforço da sua capacidade anti-oxidante, *TAS*.
 - 2.8. Diminuição do colesterol circulante.
3. Segurança e bem-estar animal: A administração deste fármaco não teve repercussões negativas visíveis no bem-estar e comportamento animal. Nos grupos Atorva e Atorva 30 PP foram detectados valores de glicémia superiores aos dos controlos. Os animais do grupo Atorva 3 PP tiveram elevação das transaminases hepáticas. De destacar uma descida do valor de colesterol total com a utilização da dose mais elevada.

Ácidos Ómega 3

1. A utilização de 600 mg/kg/dia de ácidos gordos ómega 3 não se associou a uma diminuição da incidência tumoral (62,5%) ou do número médio de tumores, embora a redução do volume tumoral tenha sido muito significativa. Esta disparidade manteve-se na avaliação histopatológica, com redução significativa das lesões pré-malignas mais graves, mas que não se traduziu em menos carcinomas uroteliais ou com menor agressividade.
2. Os resultados obtidos podem dever-se à utilização de doses inadequadas ou insuficiente duração do tratamento.
3. É possível que, após esclarecimento destas dúvidas, a quimioprevenção experimental do carcinoma vesical com ácidos ómega 3 seja mais eficaz, dado que se observaram algumas acções anti-neoplásicas:
 - 3.1. Ciclo celular: A expressão génica aberrante de *P53* deixou de se observar.

II. Estudo Experimental: Conclusões

- 3.2. Proliferação celular: redução dos valores séricos de *TGF- β* .
 - 3.3. Apoptose celular: sub-expressão do gene anti-apoptose *Bcl-2*.
 - 3.4. Acção anti-angiogénica: diminuição de *VEGF*.
 - 3.5. Acção anti-inflamatória: redução de *PCR*.
 - 3.6. Equilíbrio oxidativo: melhoria do equilíbrio oxidativo, através de uma redução da peroxidação lipídica (MDA).
4. Segurança e bem-estar animal: Alguns animais tiveram alterações ligeiras do hemograma, havendo um caso de anemia e dois de leucopenia. De referir uma descida significativa dos triglicerídeos e, em menor grau, do colesterol total. Durante a toma destes fármacos os animais tiveram um menor ganho ponderal.

II. Estudo Experimental: Conclusões

.....
 No quadro 73 temos um resumo dos pontos anteriores:

Fármaco	Sirolimus	CsA	Celecox	AAS	Atorva	Ómega 3
Acção						
<i>Eficácia</i>						
Prevenção precoce	0	0	✓✓✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓✓	✓
Prevenção tardia	✓✓	0	0	-	-	-
Relação dose-efeito	✓	-	0	✓	0	?
<i>Mecanismos Acção</i>						
Ciclo celular	✓	0	✓	✓	✓	0/✓
↓Proliferação	✓	0	✓	✓	✓	0/✓
↑Apoptose	✓	✓	✓	✓	✓	0/✓
↓Angiogénese	✓	✓	✓	✓	✓	0/✓
Anti-inflamatório	0	0	✓	✓	✓	✓
↓ Stress oxidativo	✓	0	0/✓	0	✓	✓
↓ Cox-2	0	0	✓	✓	✓	-
Imunomodulação	✓	✓	0/✓	0	0	0
Outros	0	0	0	0	✓	-
<i>Segurança</i>	0	0/✓	0/✓	0/✓	✓	0/✓

Quadro 73: Resumo dos dados obtidos na Prevenção Farmacológica Experimental.

.....

Conclusão Geral

O carcinoma urotelial da bexiga é um dos tumores com mais alta incidência e prevalência no sexo masculino, principalmente nos países desenvolvidos, incluindo Portugal.

Apesar dos vários avanços obtidos no seu diagnóstico e tratamento, persistem vários problemas que carecem de respostas mais eficazes que as actualmente disponíveis:

- Uma incidência crescente.
- Uma elevada morbi e mortalidade das formas músculo-invasivas.
- As altas taxas de recidiva e de progressão das suas formas não músculo-invasivas, que constituem 75 a 80% do total das neoplasias vesicais.

Várias características tornam esta neoplasia um alvo privilegiado para a adopção de estratégias de prevenção farmacológica. Contudo, os estudos existentes, embora promissores, ainda são insuficientes para permitirem a implementação da quimioprevenção na prática clínica.

O modelo experimental utilizado no nosso estudo reproduziu de forma adequada a carcinogénese vesical humana, do ponto de vista histológico e de comportamento biológico, o que o torna apropriado para estudos de prevenção farmacológica.

Confirmou-se no nosso estudo experimental que são vários os mecanismos patológicos associados à carcinogénese vesical:

- Um desequilíbrio da cinética celular, promotor do crescimento, por desregulação do ciclo celular, aumento da proliferação e diminuição da apoptose.
- Um aumento da angiogénese, elemento crítico ao preenchimento das necessidades metabólicas dos tumores e à sua disseminação.
- Uma desregulação da imunovigilância tumoral, impedindo o reconhecimento e eliminação precoce de células tumorais.
- Uma activação de vias inflamatórias, levando a sobreexpressão de ciclooxigenases, citocinas, factores de crescimento e outros estímulos proliferativos.

Este estudo experimental demonstrou ser possível a prevenção dos tumores da bexiga com a administração de fármacos por via oral. Dos resultados, outras conclusões podem ser extraídas:

- A prevenção tumoral consegue-se em vários parâmetros: incidência, número de tumores e volume tumoral.
- Os fármacos comprovadamente eficazes são aqueles que actuam não apenas numa via isolada da carcinogénese mas sim em múltiplas vias

.....
do processo de malignização. Dessas acções parecem as mais relevantes: uma reposição do equilíbrio da cinética celular, por diminuição da proliferação e aumento da apoptose; uma acção anti-inflamatória, com inibição das vias da ciclooxigenase. A acção anti-angiogénica, a reposição do equilíbrio oxidativo e a modulação imunológica, embora fossem observadas com alguns agentes e possam potenciar os mecanismos anteriores, parecem menos primordiais.

- Em todos os casos, à excepção do Sirolimus, a quimioprevenção precoce demonstrou ser mais eficaz que a tardia, ao permitir uma acção numa fase inicial do processo carcinogénico, provavelmente por haver menores disrupções de vias celulares e cargas tumorais mais reduzidas.
- Dos fármacos estudados, os mais eficazes foram os inibidores da Cox-2 e a atorvastatina. Tendo em conta a relação eficácia-segurança e dose-efeito, a Atorvastatina constituirá a melhor opção, seguida do Celecoxib.

Os estudos experimentais, incluindo o presente, demonstram a eficácia da prevenção farmacológica na abordagem terapêutica do carcinoma urotelial da bexiga, justificando a realização de ensaios clínicos. Esses ensaios clínicos deveriam cumprir algumas condições:

- Os agentes farmacológicos deveriam ter mecanismos de acção que actuassem nas principais vias patogénicas da carcinogénese vesical, ser de administração cómoda, preferencialmente por via oral, seguros, com efeitos secundários pouco frequentes, ligeiros e bem tolerados. Adicionalmente deveriam ser de custo reduzido. Mais uma vez as estatinas e os inibidores da ciclooxigenase surgem como os mais promissores.
- Os doentes prioritários para a adopção de estratégias de quimioprevenção seriam os doentes com história de tumores não músculo-invasivos da bexiga, com baixo/moderado risco de recidiva e progressão. Nos doentes de alto risco ou com doença invasiva a abordagem terapêutica deveria ser mais agressiva, não estando indicada esta estratégia.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Wahab, M., I. M. Reis, J. Wu and R. Duncan (2009). "Second primary cancer risk of radiation therapy after radical prostatectomy for prostate cancer: an analysis of SEER data." *Urology* **74**(4): 866-871.
- Abernathy, C. O., D. J. Thomas and R. L. Calderon (2003). "Health effects and risk assessment of arsenic." *J Nutr* **133**(5 Suppl 1): 1536S-1538S.
- Abou-Issa, H. M., G. A. Alshafie, K. Seibert, A. T. Koki, J. L. Masferrer and R. E. Harris (2001). "Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis." *Anticancer Res* **21**(5): 3425-3432.
- Ackman, R. G. (1992). "The absorption of fish oils and concentrates." *Lipids* **27**(11): 858-862.
- Adhim, Z., T. Matsuoka, T. Bito, K. Shigemura, K. M. Lee, M. Kawabata, M. Fujisawa, K. Nibu and T. Shirakawa (2011). "In vitro and in vivo inhibitory effect of three Cox-2 inhibitors and epithelial-to-mesenchymal transition in human bladder cancer cell lines." *Br J Cancer* **105**(3): 393-402.
- Advanced Bladder Cancer Meta-analysis, C. (2005). "Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration." *Eur Urol* **48**(2): 202-205; discussion 205-206.
- Agarwal, B., S. Bhendwal, B. Halmos, S. F. Moss, W. G. Ramey and P. R. Holt (1999). "Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells." *Clin Cancer Res* **5**(8): 2223-2229.
- Agarwal, V., V. C. Hodgkinson, G. L. Eagle, L. Scaife, M. J. Lind and L. Cawkwell (2013). "Proteomic (antibody microarray) exploration of the molecular mechanism of action of the specific COX-2 inhibitor DuP 697." *Int J Oncol* **42**(3): 1088-1092.
- Airoidi, L., M. Bonfanti, C. Magagnotti and R. Fanelli (1987). "Development of an experimental model for studying bladder carcinogen metabolism using the isolated rat urinary bladder." *Cancer Res* **47**(14): 3697-3700.
- Airoidi, L., C. Magagnotti, M. Bonfanti and R. Fanelli (1990). "Alpha-oxidative metabolism of the bladder carcinogens N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine and N-nitrosobutyl(3-carboxypropyl)amine within the rat isolated bladder." *Carcinogenesis* **11**(8): 1437-1440.
- Ajili, F., M. Kacem, H. Tounsi, A. Darouiche, E. Enayfer, M. Chebi, M. Manai and S. Boubaker (2012). "Prognostic impact of angiogenesis in nonmuscle invasive bladder cancer as defined by microvessel density after immunohistochemical staining for CD34." *Ultrastruct Pathol* **36**(5): 336-342.
- Alberg, A. J., A. Kouzis, J. M. Genkinger, L. Gallicchio, A. E. Burke, S. C. Hoffman, M. Diener-West, K. J. Helzlsouer and G. W. Comstock (2007). "A prospective cohort study of bladder cancer risk in relation to active cigarette smoking and household exposure to secondhand cigarette smoke." *Am J Epidemiol* **165**(6): 660-666.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." *Oncogene* **24**(50): 7455-7464.
- Amaral, A. F., K. P. Cantor, D. T. Silverman and N. Malats (2010). "Selenium and bladder cancer risk: a meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(9): 2407-2415.

-
- An, W. S., H. J. Kim, K. H. Cho and N. D. Vaziri (2009). "Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney." Am J Physiol Renal Physiol **297**(4): F895-903.
 - Anetor, J. I., H. Wanibuchi and S. Fukushima (2007). "Arsenic exposure and its health effects and risk of cancer in developing countries: micronutrients as host defence." Asian Pac J Cancer Prev **8**(1): 13-23.
 - Antonakopoulos, G. N., J. Turton, P. Whitfield and J. Newman (1991). "Host-parasite interface of the urinary bladder-inhabiting nematode *Trichosomoides crassicauda*: changes induced in the urothelium of infected rats." Int J Parasitol **21**(2): 187-193.
 - Arrieta, O., P. Guevara, S. Reyes, G. Palencia, E. Rivera and J. Sotelo (2001). "Paradoxical effect of aspirin on the growth of C6 rat glioma and on time of development of ENU-induced tumors of the nervous system." J Cancer Res Clin Oncol **127**(11): 681-686.
 - Arum, C. J., E. Anderssen, T. Viset, Y. Kodama, S. Lundgren, D. Chen and C. M. Zhao (2010). "Cancer immunoediting from immunosurveillance to tumor escape in microvillus-formed niche: a study of syngeneic orthotopic rat bladder cancer model in comparison with human bladder cancer." Neoplasia **12**(6): 434-442.
 - Axelsson, H., C. Lonroth, M. Andersson and K. Lundholm (2010). "Mechanisms behind COX-1 and COX-2 inhibition of tumor growth in vivo." Int J Oncol **37**(5): 1143-1152.
 - Aynaud, O., D. Piron, R. Barrasso and J. D. Poveda (1998). "Comparison of clinical, histological, and virological symptoms of HPV in HIV-1 infected men and immunocompetent subjects." Sex Transm Infect **74**(1): 32-34.
 - Baastrup, R., M. Sorensen, T. Balstrom, K. Frederiksen, C. L. Larsen, A. Tjonneland, K. Overvad and O. Raaschou-Nielsen (2008). "Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark." Environ Health Perspect **116**(2): 231-237.
 - Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, M. Roupret and U. Asociacion Europea de (2012). "[EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update]." Actas Urol Esp **36**(7): 389-402.
 - Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, M. Roupret and U. European Association of (2011). "EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update." Eur Urol **59**(6): 997-1008.
 - Bai, S., S. M. Stepkowski, B. D. Kahan and L. J. Brunner (2004). "Metabolic interaction between cyclosporine and sirolimus." Transplantation **77**(10): 1507-1512.
 - Bakkar, A. A., H. Wallerand, F. Radvanyi, J. B. Lahaye, S. Pissard, L. Lecerf, J. C. Kouyoumdjian, C. C. Abbou, J. C. Pairon, M. C. Jaurand, J. P. Thiery, D. K. Chopin and S. G. de Medina (2003). "FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder." Cancer Res **63**(23): 8108-8112.
 - Baris, D., M. R. Karagas, S. Koutros, J. S. Colt, A. Johnson, M. Schwenn, A. H. Fischer, J. D. Figueroa, S. I. Berndt, S. Han, L. E. Beane Freeman, J. H. Lubin, S. Cherala, K. P. Cantor, K. Jacobs, S. Chanock, N. Chatterjee, N. Rothman and D. T. Silverman (2013). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and

- other analgesic use and bladder cancer in northern New England." Int J Cancer **132**(1): 162-173.
- Baris, D., M. R. Karagas, C. Verrill, A. Johnson, A. S. Andrew, C. J. Marsit, M. Schwenn, J. S. Colt, S. Cherala, C. Samanic, R. Waddell, K. P. Cantor, A. Schned, N. Rothman, J. Lubin, J. F. Fraumeni, Jr., R. N. Hoover, K. T. Kelsey and D. T. Silverman (2009). "A case-control study of smoking and bladder cancer risk: emergent patterns over time." J Natl Cancer Inst **101**(22): 1553-1561.
 - Bartsch, G., A. P. Mitra and R. J. Cote (2010). "Expression profiling for bladder cancer: strategies to uncover prognostic factors." Expert Rev Anticancer Ther **10**(12): 1945-1954.
 - Bedwani, R., E. Renganathan, F. El Khwsky, C. Braga, H. H. Abu Seif, T. Abul Azm, A. Zaki, S. Franceschi, P. Boffetta and C. La Vecchia (1998). "Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt." Br J Cancer **77**(7): 1186-1189.
 - Bermejo, J. L., J. Sundquist and K. Hemminki (2009). "Sex-specific familial risks of urinary bladder cancer and associated neoplasms in Sweden." Int J Cancer **124**(9): 2166-2171.
 - Bianco, A. M., V. Zanin, A. Marcuzzi and S. Crovella (2012). "Clarification of the pleiotropic effects of statins on mevalonate pathway and the feedback regulation of isoprenoids requires more comprehensive investigation." Cell Biochem Funct **30**(2): 176.
 - Birder, L. A. (2005). "More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain." Am J Physiol Renal Physiol **289**(3): F489-495.
 - Birder, L. A., M. Ruggieri, M. Takeda, G. van Koeveringe, S. Veltkamp, C. Korstanje, B. Parsons and C. H. Fry (2012). "How does the urothelium affect bladder function in health and disease? ICI-RS 2011." Neurourol Urodyn **31**(3): 293-299.
 - Bjerregaard, B. K., O. Raaschou-Nielsen, M. Sorensen, K. Frederiksen, J. Christensen, A. Tjonneland, K. Overvad, F. C. Chapelon, G. Nagel, J. Chang-Claude, M. M. Bergmann, H. Boeing, D. Trichopoulos, A. Trichopoulou, E. Oikonomou, F. Berrino, D. Palli, R. Tumino, P. Vineis, S. Panico, P. H. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, L. Kiemeny, I. T. Gram, T. Braaten, E. Lund, C. A. Gonzalez, G. Berglund, N. Allen, A. Roddam, S. Bingham and E. Riboli (2006). "Tobacco smoke and bladder cancer--in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." Int J Cancer **119**(10): 2412-2416.
 - Black, P. C. and C. P. Dinney (2007). "Bladder cancer angiogenesis and metastasis--translation from murine model to clinical trial." Cancer Metastasis Rev **26**(3-4): 623-634.
 - Blaveri, E., J. P. Simko, J. E. Korkola, J. L. Brewer, F. Baehner, K. Mehta, S. Devries, T. Koppie, S. Pejavar, P. Carroll and F. M. Waldman (2005). "Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression." Clin Cancer Res **11**(11): 4044-4055.
 - Blumentals, W. A., P. R. Foulis, S. W. Schwartz and T. J. Mason (2004). "Analgesic therapy and the prevention of bladder cancer." Urol Oncol **22**(1): 11-15.
 - Boffetta, P. (2008). "Tobacco smoking and risk of bladder cancer." Scand J Urol Nephrol Suppl(218): 45-54.
 - Boffetta, P. and D. T. Silverman (2001). "A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure." Epidemiology **12**(1): 125-130.
 - Bonfanti, M., C. Magagnotti, M. Bonati, R. Fanelli and L. Airoldi (1988). "Pharmacokinetic profile and metabolism of N-

- nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amine in rats." Cancer Res **48**(13): 3666-3669.
- Boorman, G. A. (1977). "Animal model of human disease: carcinoma of the ureter and urinary bladder." Am J Pathol **88**(1): 251-254.
 - Bosetti, C., P. Bertuccio, L. Chatenoud, E. Negri, C. La Vecchia and F. Levi (2011). "Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008." Eur Urol **60**(1): 1-15.
 - Bostwick, D. G., D. Ramnani and L. Cheng (1999). "Diagnosis and grading of bladder cancer and associated lesions." Urol Clin North Am **26**(3): 493-507.
 - Botelho, M. C., J. C. Machado and J. M. da Costa (2010). "Schistosoma haematobium and bladder cancer: what lies beneath?" Virulence **1**(2): 84-87.
 - Botteman, M. F., C. L. Pashos, A. Redaelli, B. Laskin and R. Hauser (2003). "The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature." Pharmacoeconomics **21**(18): 1315-1330.
 - Braakhuis, B. J., M. P. Tabor, J. A. Kummer, C. R. Leemans and R. H. Brakenhoff (2003). "A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications." Cancer Res **63**(8): 1727-1730.
 - Brausi, M., J. A. Witjes, D. Lamm, R. Persad, J. Palou, M. Colombel, R. Buckley, M. Soloway, H. Akaza and A. Bohle (2011). "A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group." J Urol **186**(6): 2158-2167.
 - Brausi, M. A. (2012). "Primary Prevention and Early Detection of Bladder Cancer: Two Main Goals for Urologists." Eur Urol.
 - Bray, F., J. S. Ren, E. Masuyer and J. Ferlay (2012). "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008." Int J Cancer.
 - Brennan, P., O. Bogillot, S. Cordier, E. Greiser, W. Schill, P. Vineis, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, J. Chang-Claude, U. Bolm-Audorff, K. H. Jockel, F. Donato, C. Serra, J. Wahrendorf, M. Hours, A. T'Mannetje, M. Kogevinas and P. Boffetta (2000). "Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies." Int J Cancer **86**(2): 289-294.
 - Brennan, P., O. Bogillot, E. Greiser, J. Chang-Claude, J. Wahrendorf, S. Cordier, K. H. Jockel, G. Lopez-Abente, A. Tzonou, P. Vineis, F. Donato, M. Hours, C. Serra, U. Bolm-Audorff, W. Schill, M. Kogevinas and P. Boffetta (2001). "The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data)." Cancer Causes Control **12**(5): 411-417.
 - Brinkman, M. T., M. R. Karagas, M. S. Zens, A. R. Schned, R. C. Reulen and M. P. Zeegers (2011). "Intake of alpha-linolenic acid and other fatty acids in relation to the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire case-control study." Br J Nutr **106**(7): 1070-1077.
 - Brooks, J. (2007). Anatomy of the Lower Urinary Tract and Male Genitalia. Campbell-Walsh Urology. A. Wein, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, Saunders Elsevier. **1**: 57-60.
 - Brown, A. J. (2007). "Cholesterol, statins and cancer." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(3): 135-141.
 - Brown, M., C. Hart, T. Tawadros, V. Ramani, V. Sangar, M. Lau and N. Clarke (2012). "The differential effects of statins on the metastatic behaviour of prostate cancer." Br J Cancer **106**(10): 1689-1696.

-
- Brown, M. L., G. F. Riley, N. Schussler and R. Etzioni (2002). "Estimating health care costs related to cancer treatment from SEER-Medicare data." Med Care **40**(8 Suppl): IV-104-117.
 - Bruemmer, B., E. White, T. L. Vaughan and C. L. Cheney (1996). "Nutrient intake in relation to bladder cancer among middle-aged men and women." Am J Epidemiol **144**(5): 485-495.
 - Bruzzese, V. and J. Pepe (2009). "Efficacy of cyclosporine in the treatment of a case of infliximab-induced erythrodermic psoriasis." Int J Immunopathol Pharmacol **22**(1): 235-238.
 - Burch, J. D., T. E. Rohan, G. R. Howe, H. A. Risch, G. B. Hill, R. Steele and A. B. Miller (1989). "Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study." Int J Cancer **44**(4): 622-628.
 - Burger, M., J. W. Catto, G. Dalbagni, H. B. Grossman, H. Herr, P. Karakiewicz, W. Kassouf, L. A. Kiemeny, C. La Vecchia, S. Shariat and Y. Lotan (2012). "Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer." Eur Urol.
 - Burger, M., W. Oosterlinck, B. Konety, S. Chang, S. Gudjonsson, R. Pruthi, M. Soloway, E. Solsona, P. Sved, M. Babjuk, M. A. Brausi, C. Cheng, E. Comperat, C. Dinney, W. Otto, J. Shah, J. Thurof and J. A. Witjes (2012). "ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder." Eur Urol.
 - Cabot, M. C., A. E. Giuliano, T. Y. Han and Y. Y. Liu (1999). "SDZ PSC 833, the cyclosporine A analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells." Cancer Res **59**(4): 880-885.
 - Calabro, F. and C. N. Sternberg (2012). "Metastatic bladder cancer: anything new?" Curr Opin Support Palliat Care **6**(3): 304-309.
 - Calviello, G., S. Serini, E. Piccioni and G. Pessina (2009). "Antineoplastic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in combination with drugs and radiotherapy: preventive and therapeutic strategies." Nutr Cancer **61**(3): 287-301.
 - Calzone, L., A. Gelay, A. Zinovyev, F. Radvanyi and E. Barillot (2008). "A comprehensive modular map of molecular interactions in RB/E2F pathway." Mol Syst Biol **4**: 173.
 - Campbell, M. J., L. J. Esserman, Y. Zhou, M. Shoemaker, M. Lobo, E. Borman, F. Baehner, A. S. Kumar, K. Adduci, C. Marx, E. F. Petricoin, L. A. Liotta, M. Winters, S. Benz and C. C. Benz (2006). "Breast cancer growth prevention by statins." Cancer Res **66**(17): 8707-8714.
 - Cantor, K. P., C. F. Lynch and D. Johnson (1992). "Bladder cancer, parity, and age at first birth." Cancer Causes Control **3**(1): 57-62.
 - Cao, G., M. L. Fehrenbach, J. T. Williams, J. M. Finklestein, J. X. Zhu and H. M. Delisser (2009). "Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice." Am J Pathol **175**(2): 903-915.
 - Cao, W., Z. Ma, M. M. Rasenick, S. Yeh and J. Yu (2012). "N-3 poly-unsaturated fatty acids shift estrogen signaling to inhibit human breast cancer cell growth." PLoS One **7**(12): e52838.
 - Cappellen, D., C. De Oliveira, D. Ricol, S. de Medina, J. Bourdin, X. Sastre-Garau, D. Chopin, J. P. Thiery and F. Radvanyi (1999). "Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas." Nat Genet **23**(1): 18-20.
 - Cascorbi, I., I. Roots and J. Brockmoller (2001). "Association of NAT1 and NAT2 polymorphisms to urinary bladder cancer:

-
- significantly reduced risk in subjects with NAT1*10." Cancer Res **61**(13): 5051-5056.
- Case, R. A. and M. E. Hosker (1954). "Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales." Br J Prev Soc Med **8**(2): 39-50.
 - Castelao, J. E., J. M. Yuan, M. Gago-Dominguez, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, K. K. Chan, M. A. Watson, D. A. Bell, G. A. Coetzee, R. K. Ross and M. C. Yu (2004). "Carotenoids/vitamin C and smoking-related bladder cancer." Int J Cancer **110**(3): 417-423.
 - Castelao, J. E., J. M. Yuan, M. Gago-Dominguez, M. C. Yu and R. K. Ross (2000). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention." Br J Cancer **82**(7): 1364-1369.
 - Catanzaro, O. L., L. C. Lauria, P. Obregon, E. S. Labal and R. R. Rodriguez (2010). "Side effects of cyclosporine-A treatment in rats: gingival overgrowth and early hyperglycemia." Acta Odontol Latinoam **23**(3): 240-243.
 - CDC (2004). "Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of cigarette use among 14 racial/ethnic populations - United States 1999-2001." Morb Mortal Wkly Rep. **53**: 49-52.
 - Chan, W. W., G. T. Wong and M. G. Irwin (2013). "Perioperative statin therapy." Expert Opin Pharmacother **14**(7): 831-842.
 - Chang, C. C., S. C. Ho, H. F. Chiu and C. Y. Yang (2011). "Statins increase the risk of prostate cancer: a population-based case-control study." Prostate **71**(16): 1818-1824.
 - Chen, C. J., Y. C. Chuang, S. L. You, T. M. Lin and H. Y. Wu (1986). "A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan." Br J Cancer **53**(3): 399-405.
 - Chen, C. J., T. L. Kuo and M. M. Wu (1988). "Arsenic and cancers." Lancet **1**(8582): 414-415.
 - Chen, H. I., S. H. Liou, C. H. Loh, S. N. Uang, Y. C. Yu and T. S. Shih (2005). "Bladder cancer screening and monitoring of 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) exposure among workers in Taiwan." Urology **66**(2): 305-310.
 - Chen, H. W., A. A. Kandutsch and H. J. Heiniger (1978). "The role of cholesterol in malignancy." Prog Exp Tumor Res **22**: 275-316.
 - Chen, Y., X. Gou, X. Ke, H. Cui and Z. Chen (2012). "Human tumor cells induce angiogenesis through positive feedback between CD147 and insulin-like growth factor-I." PLoS One **7**(7): e40965.
 - Cheng, L., D. D. Davidson, G. T. Maclennan, S. R. Williamson, S. Zhang, M. O. Koch, R. Montironi and A. Lopez-Beltran (2010). "The origins of urothelial carcinoma." Expert Rev Anticancer Ther **10**(6): 865-880.
 - Chikazawa, M., K. Inoue, S. Fukata, T. Karashima and T. Shuin (2008). "Expression of angiogenesis-related genes regulates different steps in the process of tumor growth and metastasis in human urothelial cell carcinoma of the urinary bladder." Pathobiology **75**(6): 335-345.
 - Chouaib, S., Y. Messai, S. Couve, B. Escudier, M. Hasmim and M. Z. Noman (2012). "Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape." Front Immunol **3**: 21.
 - Chow, N. H., P. Cairns, C. F. Eisenberger, M. P. Schoenberg, D. C. Taylor, J. I. Epstein and D. Sidransky (2000). "Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer." Int J Cancer **89**(6): 514-518.

- Clancy, Z., S. W. Keith, C. Rabinowitz, M. Ceccarelli, J. J. Gagne and V. Maio (2013). "Statins and colorectal cancer risk: a longitudinal study." Cancer Causes Control **24**(4): 777-782.
- Clayson, D. B., L. Fishbein and S. M. Cohen (1995). "Effects of stones and other physical factors on the induction of rodent bladder cancer." Food Chem Toxicol **33**(9): 771-784.
- Cloughesy, T. F., K. Yoshimoto, P. Nghiemphu, K. Brown, J. Dang, S. Zhu, T. Hsueh, Y. Chen, W. Wang, D. Youngkin, L. Liau, N. Martin, D. Becker, M. Bergsneider, A. Lai, R. Green, T. Oglesby, M. Koleto, J. Trent, S. Horvath, P. S. Mischel, I. K. Mellingshoff and C. L. Sawyers (2008). "Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma." PLoS Med **5**(1): e8.
- Cockbain, A. J., G. J. Toogood and M. A. Hull (2012). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer." Gut **61**(1): 135-149.
- Cohen, S. M. (1998). "Urinary bladder carcinogenesis." Toxicol Pathol **26**(1): 121-127.
- Cohen, S. M. (2002). "Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder." Toxicol Pathol **30**(6): 663-671.
- Cohen, S. M., E. M. Garland, M. St John, T. Okamura and R. A. Smith (1992). "Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis." Cancer Res **52**(13): 3577-3581.
- Colakoglu, T., T. Z. Nursal, A. Ezer, F. Kayaselcuk, A. Parlakgumus, S. Belli, H. Karakayali and M. Haberal (2010). "Effects of different doses of statins on liver regeneration through angiogenesis and possible relation between these effects and acute phase responses." Transplant Proc **42**(9): 3823-3827.
- Connor, W. E. (2000). "Importance of n-3 fatty acids in health and disease." Am J Clin Nutr **71**(1 Suppl): 171S-175S.
- Coogan, P. F., L. Rosenberg and B. L. Strom (2007). "Statin use and the risk of 10 cancers." Epidemiology **18**(2): 213-219.
- Cook, M. B., S. M. Dawsey, N. D. Freedman, P. D. Inskip, S. M. Wichner, S. M. Quraishi, S. S. Devesa and K. A. McGlynn (2009). "Sex disparities in cancer incidence by period and age." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(4): 1174-1182.
- Corcos, L. and C. Le Jossic-Corcos (2013). "Statins: Perspectives in cancer therapeutics." Dig Liver Dis.
- Cordon-Cardo, C. (2008). "Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression." Scand J Urol Nephrol Suppl (218): 154-165.
- Crow, P. and A. W. Ritchie (2003). "National and international variation in the registration of bladder cancer." BJU Int **92**(6): 563-566.
- Cully, M., H. You, A. J. Levine and T. W. Mak (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis." Nat Rev Cancer **6**(3): 184-192.
- Czachorowski, M. J., A. F. Amaral, S. Montes-Moreno, J. Lloreta, A. Carrato, A. Tardon, M. M. Morente, M. Kogevinas, F. X. Real, N. Malats and S. E. investigators (2012). "Cyclooxygenase-2 expression in bladder cancer and patient prognosis: results from a large clinical cohort and meta-analysis." PLoS One **7**(9): e45025.
- Czerniak, B., L. Li, V. Chaturvedi, J. Y. Ro, D. A. Johnston, S. Hodges and W. F. Benedict (2000). "Genetic modeling of human urinary bladder carcinogenesis." Genes Chromosomes Cancer **27**(4): 392-402.

-
- Dale, K. M., C. I. Coleman, N. N. Henyan, J. Kluger and C. M. White (2006). "Statins and cancer risk: a meta-analysis." JAMA **295**(1): 74-80.
 - Davidson, D. D. and L. Cheng (2006). "'Field cancerization" in the urothelium of the bladder." Anal Quant Cytol Histol **28**(6): 337-338.
 - Davies, N. M., A. J. McLachlan, R. O. Day and K. M. Williams (2000). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor." Clin Pharmacokinet **38**(3): 225-242.
 - de Groot, D. J., E. G. de Vries, H. J. Groen and S. de Jong (2007). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic." Crit Rev Oncol Hematol **61**(1): 52-69.
 - de Heer, P., M. H. Sandel, G. Guertens, G. de Boeck, M. M. Koudijs, J. F. Nagelkerke, J. M. Junggeburst, E. A. de Bruijn, C. J. van de Velde and P. J. Kuppen (2008). "Celecoxib inhibits growth of tumors in a syngeneic rat liver metastases model for colorectal cancer." Cancer Chemother Pharmacol **62**(5): 811-819.
 - Deerberg, F., S. Rehm and H. H. Jostmeyer (1985). "Spontaneous urinary bladder tumors in DA/Han rats: a feasible model of human bladder cancer." J Natl Cancer Inst **75**(6): 1113-1121.
 - DeLisser, H. M., M. Christofidou-Solomidou, R. M. Strieter, M. D. Burdick, C. S. Robinson, R. S. Wexler, J. S. Kerr, C. Garlanda, J. R. Merwin, J. A. Madri and S. M. Albelda (1997). "Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis." Am J Pathol **151**(3): 671-677.
 - Demierre, M. F., P. D. Higgins, S. B. Gruber, E. Hawk and S. M. Lippman (2005). "Statins and cancer prevention." Nat Rev Cancer **5**(12): 930-942.
 - DeSesso, J. M. (1995). "Anatomical relationships of urinary bladders compared: their potential role in the development of bladder tumours in humans and rats." Food Chem Toxicol **33**(9): 705-714.
 - Dhawan, D., A. B. Jeffreys, R. Zheng, J. C. Stewart and D. W. Knapp (2008). "Cyclooxygenase-2 dependent and independent antitumor effects induced by celecoxib in urinary bladder cancer cells." Mol Cancer Ther **7**(4): 897-904.
 - Dinney, C. P., D. J. McConkey, R. E. Millikan, X. Wu, M. Bar-Eli, L. Adam, A. M. Kamat, A. O. Siefker-Radtke, T. Tuziak, A. L. Sabichi, H. B. Grossman, W. F. Benedict and B. Czerniak (2004). "Focus on bladder cancer." Cancer Cell **6**(2): 111-116.
 - Divrik, R. T., A. F. Sahin, U. Yildirim, M. Altok and F. Zorlu (2010). "Impact of routine second transurethral resection on the long-term outcome of patients with newly diagnosed pT1 urothelial carcinoma with respect to recurrence, progression rate, and disease-specific survival: a prospective randomised clinical trial." Eur Urol **58**(2): 185-190.
 - Donat, S. M., S. Bayuga, H. W. Herr and M. Berwick (2003). "Fluid intake and the risk of tumor recurrence in patients with superficial bladder cancer." J Urol **170**(5): 1777-1780.
 - Dong, J., X. Yu, L. Wang, Y. B. Sun, X. J. Chen and G. J. Wang (2008). "Effects of cyclosporin A and itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin in rats." Acta Pharmacol Sin **29**(10): 1247-1252.
 - Dudkin, L., M. B. Dilling, P. J. Cheshire, F. C. Harwood, M. Hollingshead, S. G. Arbuck, R. Travis, E. A. Sausville and P. J. Houghton (2001). "Biochemical correlates of mTOR inhibition by

- the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition." Clin Cancer Res **7**(6): 1758-1764.
- Dulak, J. and A. Jozkowicz (2005). "Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy." Curr Cancer Drug Targets **5**(8): 579-594.
 - Dumont, N. and C. L. Arteaga (2002). "The tumor microenvironment: a potential arbitrator of the tumor suppressive and promoting actions of TGFbeta." Differentiation **70**(9-10): 574-582.
 - Duncan, R. E., D. W. Bennett, A. T. Evans, B. S. Aron and H. F. Schellhas (1977). "Radiation-induced bladder tumors." J Urol **118**(1 Pt 1): 43-45.
 - Eaton, M., J. Eklof, J. R. Beal and A. E. Sahmoun (2009). "Statins and breast cancer in postmenopausal women without hormone therapy." Anticancer Res **29**(12): 5143-5148.
 - Eder, I. E., A. Stenzl, A. Hobisch, M. V. Cronauer, G. Bartsch and H. Klocker (1996). "Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma." J Urol **156**(3): 953-957.
 - Edwards, B. K., M. L. Brown, P. A. Wingo, H. L. Howe, E. Ward, L. A. Ries, D. Schrag, P. M. Jamison, A. Jemal, X. C. Wu, C. Friedman, L. Harlan, J. Warren, R. N. Anderson and L. W. Pickle (2005). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment." J Natl Cancer Inst **97**(19): 1407-1427.
 - Elcock, M. and R. W. Morgan (1993). "Update on artificial sweeteners and bladder cancer." Regul Toxicol Pharmacol **17**(1): 35-43.
 - Elewa, H. F., A. B. El-Remessy, P. R. Somanath and S. C. Fagan (2010). "Diverse effects of statins on angiogenesis: new therapeutic avenues." Pharmacotherapy **30**(2): 169-176.
 - Elfiky, A. A. and J. E. Rosenberg (2009). "Targeting angiogenesis in bladder cancer." Curr Oncol Rep **11**(3): 244-249.
 - Elliott, R. L. and G. C. Blobe (2005). "Role of transforming growth factor Beta in human cancer." J Clin Oncol **23**(9): 2078-2093.
 - EMA.
 - Epstein, J. I., M. B. Amin, V. R. Reuter and F. K. Mostofi (1998). "The World Health 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 **22**(12): 1435-1448.
 - Esrig, D., D. Elmajian, S. Groshen, J. A. Freeman, J. P. Stein, S. C. Chen, P. W. Nichols, D. G. Skinner, P. A. Jones and R. J. Cote (1994). "Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer." N Engl J Med **331**(19): 1259-1264.
 - Eynard, A. R. (1998). "Is the risk of urinary tract tumorigenesis enhanced by a marginal chronic essential fatty acid deficiency (EFAD)?" Nutrition **14**(2): 211-216.
 - Fasano, E., S. Serini, E. Piccioni, I. Innocenti and G. Calviello (2010). "Chemoprevention of lung pathologies by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." Curr Med Chem **17**(29): 3358-3376.
 - Ferguson, N. L., J. Bell, R. Heidel, S. Lee, S. Vanmeter, L. Duncan, B. Munsey, T. Panella and A. Orucevic (2013). "Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in caucasian women." Breast J **19**(1): 22-30.

-
- Ferlay, J., G. Randi, C. Bosetti, F. Levi, E. Negri, P. Boyle and C. La Vecchia (2008). "Declining mortality from bladder cancer in Europe." BJU Int **101**(1): 11-19.
 - Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.
 - Fernandes, E. T., J. C. Manivel, P. K. Reddy and C. J. Ercole (1996). "Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases." J Urol **156**(6): 1931-1933.
 - Ferrucci, L. M., R. Sinha, M. H. Ward, B. I. Graubard, A. R. Hollenbeck, B. A. Kilfoy, A. Schatzkin, D. S. Michaud and A. J. Cross (2010). "Meat and components of meat and the risk of bladder cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study." Cancer **116**(18): 4345-4353.
 - Festing, M. (2003). Laboratory Animal Genetics and Genetic Quality Control. Handbook of Laboratory Animal Science. H. J. a. V. Hoosier. Washington DC, CRC Press. **I**: 173-203.
 - Fetterman, J. W., Jr. and M. M. Zdanowicz (2009). "Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease." Am J Health Syst Pharm **66**(13): 1169-1179.
 - Fini, L., G. Piazzzi, C. Ceccarelli, Y. Daoud, A. Belluzzi, A. Munarini, G. Graziani, V. Fogliano, M. Selgrad, M. Garcia, A. Gasbarrini, R. M. Genta, C. R. Boland and L. Ricciardiello (2010). "Highly purified eicosapentaenoic acid as free fatty acids strongly suppresses polyps in Apc(Min/+) mice." Clin Cancer Res **16**(23): 5703-5711.
 - Fleshner, N. E., H. W. Herr, A. K. Stewart, G. P. Murphy, C. Mettlin and H. R. Menck (1996). "The National Cancer Data Base report on bladder carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society." Cancer **78**(7): 1505-1513.
 - Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
 - Fortuny, J., M. Kogevinas, M. S. Zens, A. Schned, A. S. Andrew, J. Heaney, K. T. Kelsey and M. R. Karagas (2007). "Analgesic and anti-inflammatory drug use and risk of bladder cancer: a population based case control study." BMC Urol **7**: 13.
 - Foster, F. (1979). "New Zealand Cancer Registry report." Natl Cancer Inst Monogr(53): 77-80.
 - Freedman, N. D., D. T. Silverman, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin and C. C. Abnet (2011). "Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women." JAMA **306**(7): 737-745.
 - Fukushima, S. (1991). "Modification of tumor development in the urinary bladder." Prog Exp Tumor Res **33**: 154-174.
 - Gaertner, R. R. and G. P. Theriault (2002). "Risk of bladder cancer in foundry workers: a meta-analysis." Occup Environ Med **59**(10): 655-663.
 - Gago-Dominguez, M., D. A. Bell, M. A. Watson, J. M. Yuan, J. E. Castelao, D. W. Hein, K. K. Chan, G. A. Coetzee, R. K. Ross and M. C. Yu (2003). "Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferases 1 and 2." Carcinogenesis **24**(3): 483-489.
 - Gago-Dominguez, M., J. E. Castelao, J. M. Yuan, M. C. Yu and R. K. Ross (2001). "Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk." Int J Cancer **91**(4): 575-579.
 - Garcia-Perez, J., M. Pollan, E. Boldo, B. Perez-Gomez, N. Aragones, V. Lope, R. Ramis, E. Vidal and G. Lopez-Abente (2009). "Mortality due to lung, laryngeal and bladder cancer in

- towns lying in the vicinity of combustion installations." Sci Total Environ **407**(8): 2593-2602.
- Garcia Gomez, M., R. Urbanos Garrido, R. Castaneda Lopez and P. Lopez Menduina (2012). "[Direct health care costs of lung and bladder cancer attributable to work. Spain, 2008]." Rev Esp Salud Publica **86**(2): 127-138.
 - Garrett, B. E., S. R. Dube, A. Trosclair, R. S. Caraballo, T. F. Pechacek, C. Centers for Disease and Prevention (2011). "Cigarette smoking - United States, 1965-2008." MMWR Surveill Summ **60 Suppl**: 109-113.
 - Gazerro, P., M. C. Proto, G. Gangemi, A. M. Malfitano, E. Ciaglia, S. Pisanti, A. Santoro, C. Laezza and M. Bifulco (2012). "Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer." Pharmacol Rev **64**(1): 102-146.
 - Gecit, I., M. Aslan, M. Gunes, N. Pirincci, R. Esen, H. Demir and K. Ceylan (2012). "Serum prolidase activity, oxidative stress, and nitric oxide levels in patients with bladder cancer." J Cancer Res Clin Oncol **138**(5): 739-743.
 - Gedye, C., A. J. Davidson, M. R. Elmes, J. Cebon, D. Bolton and I. D. Davis (2010). "Cancer stem cells in urologic cancers." Urol Oncol **28**(6): 585-590.
 - Gee, J., I. L. Lee, D. Jendiroba, S. M. Fischer, H. B. Grossman and A. L. Sabichi (2006). "Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer." Oncol Rep **15**(2): 471-477.
 - Gee, J. R., C. B. Burmeister, T. C. Havighurst and K. Kim (2009). "Cyclin-mediated G1 arrest by celecoxib differs in low-versus high-grade bladder cancer." Anticancer Res **29**(10): 3769-3775.
 - Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd and M. S. Brown (2006). "Protein sensors for membrane sterols." Cell **124**(1): 35-46.
 - Goldstein, J. L., R. B. Rawson and M. S. Brown (2002). "Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis." Arch Biochem Biophys **397**(2): 139-148.
 - Goldstein, M. R., L. Mascitelli and F. Pezzetta (2008). "How statins may increase prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(2): 459.
 - Golka, K., A. Wiese, G. Assennato and H. M. Bolt (2004). "Occupational exposure and urological cancer." World J Urol **21**(6): 382-391.
 - Gong, L., C. F. Thorn, M. M. Bertagnolli, T. Grosser, R. B. Altman and T. E. Klein (2012). "Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics." Pharmacogenet Genomics **22**(4): 310-318.
 - Gonyeau, M. J. and D. W. Yuen (2010). "A clinical review of statins and cancer: helpful or harmful?" Pharmacotherapy **30**(2): 177-194.
 - Gonzalez-Campora, R., G. Davalos-Casanova, A. Beato-Moreno, A. Garcia-Escudero, M. J. Pareja Megia, R. Montironi and A. Lopez-Beltran (2007). "BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma." Cancer Lett **250**(2): 292-299.
 - Goossens, M. E., F. Buntinx, S. Joniau, K. Ackaert, F. Ameye, I. Billiet, J. Braeckman, A. Breugelmans, J. Darras, K. Dilen, L. Goeman, E. Kellen, B. Tombal, S. Van Bruwaene, B. Van Cleyenbreuge, F. Van der Aa, K. Vekemans, H. Van Poppel and M. P. Zeegers (2012). "Designing the selenium and bladder cancer

- trial (SELEBLAT), a phase III randomized chemoprevention study with selenium on recurrence of bladder cancer in Belgium." BMC Urol **12**: 8.
- Gore, J. L., L. Kwan, C. S. Saigal and M. S. Litwin (2005). "Marriage and mortality in bladder carcinoma." Cancer **104**(6): 1188-1194.
 - Gowda, R., S. V. Madhunapantula, D. Desai, S. Amin and G. P. Robertson (2013). "Simultaneous targeting of COX-2 and AKT using selenocoxib-1-GSH to inhibit melanoma." Mol Cancer Ther **12**(1): 3-15.
 - Grant, E. J., K. Ozasa, D. L. Preston, A. Suyama, Y. Shimizu, R. Sakata, H. Sugiyama, T. M. Pham, J. Cologne, M. Yamada, A. J. De Roos, K. J. Kopecky, M. P. Porter, N. Seixas and S. Davis (2012). "Effects of radiation and lifestyle factors on risks of urothelial carcinoma in the Life Span Study of atomic bomb survivors." Radiat Res **178**(1): 86-98.
 - Grasso, M. (2008). "Bladder cancer: major public health issue." Eur Urol Suppl **7**: 510-515.
 - Gratzke, C., T. Streng, A. Park, G. Christ, C. G. Stief, P. Hedlund and K. E. Andersson (2009). "Distribution and function of cannabinoid receptors 1 and 2 in the rat, monkey and human bladder." J Urol **181**(4): 1939-1948.
 - Green, A., V. Beral and K. Moser (1988). "Mortality in women in relation to their childbearing history." BMJ **297**(6645): 391-395.
 - Griffiths, T. R. and J. K. Mellon (2000). "Human papillomavirus and urological tumours: II. Role in bladder, prostate, renal and testicular cancer." BJU Int **85**(2): 211-217.
 - Groah, S. L., D. A. Weitzenkamp, D. P. Lammertse, G. G. Whiteneck, D. C. Lezotte and R. F. Hamman (2002). "Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer." Arch Phys Med Rehabil **83**(3): 346-351.
 - Grubbs, C. J., R. A. Lubet, A. T. Koki, K. M. Leahy, J. L. Masferrer, V. E. Steele, G. J. Kelloff, D. L. Hill and K. Seibert (2000). "Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats." Cancer Res **60**(20): 5599-5602.
 - Gschwind, A., O. M. Fischer and A. Ullrich (2004). "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **4**(5): 361-370.
 - Gu, J., D. Liang, Y. Wang, C. Lu and X. Wu (2005). "Effects of N-acetyl transferase 1 and 2 polymorphisms on bladder cancer risk in Caucasians." Mutat Res **581**(1-2): 97-104.
 - Gudjonsson, S., L. Adell, F. Merdasa, R. Olsson, B. Larsson, T. Davidsson, J. Richtigoff, G. Hagberg, M. Grabe, P. O. Bendahl, W. Mansson and F. Liedberg (2009). "Should all patients with non-muscle-invasive bladder cancer receive early intravesical chemotherapy after transurethral resection? The results of a prospective randomised multicentre study." Eur Urol **55**(4): 773-780.
 - Gust, K. M. and A. I. So (2009). "The role of mTOR in bladder cancer." Cancer Biol Ther **8**(24): 2348-2350.
 - Gustafson-Svard, C., I. Lilja, O. Hallbook and R. Sjudahl (1996). "Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azoxymethane induced colonic tumours in rats." Gut **38**(1): 79-84.
 - Hafner, C., R. Knuechel, R. Stoehr and A. Hartmann (2002). "Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies." Int J Cancer **101**(1): 1-6.

- Halliwell, B. (2007). "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" Biochem J **401**(1): 1-11.
- Hammam, O. A., A. A. Aziz, M. S. Roshdy and A. M. Abdel Hadi (2008). "Possible role of cyclooxygenase-2 in schistosomal and non-schistosomal-associated bladder cancer." Medscape J Med **10**(3): 60.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hankey, B. F., B. K. Edwards, L. A. Ries, C. L. Percy and E. Shambaugh (1991). "Problems in cancer surveillance: delineating in situ and invasive bladder cancer." J Natl Cancer Inst **83**(6): 384-385.
- Hankey, B. F. and M. H. Myers (1987). "Black/white differences in bladder cancer patient survival." J Chronic Dis **40**(1): 65-73.
- Hansel, D. E., E. Platt, M. Orloff, J. Harwalker, S. Sethu, J. L. Hicks, A. De Marzo, R. E. Steinle, E. D. Hsi, D. Theodorescu, C. B. Ching and C. Eng (2010). "Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma." Am J Pathol **176**(6): 3062-3072.
- Hardman, W. E. (2004). "(n-3) fatty acids and cancer therapy." J Nutr **134**(12 Suppl): 3427S-3430S.
- Hartge, P., D. Silverman, R. Hoover, C. Schairer, R. Altman, D. Austin, K. Cantor, M. Child, C. Key, L. D. Marrett and et al. (1987). "Changing cigarette habits and bladder cancer risk: a case-control study." J Natl Cancer Inst **78**(6): 1119-1125.
- Hartge, P., D. T. Silverman, C. Schairer and R. N. Hoover (1993). "Smoking and bladder cancer risk in blacks and whites in the United States." Cancer Causes Control **4**(4): 391-394.
- Hattori, K., K. Iida, A. Joraku, S. Tsukamoto, H. Akaza and R. Oyasu (2006). "Chemopreventive effects of cyclooxygenase-2 inhibitor and epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor on rat urinary bladder carcinogenesis." BJU Int **97**(3): 640-643.
- Hautmann, R. E., R. C. de Petriconi and B. G. Volkmer (2010). "Lessons learned from 1,000 neobladders: the 90-day complication rate." J Urol **184**(3): 990-994; quiz 1235.
- Hautmann, R. E., R. C. de Petriconi and B. G. Volkmer (2011). "25 years of experience with 1,000 neobladders: long-term complications." J Urol **185**(6): 2207-2212.
- Hawcroft, G., P. M. Loadman, A. Belluzzi and M. A. Hull (2010). "Effect of eicosapentaenoic acid on E-type prostaglandin synthesis and EP4 receptor signaling in human colorectal cancer cells." Neoplasia **12**(8): 618-627.
- Hayashi, A., M. Suzuki, Y. Ogawa, R. Sonoda and M. Sasamata (2004). "Post-stroke atorvastatin treatment reduces neurological deficits and mortality rate in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat." J Pharm Pharmacol **56**(7): 893-898.
- He, F., L. Mo, X. Y. Zheng, C. Hu, H. Lepor, E. Y. Lee, T. T. Sun and X. R. Wu (2009). "Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis." Cancer Res **69**(24): 9413-9421.
- He, Z., W. Kosinska, Z. L. Zhao, X. R. Wu and J. B. Guttenplan (2012). "Tissue-specific mutagenesis by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine as the basis for urothelial carcinogenesis." Mutat Res **742**(1-2): 92-95.
- Heinze, V. M. and A. B. Actis (2012). "Dietary conjugated linoleic acid and long-chain n-3 fatty acids in mammary and prostate cancer protection: a review." Int J Food Sci Nutr **63**(1): 66-78.

-
- Helmy, A., O. A. Hammam, T. R. El Lithy and M. M. El Deen Wishahi (2007). "The role of TGF-beta-1 protein and TGF-beta-R-1 receptor in immune escape mechanism in bladder cancer." MedGenMed **9**(4): 34.
 - Hemelt, M., Z. Hu, Z. Zhong, L. P. Xie, Y. C. Wong, P. C. Tam, K. K. Cheng, Z. Ye, X. Bi, Q. Lu, Y. Mao, W. D. Zhong and M. P. Zeegers (2010). "Fluid intake and the risk of bladder cancer: results from the South and East China case-control study on bladder cancer." Int J Cancer **127**(3): 638-645.
 - Hemelt, M., H. Yamamoto, K. K. Cheng and M. P. Zeegers (2009). "The effect of smoking on the male excess of bladder cancer: a meta-analysis and geographical analyses." Int J Cancer **124**(2): 412-419.
 - Hemminki, K., J. L. Bermejo, J. Ji and R. Kumar (2011). "Familial bladder cancer and the related genes." Curr Opin Urol **21**(5): 386-392.
 - Hendrickse, C. W., M. R. Keighley and J. P. Neoptolemos (1995). "Dietary omega-3 fats reduce proliferation and tumor yields at colorectal anastomosis in rats." Gastroenterology **109**(2): 431-439.
 - Hersey, P. (1999). "Impediments to successful immunotherapy." Pharmacol Ther **81**(2): 111-119.
 - Hess, M. J., E. H. Zhan, D. K. Foo and S. V. Yalla (2003). "Bladder cancer in patients with spinal cord injury." J Spinal Cord Med **26**(4): 335-338.
 - Hidalgo, M. and E. K. Rowinsky (2000). "The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy." Oncogene **19**(56): 6680-6686.
 - Hoffmann, D., I. Hoffmann and K. El-Bayoumy (2001). "The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder." Chem Res Toxicol **14**(7): 767-790.
 - Hojo, M., T. Morimoto, M. Maluccio, T. Asano, K. Morimoto, M. Lagman, T. Shimbo and M. Suthanthiran (1999). "Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism." Nature **397**(6719): 530-534.
 - Hollenbeck, B. K., R. L. Dunn, Z. Ye, J. M. Hollingsworth, C. T. Lee and J. D. Birkmeyer (2010). "Racial differences in treatment and outcomes among patients with early stage bladder cancer." Cancer **116**(1): 50-56.
 - Horn, E. P., M. A. Tucker, G. Lambert, D. Silverman, D. Zametkin, R. Sinha, T. Hartge, M. T. Landi and N. E. Caporaso (1995). "A study of gender-based cytochrome P4501A2 variability: a possible mechanism for the male excess of bladder cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(5): 529-533.
 - Hoy, S. M. and G. M. Keating (2009). "Omega-3 ethylester concentrate: a review of its use in secondary prevention post-myocardial infarction and the treatment of hypertriglyceridaemia." Drugs **69**(8): 1077-1105.
 - Hu, P. J., J. Yu, Z. R. Zeng, W. K. Leung, H. L. Lin, B. D. Tang, A. H. Bai and J. J. Sung (2004). "Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats." Gut **53**(2): 195-200.
 - Huncharek, M., J. F. Geschwind, B. Witherspoon, R. McGarry and D. Adcock (2000). "Intravesical chemotherapy prophylaxis in primary superficial bladder cancer: a meta-analysis of 3703 patients from 11 randomized trials." J Clin Epidemiol **53**(7): 676-680.
 - Huncharek, M., R. McGarry and B. Kupelnick (2001). "Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent

- superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis." Anticancer Res **21**(1B): 765-769.
- Iida, K., K. Itoh, Y. Kumagai, R. Oyasu, K. Hattori, K. Kawai, T. Shimazui, H. Akaza and M. Yamamoto (2004). "Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis." Cancer Res **64**(18): 6424-6431.
 - Iida, K., K. Itoh, J. M. Maher, Y. Kumagai, R. Oyasu, Y. Mori, T. Shimazui, H. Akaza and M. Yamamoto (2007). "Nrf2 and p53 cooperatively protect against BBN-induced urinary bladder carcinogenesis." Carcinogenesis **28**(11): 2398-2403.
 - Iurlaro, M., A. Vacca, M. Minischetti, D. Ribatti, A. Pellegrino, A. Sardanelli, F. Giacchetta and F. Dammacco (1998). "Antiangiogenesis by cyclosporine." Exp Hematol **26**(13): 1215-1222.
 - Iwamoto, K., M. Takei and J. Watanabe (1982). "Gastrintestinal and hepatic first-pass metabolism of aspirin in rats." J Pharm Pharmacol **34**(3): 176-180.
 - Jacobs, E. J., A. K. Henion, P. J. Briggs, C. J. Connell, M. L. McCullough, C. R. Jonas, C. Rodriguez, E. E. Calle and M. J. Thun (2002). "Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women." Am J Epidemiol **156**(11): 1002-1010.
 - Jebar, A. H., C. D. Hurst, D. C. Tomlinson, C. Johnston, C. F. Taylor and M. A. Knowles (2005). "FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma." Oncogene **24**(33): 5218-5225.
 - Jemal, A., E. Ward, Y. Hao and M. Thun (2005). "Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002." JAMA **294**(10): 1255-1259.
 - Jendrossek, V., R. Handrick and C. Belka (2003). "Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway." FASEB J **17**(11): 1547-1549.
 - Jensen, O. M., J. Wahrendorf, J. B. Knudsen and B. L. Sorensen (1986). "The Copenhagen case-control study of bladder cancer. II. Effect of coffee and other beverages." Int J Cancer **37**(5): 651-657.
 - Jiang, K., B. He, L. Lai, Q. Chen, Y. Liu, Q. Guo and Q. Wang (2012). "Cyclosporine A inhibits breast cancer cell growth by downregulating the expression of pyruvate kinase subtype M2." Int J Mol Med **30**(2): 302-308.
 - Jiang, X., J. M. Yuan, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum and M. C. Yu (2007). "Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County." Cancer Res **67**(15): 7540-7545.
 - Jones, M. L., P. J. Mark, T. A. Mori, J. A. Keelan and B. J. Waddell (2013). "Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat." Biol Reprod **88**(2): 37.
 - Jones, P. A., J. D. Buckley, B. E. Henderson, R. K. Ross and M. C. Pike (1991). "From gene to carcinogen: a rapidly evolving field in molecular epidemiology." Cancer Res **51**(13): 3617-3620.
 - Jones, T. D., M. D. Carr, J. N. Eble, M. Wang, A. Lopez-Beltran and L. Cheng (2005). "Clonal origin of lymph node metastases in bladder carcinoma." Cancer **104**(9): 1901-1910.
 - Jones, T. D., M. Wang, J. N. Eble, G. T. MacLennan, A. Lopez-Beltran, S. Zhang, A. Cocco and L. Cheng (2005). "Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis." Clin Cancer Res **11**(18): 6512-6519.

-
- Kahan, B. D., K. L. Napoli, P. A. Kelly, J. Podbielski, I. Hussein, D. L. Urbauer, S. H. Katz and C. T. Van Buren (2000). "Therapeutic drug monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity." Clin Transplant **14**(2): 97-109.
 - Kahraman, D., A. Holstein, M. Scheffler, T. Zander, L. Nogova, A. A. Lammertsma, R. Boellaard, B. Neumaier, M. Dietlein, J. Wolf and C. Kobe (2012). "Tumor lesion glycolysis and tumor lesion proliferation for response prediction and prognostic differentiation in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with erlotinib." Clin Nucl Med **37**(11): 1058-1064.
 - Kaldor, J. M., N. E. Day, B. Kittelmann, F. Pettersson, F. Langmark, D. Pedersen, P. Prior, F. Neal, S. Karjalainen, J. Bell and et al. (1995). "Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study." Int J Cancer **63**(1): 1-6.
 - Kalisvaart, J. F., H. K. Katsumi, L. D. Ronningen and R. M. Hovey (2010). "Bladder cancer in spinal cord injury patients." Spinal Cord **48**(3): 257-261.
 - Kamat, A. M., P. K. Hegarty, J. R. Gee, P. E. Clark, R. S. Svatek, N. Hegarty, S. F. Shariat, E. Xylinas, B. J. Schmitz-Drager, Y. Lotan, L. C. Jenkins, M. Droller, B. W. van Rhijn and P. I. Karakiewicz (2012). "ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Screening, Diagnosis, and Molecular Markers." Eur Urol.
 - Kamat, A. M., J. A. Karam, H. B. Grossman, A. K. Kader, M. Munsell and C. P. Dinney (2011). "Prospective trial to identify optimal bladder cancer surveillance protocol: reducing costs while maximizing sensitivity." BJU Int **108**(7): 1119-1123.
 - Kamat, A. M. and G. M. Nelkin (2005). "Atorvastatin: a potential chemopreventive agent in bladder cancer." Urology **66**(6): 1209-1212.
 - Kantor, A. F., P. Hartge, R. N. Hoover, A. S. Narayana, J. W. Sullivan and J. F. Fraumeni, Jr. (1984). "Urinary tract infection and risk of bladder cancer." Am J Epidemiol **119**(4): 510-515.
 - Karre, K. (2002). "NK cells, MHC class I molecules and the missing self." Scand J Immunol **55**(3): 221-228.
 - Katkoori, V. R., K. Manne, V. S. Vital-Reyes, C. Rodriguez-Burford, C. Shanmugam, M. Sthanam, U. Manne, C. Chatla, S. A. Abdulkadir and W. E. Grizzle (2013). "Selective COX-2 inhibitor (celecoxib) decreases cellular growth in prostate cancer cell lines independent of p53." Biotech Histochem **88**(1): 38-46.
 - Kaye, J. A. and H. Jick (2004). "Statin use and cancer risk in the General Practice Research Database." Br J Cancer **90**(3): 635-637.
 - Keown, P. A., C. R. Stiller, A. L. Laupacis, W. Howson, R. Coles, M. Stawecki, J. Koegler, G. Carruthers, N. McKenzie and N. R. Sinclair (1982). "The effects and side effects of cyclosporine: relationship to drug pharmacokinetics." Transplant Proc **14**(4): 659-661.
 - Kiemeny, L. A., N. C. Moret, J. A. Witjes, M. P. Schoenberg and H. Tulinius (1997). "Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland." J Urol **157**(5): 1649-1651.
 - Kiemeny, L. A., P. Sulem, S. Besenbacher, S. H. Vermeulen, A. Sigurdsson, G. Thorleifsson, D. F. Gudbjartsson, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, C. Zanon, J. Kostic, G. Masson, H. Bjarnason, S. T. Palsson, O. B. Skarphedinsson, S. A. Gudjonsson, J. A. Witjes, A. J. Grotenhuis, G. W. Verhaegh, D. T. Bishop, S. C. Sak, A. Choudhury, F. Elliott, J. H. Barrett, C. D. Hurst, P. J.

- de Verdier, C. Ryk, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, P. Vineis, S. Polidoro, S. Guarrera, C. Sacerdote, M. Campagna, D. Placidi, C. Arici, M. P. Zeegers, E. Kellen, B. S. Gutierrez, J. I. Sanz-Velez, M. Sanchez-Zalabardo, G. Valdivia, M. D. Garcia-Prats, J. G. Hengstler, M. Blaszewicz, H. Dietrich, R. A. Ophoff, L. H. van den Berg, K. Alexiusdottir, K. Kristjansson, G. Geirsson, S. Nikulasson, V. Petursdottir, A. Kong, T. Thorgeirsson, N. A. Mungan, A. Lindblom, M. A. van Es, S. Porru, F. Buntinx, K. Golka, J. I. Mayordomo, R. Kumar, G. Matullo, G. Steineck, A. E. Kiltie, K. K. Aben, E. Jonsson, U. Thorsteinsdottir, M. A. Knowles, T. Rafnar and K. Stefansson (2010). "A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer." Nat Genet **42**(5): 415-419.
- Kiemeny, L. A., S. Thorlacius, P. Sulem, F. Geller, K. K. Aben, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, M. Jakobsdottir, J. T. Bergthorsson, A. Sigurdsson, T. Blondal, J. A. Witjes, S. H. Vermeulen, C. A. Hulsbergen-van de Kaa, D. W. Swinkels, M. Ploeg, E. B. Cornel, H. Vergunst, T. E. Thorgeirsson, D. Gudbjartsson, S. A. Gudjonsson, G. Thorleifsson, K. T. Kristinsson, M. Mouy, S. Snorraddottir, D. Placidi, M. Campagna, C. Arici, K. Koppova, E. Gurzau, P. Rudnai, E. Kellen, S. Polidoro, S. Guarrera, C. Sacerdote, M. Sanchez, B. Saez, G. Valdivia, C. Ryk, P. de Verdier, A. Lindblom, K. Golka, D. T. Bishop, M. A. Knowles, S. Nikulasson, V. Petursdottir, E. Jonsson, G. Geirsson, B. Kristjansson, J. I. Mayordomo, G. Steineck, S. Porru, F. Buntinx, M. P. Zeegers, T. Fletcher, R. Kumar, G. Matullo, P. Vineis, A. E. Kiltie, J. R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, T. Rafnar and K. Stefansson (2008). "Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer." Nat Genet **40**(11): 1307-1312.
 - Kiemeny, L. A., K. P. van Houwelingen, M. Bogaerts, J. A. Witjes, D. W. Swinkels, M. den Heijer, B. Franke, J. A. Schalken and G. W. Verhaegh (2006). "Polymorphisms in the E-cadherin (CDH1) gene promoter and the risk of bladder cancer." Eur J Cancer **42**(18): 3219-3227.
 - Kim, J. H., T. Tuziak, L. Hu, Z. Wang, J. Bondaruk, M. Kim, G. Fuller, C. Dinney, H. B. Grossman, K. Baggerly, W. Zhang and B. Czerniak (2005). "Alterations in transcription clusters underlie development of bladder cancer along papillary and nonpapillary pathways." Lab Invest **85**(4): 532-549.
 - Kim, S. K., S. J. Yun, J. Kim, O. J. Lee, S. C. Bae and W. J. Kim (2011). "Identification of gene expression signature modulated by nicotinamide in a mouse bladder cancer model." PLoS One **6**(10): e26131.
 - Kim, S. P., N. D. Shah, R. J. Karnes, C. J. Weight, I. Frank, J. P. Moriarty, L. C. Han, B. Borah, M. K. Tollefson and S. A. Boorjian (2012). "The implications of hospital acquired adverse events on mortality, length of stay and costs for patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer." J Urol **187**(6): 2011-2017.
 - Kirkali, Z., T. Chan, M. Manoharan, F. Algaba, C. Busch, L. Cheng, L. Kiemeny, M. Kriegmair, R. Montironi, W. M. Murphy, I. A. Sesterhenn, M. Tachibana and J. Weider (2005). "Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis." Urology **66**(6 Suppl 1): 4-34.
 - Kishi, K., T. Hirota, K. Matsumoto, T. Kakizoe, T. Murase and J. Fujita (1981). "Carcinoma of the bladder: a clinical and pathological analysis of 87 autopsy cases." J Urol **125**(1): 36-39.

-
- Kitayama, W., A. Denda, E. Okajima, T. Tsujiuchi and Y. Konishi (1999). "Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in rat urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine." Carcinogenesis **20**(12): 2305-2310.
 - Knobeloch, L. M., K. M. Zierold and H. A. Anderson (2006). "Association of arsenic-contaminated drinking-water with prevalence of skin cancer in Wisconsin's Fox River Valley." J Health Popul Nutr **24**(2): 206-213.
 - Knowles, M. A. (2007). "Tumor suppressor loci in bladder cancer." Front Biosci **12**: 2233-2251.
 - Kogevinas, M., A. t Mannelte, S. Cordier, U. Ranft, C. A. Gonzalez, P. Vineis, J. Chang-Claude, E. Lynge, J. Wahrendorf, A. Tzonou, K. H. Jockel, C. Serra, S. Porru, M. Hours, E. Greiser and P. Boffetta (2003). "Occupation and bladder cancer among men in Western Europe." Cancer Causes Control **14**(10): 907-914.
 - Konety, B. R., V. Allareddy and P. R. Carroll (2007). "Factors affecting outcomes after radical cystectomy in African Americans." Cancer **109**(3): 542-548.
 - Konety, B. R. and S. A. Joslyn (2003). "Factors influencing aggressive therapy for bladder cancer: an analysis of data from the SEER program." J Urol **170**(5): 1765-1771.
 - Korkolopoulou, P., G. Levidou, E. A. Trigka, N. Prekete, M. Karlou, I. Thymara, S. Sakellariou, P. Fragkou, D. Isaiadis, P. Pavlopoulos, E. Patsouris and A. A. Saetta (2012). "A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma." BJU Int **110**(11 Pt C): E1237-1248.
 - Kotamraju, S., C. L. Williams and B. Kalyanaraman (2007). "Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways." Cancer Res **67**(15): 7386-7394.
 - Kris-Etherton, P. M., W. S. Harris, L. J. Appel and C. Nutrition (2003). "Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): e20-30.
 - Kruijtzter, C. M., J. H. Schellens, J. Mezger, M. E. Scheulen, U. Keilholz, J. H. Beijnen, H. Rosing, R. A. Mathot, S. Marcus, H. van Tinteren and P. Baas (2002). "Phase II and pharmacologic study of weekly oral paclitaxel plus cyclosporine in patients with advanced non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **20**(23): 4508-4516.
 - Kubiczikova, L., L. Sedlarikova, R. Hajek and S. Sevcikova (2012). "TGF-beta - an excellent servant but a bad master." J Transl Med **10**: 183.
 - Kunze, E. and J. Chowaniec (1990). "Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the urinary bladder." IARC Sci Publ(99): 345-397.
 - Kuo, C. C., H. F. Chiu, I. M. Lee, H. W. Kuo, C. T. Lee and C. Y. Yang (2012). "Statin use and the risk of bladder cancer: a population-based case-control study." Expert Opin Drug Saf **11**(5): 733-738.
 - Kuoppala, J., A. Lamminpaa and E. Pukkala (2008). "Statins and cancer: A systematic review and meta-analysis." Eur J Cancer **44**(15): 2122-2132.
 - Kurzrock, E. A., D. K. Lieu, L. A. Degraffenried, C. W. Chan and R. R. Isseroff (2008). "Label-retaining cells of the bladder:

- candidate urothelial stem cells." Am J Physiol Renal Physiol **294**(6): F1415-1421.
- Kusunoki, C., L. Yang, T. Yoshizaki, F. Nakagawa, A. Ishikado, M. Kondo, K. Morino, O. Sekine, S. Ugi, Y. Nishio, A. Kashiwagi and H. Maegawa (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **430**(1): 225-230.
 - La Rochelle, J., A. Kamat, H. B. Grossman and A. Pantuck (2008). "Chemoprevention of bladder cancer." BJU Int **102**(9 Pt B): 1274-1278.
 - La Vecchia, C., F. Lucchini, E. Negri and F. Levi (1999). "Urinary bladder cancer death rates in Europe." Ann Oncol **10**(12): 1529-1530.
 - Lamm, D. L., D. R. Riggs, J. S. Shriver, P. F. vanGilder, J. F. Rach and J. I. DeHaven (1994). "Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial." J Urol **151**(1): 21-26.
 - Lamm, S. H., A. Engel, M. B. Kruse, M. Feinleib, D. M. Byrd, S. Lai and R. Wilson (2004). "Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation." J Occup Environ Med **46**(3): 298-306.
 - Lattouf, J. B. (2009). "Chemoprevention in bladder cancer: What's new?" Can Urol Assoc J **3**(6 Suppl 4): S184-187.
 - Lau, Y. Y., H. Okochi, Y. Huang and L. Z. Benet (2006). "Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism." Drug Metab Dispos **34**(7): 1175-1181.
 - Lawson, L. D. and B. G. Hughes (1988). "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters." Biochem Biophys Res Commun **152**(1): 328-335.
 - Lee, C. C., T. Ichihara, S. Yamamoto, H. Wanibuchi, K. Sugimura, S. Wada, T. Kishimoto and S. Fukushima (1999). "Reduced expression of the CDK inhibitor p27(KIP1) in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1) and p53." Carcinogenesis **20**(9): 1697-1708.
 - Lee, C. T., R. L. Dunn, C. Williams and W. Underwood, 3rd (2006). "Racial disparity in bladder cancer: trends in tumor presentation at diagnosis." J Urol **176**(3): 927-933; discussion 933-924.
 - Leivonen, S. K. and V. M. Kahari (2007). "Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis." Int J Cancer **121**(10): 2119-2124.
 - Leppert, J. T., O. Shvarts, K. Kawaoka, R. Lieberman, A. S. Belldegrun and A. J. Pantuck (2006). "Prevention of bladder cancer: a review." Eur Urol **49**(2): 226-234.
 - Letasiova, S., A. Medve'ova, A. Sovcikova, M. Dusinska, K. Volkovova, C. Mosoiu and A. Bartonova (2012). "Bladder cancer, a review of the environmental risk factors." Environ Health **11 Suppl 1**: S11.
 - Levantesi, G., M. G. Silletta and R. Marchioli (2010). "Uses and benefits of omega-3 ethyl esters in patients with cardiovascular disease." J Multidiscip Healthc **3**: 79-96.
 - Levi, F., F. Lucchini, E. Negri, P. Boyle and C. La Vecchia (2004). "Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960." Int J Cancer **110**(2): 155-169.

-
- Lewinshtein, D., R. Gulati, P. S. Nelson and C. R. Porter (2012). "Incidence of second malignancies after external beam radiotherapy for clinical stage I testicular seminoma." BJU Int **109**(5): 706-712.
 - Lewis, J. D., A. Ferrara, T. Peng, M. Hedderson, W. B. Bilker, C. P. Quesenberry, Jr., D. J. Vaughn, L. Nessel, J. Selby and B. L. Strom (2011). "Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study." Diabetes Care **34**(4): 916-922.
 - Lewis, S. A. (2000). "Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask." Am J Physiol Renal Physiol **278**(6): F867-874.
 - Li, F., S. L. An, Y. Zhou, Z. K. Liang, Z. J. Jiao, Y. M. Jing, P. Wan, X. J. Shi and W. L. Tan (2011). "Milk and dairy consumption and risk of bladder cancer: a meta-analysis." Urology **78**(6): 1298-1305.
 - Li, H., H. A. Schut, P. Conran, P. M. Kramer, R. A. Lubet, V. E. Steele, E. E. Hawk, G. J. Kelloff and M. A. Pereira (1999). "Prevention by aspirin and its combination with alpha-difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E2 levels in rat colon." Carcinogenesis **20**(3): 425-430.
 - Li, Z., J. Yu, Q. Miao, S. Sun, L. Sun, H. Yang and L. Hou (2011). "The association of fish consumption with bladder cancer risk: a meta-analysis." World J Surg Oncol **9**: 107.
 - Liao, J. K. (2002). "Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins." J Clin Invest **110**(3): 285-288.
 - Lieberman, R. (2001). "Chemoprevention of superficial bladder cancer." Cancer Treat Res **106**: 237-254.
 - Liebert, M. and J. Seigne (1996). "Characteristics of invasive bladder cancers: histological and molecular markers." Semin Urol Oncol **14**(2): 62-72.
 - Ligumsky, M., E. M. Golanska, D. G. Hansen and G. L. Kauffman, Jr. (1983). "Aspirin can inhibit gastric mucosal cyclo-oxygenase without causing lesions in rat." Gastroenterology **84**(4): 756-761.
 - Lochhead, P. and A. T. Chan (2013). "Statins and colorectal cancer." Clin Gastroenterol Hepatol **11**(2): 109-118; quiz e113-104.
 - Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
 - Lokeshwar, V. B., T. Habuchi, H. B. Grossman, W. M. Murphy, S. H. Hautmann, G. P. Hemstreet, 3rd, A. V. Bono, R. H. Getzenberg, P. Goebell, B. J. Schmitz-Drager, J. A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing and M. J. Droller (2005). "Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers." Urology **66**(6 Suppl 1): 35-63.
 - Lotan, Y., P. J. Goodman, R. F. Youssef, R. S. Svatek, S. F. Shariat, C. M. Tangen, I. M. Thompson, Jr. and E. A. Klein (2012). "Evaluation of vitamin E and selenium supplementation for the prevention of bladder cancer in SWOG coordinated SELECT." J Urol **187**(6): 2005-2010.
 - Lotan, Y. and C. G. Roehrborn (2003). "Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses." Urology **61**(1): 109-118; discussion 118.
 - Lu, M. L., F. Wikman, T. F. Orntoft, E. Charytonowicz, F. Rabbani, Z. Zhang, G. Dalbagni, K. S. Pohar, G. Yu and C.

- Cordon-Cardo (2002). "Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods." Clin Cancer Res **8**(1): 171-179.
- Lubin, J. H., M. C. Alavanja, N. Caporaso, L. M. Brown, R. C. Brownson, R. W. Field, M. Garcia-Closas, P. Hartge, M. Hauptmann, R. B. Hayes, R. Kleinerman, M. Kogevinas, D. Krewski, B. Langholz, E. G. Letourneau, C. F. Lynch, N. Malats, D. P. Sandler, A. Schaffrath-Rosario, J. B. Schoenberg, D. T. Silverman, Z. Wang, H. E. Wichmann, H. B. Wilcox and J. M. Zielinski (2007). "Cigarette smoking and cancer risk: modeling total exposure and intensity." Am J Epidemiol **166**(4): 479-489.
 - Lubin, J. H., J. Virtamo, S. J. Weinstein and D. Albanes (2008). "Cigarette smoking and cancer: intensity patterns in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study in Finnish men." Am J Epidemiol **167**(8): 970-975.
 - Luo, H., H. Chen, P. Daloz, J. Y. Chang, G. St-Louis and J. Wu (1992). "Inhibition of in vitro immunoglobulin production by rapamycin." Transplantation **53**(5): 1071-1076.
 - Lynch, C. F. and M. B. Cohen (1995). "Urinary system." Cancer **75**(1 Suppl): 316-329.
 - Lynch, C. F., C. E. Platz, M. P. Jones and J. M. Gazzaniga (1991). "Cancer registry problems in classifying invasive bladder cancer." J Natl Cancer Inst **83**(6): 429-433.
 - Ma, Q., G. Lin, Y. Qin, D. Lu, K. Golka, F. Geller, J. Chen and J. Shen (2003). "GSTP1 A1578G (Ile105Val) polymorphism in benzidine-exposed workers: an association with cytological grading of exfoliated urothelial cells." Pharmacogenetics **13**(7): 409-415.
 - Mackie, S. J., D. M. Sharma, A. J. Cooper, N. M. Harris and B. A. Lwaleed (2006). "Meglumine Eicosapentaenoic acid (MeEPA) a new soluble omega-3 fatty acid formulation: in vitro bladder cancer cytotoxicity tests in combination with epirubicin and mitomycin." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(6): 367-373.
 - MacLean, C. H., S. J. Newberry, W. A. Mojica, P. Khanna, A. M. Issa, M. J. Suttorp, Y. W. Lim, S. B. Traina, L. Hilton, R. Garland and S. C. Morton (2006). "Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review." JAMA **295**(4): 403-415.
 - Malmstrom, P. U., R. J. Sylvester, D. E. Crawford, M. Friedrich, S. Krege, E. Rintala, E. Solsona, S. M. Di Stasi and J. A. Witjes (2009). "An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer." Eur Urol **56**(2): 247-256.
 - Manson, J. E., S. S. Bassuk, I. M. Lee, N. R. Cook, M. A. Albert, D. Gordon, E. Zaharris, J. G. Macfadyen, E. Danielson, J. Lin, S. M. Zhang and J. E. Buring (2012). "The VITamin D and OmegA-3 Trial (VITAL): rationale and design of a large randomized controlled trial of vitamin D and marine omega-3 fatty acid supplements for the primary prevention of cancer and cardiovascular disease." Contemp Clin Trials **33**(1): 159-171.
 - Manunta, A., S. Vincendeau, G. Kiriakou, B. Lobel and F. Guille (2005). "Non-transitional cell bladder carcinomas." BJU Int **95**(4): 497-502.
 - Marcus, P. M., R. B. Hayes, P. Vineis, M. Garcia-Closas, N. E. Caporaso, H. Autrup, R. A. Branch, J. Brockmoller, T. Ishizaki, A. E. Karakaya, J. M. Ladero, S. Mommsen, H. Okkels, M. Romkes, I. Roots and N. Rothman (2000). "Cigarette smoking, N-

- acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(5): 461-467.
- Marsh, H. P., N. A. Haldar, M. Bunce, S. E. Marshall, K. le Monier, S. L. Winsey, K. Christodoulos, D. Cranston, K. I. Welsh and A. L. Harris (2003). "Polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF) are associated with risk of bladder cancer and grade of tumour at presentation." Br J Cancer **89**(6): 1096-1101.
 - Marshall, G., C. Ferreccio, Y. Yuan, M. N. Bates, C. Steinmaus, S. Selvin, J. Liaw and A. H. Smith (2007). "Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water." J Natl Cancer Inst **99**(12): 920-928.
 - Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." Genes Dev **14**(6): 627-644.
 - Massaro, M., E. Scoditti, M. A. Carluccio, M. C. Campana and R. De Caterina (2010). "Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: basic mechanisms behind the cardioprotective effects of fish and fish oils." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **56**(1): 59-82.
 - Masui, T., Y. Dong, S. Yamamoto, N. Takada, H. Nakanishi, K. Inada, S. Fukushima and M. Tatematsu (1996). "p53 mutations in transitional cell carcinomas of the urinary bladder in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine." Cancer Lett **105**(1): 105-112.
 - Masuko, T., K. Sugahara, S. Nakajima and Y. Hashimoto (1987). "Altered expression of immunohistochemically detected cytochrome P-450 component(s) in nitrosamine-induced rat urinary bladder lesion." Jpn J Cancer Res **78**(8): 840-845.
 - Masuo, T., S. Okamura, Y. Zhang and M. Mori (2009). "Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen." Cancer Lett **285**(1): 66-72.
 - Mayer, W. J. and W. P. McWhorter (1989). "Black/white differences in non-treatment of bladder cancer patients and implications for survival." Am J Public Health **79**(6): 772-775.
 - Mazdak, H. and H. Zia (2012). "Vitamin e reduces superficial bladder cancer recurrence: a randomized controlled trial." Int J Prev Med **3**(2): 110-115.
 - McClinton, S., L. E. Moffat, D. F. Horrobin and M. S. Manku (1991). "Abnormalities of essential fatty acid distribution in the plasma phospholipids of patients with bladder cancer." Br J Cancer **63**(2): 314-316.
 - McCormack, V. A., A. Agudo, C. C. Dahm, K. Overvad, A. Olsen, A. Tjonneland, R. Kaaks, H. Boeing, J. Manjer, M. Almquist, G. Hallmans, I. Johansson, M. D. Chirlaque, A. Barricarte, M. Dorronsoro, L. Rodriguez, M. L. Redondo, K. T. Khaw, N. Wareham, N. Allen, T. Key, E. Riboli and P. Boffetta (2010). "Cigar and pipe smoking and cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." Int J Cancer **127**(10): 2402-2411.
 - McCormick, D. L., S. S. Ronan, P. J. Becci and R. C. Moon (1981). "Influence of total dose and dose schedule on induction of urinary bladder cancer in the mouse by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine." Carcinogenesis **2**(3): 251-254.
 - McShane, L. M., R. Aamodt, C. Cordon-Cardo, R. Cote, D. Faraggi, Y. Fradet, H. B. Grossman, A. Peng, S. E. Taube and F. M. Waldman (2000). "Reproducibility of p53 immunohistochemistry in

- bladder tumors. National Cancer Institute, Bladder Tumor Marker Network." Clin Cancer Res **6**(5): 1854-1864.
- Melick, W. F., H. M. Escue, J. J. Naryka, R. A. Mezera and E. P. Wheeler (1955). "The first reported cases of human bladder tumors due to a new carcinogen-xenylamine." J Urol **74**(6): 760-766.
 - Melnikov, S., H. Mayan, S. Uchida, E. J. Holtzman and Z. Farfel (2011). "Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system." Eur J Clin Invest **41**(10): 1113-1120.
 - Messing, E. M. (1992). "Growth factors and bladder cancer: clinical implications of the interactions between growth factors and their urothelial receptors." Semin Surg Oncol **8**(5): 285-292.
 - Messing, E. M. and A. Vaillancourt (1990). "Hematuria screening for bladder cancer." J Occup Med **32**(9): 838-845.
 - Mhawech-Fauceglia, P., V. Alvarez, G. Fischer, A. Beck and F. R. Herrmann (2008). "Association of TSC1/hamartin, 14-3-3sigma, and p27 expression with tumor outcomes in patients with pTa/pT1 urothelial bladder carcinoma." Am J Clin Pathol **129**(6): 918-923.
 - Michaud, D. S. (2007). "Chronic inflammation and bladder cancer." Urol Oncol **25**(3): 260-268.
 - Michaud, D. S., P. Pietinen, P. R. Taylor, M. Virtanen, J. Virtamo and D. Albanes (2002). "Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamins A, E, C in relation to the risk of bladder cancer in the ATBC cohort study." Br J Cancer **87**(9): 960-965.
 - Michaud, D. S., D. Spiegelman, S. K. Clinton, E. B. Rimm, G. C. Curhan, W. C. Willett and E. L. Giovannucci (1999). "Fluid intake and the risk of bladder cancer in men." N Engl J Med **340**(18): 1390-1397.
 - Michaud, D. S., D. Spiegelman, S. K. Clinton, E. B. Rimm, W. C. Willett and E. Giovannucci (2000). "Prospective study of dietary supplements, macronutrients, micronutrients, and risk of bladder cancer in US men." Am J Epidemiol **152**(12): 1145-1153.
 - Miller, A. B., T. H. Barclay, N. W. Choi, M. G. Grace, C. Wall, M. Plante, G. R. Howe, B. Cinader and F. G. Davis (1980). "A study of cancer, parity and age at first pregnancy." J Chronic Dis **33**(10): 595-605.
 - Miller, E. R., 3rd, R. Pastor-Barriuso, D. Dalal, R. A. Riemersma, L. J. Appel and E. Guallar (2005). "Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality." Ann Intern Med **142**(1): 37-46.
 - Mitra, A. P., C. C. Bartsch and R. J. Cote (2009). "Strategies for molecular expression profiling in bladder cancer." Cancer Metastasis Rev **28**(3-4): 317-326.
 - Mitra, A. P., M. Birkhahn and R. J. Cote (2007). "p53 and retinoblastoma pathways in bladder cancer." World J Urol **25**(6): 563-571.
 - Mitra, A. P., R. H. Datar and R. J. Cote (2006). "Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification." J Clin Oncol **24**(35): 5552-5564.
 - Mitra, A. P., D. E. Hansel and R. J. Cote (2012). "Prognostic value of cell-cycle regulation biomarkers in bladder cancer." Semin Oncol **39**(5): 524-533.
 - Miyamoto, H., Y. Kubota, T. Shuin, S. Torigoe, Y. Dobashi and M. Hosaka (1995). "Expression of transforming growth factor-beta 1 in human bladder cancer." Cancer **75**(10): 2565-2570.
 - Mo, L., X. Zheng, H. Y. Huang, E. Shapiro, H. Lepor, C. Cordon-Cardo, T. T. Sun and X. R. Wu (2007). "Hyperactivation of Ha-ras

- oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis." J Clin Invest **117**(2): 314-325.
- Mohammed, S. I., D. W. Knapp, D. G. Bostwick, R. S. Foster, K. N. Khan, J. L. Masferrer, B. M. Woerner, P. W. Snyder and A. T. Koki (1999). "Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder." Cancer Res **59**(22): 5647-5650.
 - Molinari, R., D. D'Eliseo, L. Manzi, L. Zolla, F. Velotti and N. Merendino (2011). "The n3-polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid induces immunogenic cell death in human cancer cell lines via pre-apoptotic calreticulin exposure." Cancer Immunol Immunother **60**(10): 1503-1507.
 - Morales, K. H., L. Ryan, T. L. Kuo, M. M. Wu and C. J. Chen (2000). "Risk of internal cancers from arsenic in drinking water." Environ Health Perspect **108**(7): 655-661.
 - Morgan, R. J., Jr., T. W. Synold, D. Gandara, F. Muggia, S. Scudder, E. Reed, K. Margolin, J. Raschko, L. Leong, S. Shibata, M. Tetef, S. Vasilev, K. McGonigle, J. Longmate, Y. Yen, W. Chow, G. Somlo, M. Carroll and J. H. Doroshow (2007). "Phase II trial of carboplatin and infusional cyclosporine with alpha-interferon in recurrent ovarian cancer: a California Cancer Consortium Trial." Int J Gynecol Cancer **17**(2): 373-378.
 - Morgan, R. W. and O. Wong (1985). "A review of epidemiological studies on artificial sweeteners and bladder cancer." Food Chem Toxicol **23**(4-5): 529-533.
 - Mota, A. (2005). "Sirolimus: a new option in transplantation." Expert Opin Pharmacother **6**(3): 479-487.
 - Mowatt, G., S. Zhu, M. Kilonzo, C. Boachie, C. Fraser, T. R. Griffiths, J. N'Dow, G. Nabi, J. Cook and L. Vale (2010). "Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer." Health Technol Assess **14**(4): 1-331, iii-iv.
 - Muellenhoff, M. W. and J. Y. Koo (2012). "Cyclosporine and skin cancer: an international dermatologic perspective over 25 years of experience. A comprehensive review and pursuit to define safe use of cyclosporine in dermatology." J Dermatolog Treat **23**(4): 290-304.
 - Mungan, N. A., K. K. Aben, M. P. Schoenberg, O. Visser, J. W. Coebergh, J. A. Witjes and L. A. Kiemeny (2000). "Gender differences in stage-adjusted bladder cancer survival." Urology **55**(6): 876-880.
 - Murtola, T. J., T. Visakorpi, J. Lahtela, H. Syvala and T. Tammela (2008). "Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions." Nat Clin Pract Urol **5**(7): 376-387.
 - Naesens, M., D. R. Kuypers and M. Sarwal (2009). "Calcineurin inhibitor nephrotoxicity." Clin J Am Soc Nephrol **4**(2): 481-508.
 - Nakanishi, R., N. Oka, H. Nakatsuji, T. Koizumi, M. Sakaki, M. Takahashi, T. Fukumori and H. O. Kanayama (2009). "Effect of vascular endothelial growth factor and its receptor inhibitor on proliferation and invasion in bladder cancer." Urol Int **83**(1): 98-106.
 - Napoli, K. L., M. E. Wang, S. M. Stepkowski and B. D. Kahan (1997). "Distribution of sirolimus in rat tissue." Clin Biochem **30**(2): 135-142.
 - Narayanan, N. K., D. Nargi, L. Horton, B. S. Reddy, M. C. Bosland and B. A. Narayanan (2009). "Inflammatory processes of

- prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: preventive effects of celecoxib." Prostate **69**(2): 133-141.
- Navarro Silvera, S. A. and T. E. Rohan (2007). "Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence." Cancer Causes Control **18**(1): 7-27.
 - Negrete, H. O., J. P. Lavelle, J. Berg, S. A. Lewis and M. L. Zeidel (1996). "Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): F886-894.
 - Negri, E. and C. La Vecchia (2001). "Epidemiology and prevention of bladder cancer." Eur J Cancer Prev **10**(1): 7-14.
 - Newling, D. W., M. R. Robinson, P. H. Smith, D. Byar, R. Lockwood, I. Stevens, M. De Pauw and R. Sylvester (1995). "Tryptophan metabolites, pyridoxine (vitamin B6) and their influence on the recurrence rate of superficial bladder cancer. Results of a prospective, randomised phase III study performed by the EORTC GU Group. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group." Eur Urol **27**(2): 110-116.
 - Nieder, A. M., M. P. Porter and M. S. Soloway (2008). "Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study." J Urol **180**(5): 2005-2009; discussion 2009-2010.
 - Nishikawa, M. (2008). "Reactive oxygen species in tumor metastasis." Cancer Lett **266**(1): 53-59.
 - Norat, T., S. Bingham, P. Ferrari, N. Slimani, M. Jenab, M. Mazuir, K. Overvad, A. Olsen, A. Tjonneland, F. Clavel, M. C. Boutron-Ruault, E. Kesse, H. Boeing, M. M. Bergmann, A. Nieters, J. Linseisen, A. Trichopoulou, D. Trichopoulos, Y. Tountas, F. Berrino, D. Palli, S. Panico, R. Tumino, P. Vineis, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. H. Peeters, D. Engeset, E. Lund, G. Skeie, E. Ardanaz, C. Gonzalez, C. Navarro, J. R. Quiros, M. J. Sanchez, G. Berglund, I. Mattisson, G. Hallmans, R. Palmqvist, N. E. Day, K. T. Khaw, T. J. Key, M. San Joaquin, B. Hemon, R. Saracci, R. Kaaks and E. Riboli (2005). "Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition." J Natl Cancer Inst **97**(12): 906-916.
 - Norrby, K. (1992). "Cyclosporine is angiostatic." Experientia **48**(11-12): 1135-1138.
 - Novara, G., V. De Marco, M. Aragona, R. Boscolo-Berto, S. Cavalleri, W. Artibani and V. Ficarra (2009). "Complications and mortality after radical cystectomy for bladder transitional cell cancer." J Urol **182**(3): 914-921.
 - Nutting, C. M. and R. A. Huddart (2001). "Retinoids in the prevention of bladder cancer." Expert Rev Anticancer Ther **1**(4): 541-545.
 - Oddens, J. R., A. P. van der Meijden and R. Sylvester (2004). "One immediate postoperative instillation of chemotherapy in low risk Ta, T1 bladder cancer patients. Is it always safe?" Eur Urol **46**(3): 336-338.
 - Ohtani, M., T. Kakizoe, Y. Nishio, S. Sato, T. Sugimura, S. Fukushima and T. Niijima (1986). "Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine." Cancer Res **46**(4 Pt 2): 2001-2004.
 - Okajima, E., A. Denda, S. Ozono, M. Takahama, H. Akai, Y. Sasaki, W. Kitayama, K. Wakabayashi and Y. Konishi (1998). "Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary

- bladder carcinomas initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine." Cancer Res **58**(14): 3028-3031.
- Okajima, E., T. Hiramatsu, K. Hirao, M. Ijuin, Y. Hirao, K. Babaya, S. Ikuma, S. Ohara, T. Shiomi, T. Hijioka and H. Ohishi (1981). "Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs." Cancer Res **41**(5): 1958-1966.
 - Oktem, M., I. Esinler, D. Eroglu, N. Haberal, N. Bayraktar and H. B. Zeyneloglu (2007). "High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model." Hum Reprod **22**(5): 1474-1480.
 - Oliveira, M. M., J. C. Teixeira, C. Vasconcelos-Nobrega, L. M. Felix, V. A. Sardao, A. A. Colaco, P. A. Oliveira and F. P. Peixoto (2011). "Mitochondrial and liver oxidative stress alterations induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine: relevance for hepatotoxicity." J Appl Toxicol.
 - Oliveira, P. A., R. Arantes-Rodrigues, C. Sousa-Diniz, A. Colaco, L. Lourenco, L. F. De La Cruz, V. M. Da Silva, J. Afonso, C. Lopes and L. Santos (2009). "The effects of sirolimus on urothelial lesions chemically induced in ICR mice by BBN." Anticancer Res **29**(8): 3221-3226.
 - Oliveira, P. A., A. Colaco, P. L. De la Cruz and C. Lopes (2006). "Experimental bladder carcinogenesis-rodent models." Exp Oncol **28**(1): 2-11.
 - Oosterlinck, W., R. Sylvester, M. Babjuk, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, M. Roupert and T. European Association of Urology Guidelines Committee on Non-Muscle-Invasive Bladder (2011). "Should all patients receive an immediate chemotherapeutic drug instillation after resection of papillary bladder tumors?" Eur Urol **59**(3): 374-376.
 - Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
 - Ouerhani, S. and A. B. Elgaaid (2011). "The mutational spectrum of HRAS, KRAS, NRAS and FGFR3 genes in bladder cancer." Cancer Biomark **10**(6): 259-266.
 - Oyasu, R. (1995). "Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents." Food Chem Toxicol **33**(9): 747-755.
 - Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and J. Galon (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." N Engl J Med **353**(25): 2654-2666.
 - Palou, J., F. Rodriguez-Rubio, J. Huguet, J. Segarra, M. J. Ribal, A. Alcaraz and H. Villavicencio (2005). "Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumor." J Urol **174**(3): 859-861; discussion 861.
 - Palou, J., R. J. Sylvester, O. R. Faba, R. Parada, J. A. Pena, F. Algaba and H. Villavicencio (2012). "Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guerin." Eur Urol **62**(1): 118-125.
 - Panicker, V. V., A. Mathew and A. Dhamramaratnam (2012). "Cosmetically disfiguring side effects of cyclosporine." Int J Trichology **4**(1): 50.
 - Pannek, J. (2002). "Transitional cell carcinoma in patients with spinal cord injury: a high risk malignancy?" Urology **59**(2): 240-244.

-
- Parada, Figueiredo A, Reis F, Dias A, Nunes P, Lemos E, Dinis H, Eufrásio P, Batista S, Teixeira F and M. A (2008). "Effects of Sirolimus on rat urinary bladder carcinogenesis." European Urology Supplements **7**(3): 211.
 - Parada, B., F. A, R. F, N. P, D. A, C. MX, T. F and M. A (2008). "Efeitos do sirolimus num modelo de carcinogénese vesical em ratos." Actas Urológicas Espanolas **32**(6): 13.
 - Parada, B., F. Reis, A. Figueiredo, P. Nunes, E. Teixeira-Lemos, P. Garrido, J. Sereno, R. Pinto, M. F. Cunha, P. Neto, P. Santos, I. Velada, A. Mota and F. Teixeira (2011). "Inhibition of bladder tumour growth by sirolimus in an experimental carcinogenesis model." BJU Int **107**(1): 135-143.
 - Parada, B., F. Reis, A. Pinto, J. Sereno, M. Xavier-Cunha, P. Neto, P. Rocha-Pereira, A. Mota, A. Figueiredo and F. Teixeira (2012). "Chemopreventive Efficacy of Atorvastatin against Nitrosamine-Induced Rat Bladder Cancer: Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Properties." Int J Mol Sci **13**(7): 8482-8499.
 - Patchsung, M., C. Boonla, P. Amnattrakul, T. Dissayabutra, A. Mutirangura and P. Tosukhowong (2012). "Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential." PLoS One **7**(5): e37009.
 - Patel, D. K., L. J. Notarianni and P. N. Bennett (1990). "Comparative metabolism of high doses of aspirin in man and rat." Xenobiotica **20**(8): 847-854.
 - Paulson, S. K., M. B. Vaughn, S. M. Jessen, Y. Lawal, C. J. Gresk, B. Yan, T. J. Maziasz, C. S. Cook and A. Karim (2001). "Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption." J Pharmacol Exp Ther **297**(2): 638-645.
 - Paulson, S. K., J. Y. Zhang, A. P. Breau, J. D. Hribar, N. W. Liu, S. M. Jessen, Y. M. Lawal, J. N. Cogburn, C. J. Gresk, C. S. Markos, T. J. Maziasz, G. L. Schoenhard and E. G. Burton (2000). "Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats." Drug Metab Dispos **28**(5): 514-521.
 - Pelucchi, C., C. Bosetti, E. Negri, M. Malvezzi and C. La Vecchia (2006). "Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer." Nat Clin Pract Urol **3**(6): 327-340.
 - Penn, I. and M. R. First (1986). "Development and incidence of cancer following cyclosporine therapy." Transplant Proc **18**(2 Suppl 1): 210-215.
 - Philips, B. J., C. H. Coyle, S. N. Morrisroe, M. B. Chancellor and N. Yoshimura (2009). "Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins." Biomed Res **30**(4): 207-215.
 - Piette, J., H. Neel and V. Marechal (1997). "Mdm2: keeping p53 under control." Oncogene **15**(9): 1001-1010.
 - Pinheiro, P. S., J. E. Tyczynski, F. Bray, J. Amado, E. Matos and D. M. Parkin (2003). "Cancer incidence and mortality in Portugal." Eur J Cancer **39**(17): 2507-2520.
 - Pinto-Leite, R., P. Botelho, E. Ribeiro, P. A. Oliveira and L. Santos (2009). "Effect of sirolimus on urinary bladder cancer T24 cell line." J Exp Clin Cancer Res **28**: 3.
 - Piper, J. M., J. Tonascia and G. M. Matanoski (1985). "Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years." N Engl J Med **313**(5): 292-295.

-
- Pitard, A., P. Brennan, J. Clavel, E. Greiser, G. Lopez-Abente, J. Chang-Claude, J. Wahrendorf, C. Serra, M. Kogevinas and P. Boffetta (2001). "Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men." Cancer Causes Control **12**(6): 551-556.
 - Planz, B., E. Jochims, T. Deix, H. P. Caspers, G. Jakse and A. Boecking (2005). "The role of urinary cytology for detection of bladder cancer." Eur J Surg Oncol **31**(3): 304-308.
 - Plna, K. and K. Hemminki (2001). "Familial bladder cancer in the National Swedish Family Cancer Database." J Urol **166**(6): 2129-2133.
 - Podder, H., S. M. Stepkowski, K. L. Napoli, J. Clark, R. R. Verani, T. C. Chou and B. D. Kahan (2001). "Pharmacokinetic interactions augment toxicities of sirolimus/cyclosporine combinations." J Am Soc Nephrol **12**(5): 1059-1071.
 - Popov, Z., S. Gil-Diez-De-Medina, V. Ravery, A. Hoznek, S. Bastuji-Garin, M. A. Lefrere-Belda, C. C. Abbou and D. K. Chopin (2004). "Prognostic value of EGF receptor and tumor cell proliferation in bladder cancer: therapeutic implications." Urol Oncol **22**(2): 93-101.
 - Poynter, J. N., S. B. Gruber, P. D. Higgins, R. Almog, J. D. Bonner, H. S. Rennert, M. Low, J. K. Greenson and G. Rennert (2005). "Statins and the risk of colorectal cancer." N Engl J Med **352**(21): 2184-2192.
 - Preston, D. L., E. Ron, S. Tokuoka, S. Funamoto, N. Nishi, M. Soda, K. Mabuchi and K. Kodama (2007). "Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998." Radiat Res **168**(1): 1-64.
 - Prout, G. R., Jr., M. N. Wesley, P. G. McCarron, V. W. Chen, R. S. Greenberg, R. M. Mayberry and B. K. Edwards (2004). "Survival experience of black patients and white patients with bladder carcinoma." Cancer **100**(3): 621-630.
 - Provenzano, A., S. Kurian and J. Abraham (2013). "Overcoming endocrine resistance in breast cancer: role of the PI3K and the mTOR pathways." Expert Rev Anticancer Ther **13**(2): 143-147.
 - Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka and D. Bar-Sagi (2011). "RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web." Nat Rev Cancer **11**(11): 761-774.
 - Qin, J., B. Xie, Q. Mao, D. Kong, Y. Lin and X. Zheng (2012). "Tea consumption and risk of bladder cancer: a meta-analysis." World J Surg Oncol **10**: 172.
 - Qin, J., L. P. Xie, X. Y. Zheng, Y. B. Wang, Y. Bai, H. F. Shen, L. C. Li and R. Dahiya (2007). "A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins." Biochem Biophys Res Commun **354**(4): 852-857.
 - Quist-Paulsen, P. (2010). "Statins and inflammation: an update." Curr Opin Cardiol **25**(4): 399-405.
 - Raghavan, D., F. Debruyne, H. Herr, D. Jocham, T. Kakizoe, E. Okajima, A. Sandberg and I. Tannock (1986). "Experimental models of bladder cancer: a critical review." Prog Clin Biol Res **221**: 171-208.
 - Rathinam, R., A. Berrier and S. K. Alahari (2011). "Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression." Front Biosci **16**: 2561-2571.
 - Ravoori, S., Y. Feng, J. R. Neale, J. Jeyabalan, C. Srinivasan, D. W. Hein and R. C. Gupta (2008). "Dose-dependent reduction of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-derived DNA adducts in colon and

- liver of rats administered celecoxib." Mutat Res **638**(1-2): 103-109.
- Readal, N. and J. I. Epstein (2010). "Papillary urothelial hyperplasia: relationship to urothelial neoplasms." Pathology **42**(4): 360-363.
 - Reid, L. M., I. Leav, P. W. Kwan, P. Russell and F. B. Merk (1984). "Characterization of a human, sex steroid-responsive transitional cell carcinoma maintained as a tumor line (R198) in athymic nude mice." Cancer Res **44**(10): 4560-4573.
 - Reiman, J. M., M. Kmiecik, M. H. Manjili and K. L. Knutson (2007). "Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression." Semin Cancer Biol **17**(4): 275-287.
 - Reis, F., B. Parada, E. Teixeira de Lemos, P. Garrido, A. Dias, N. Piloto, S. Baptista, J. Sereno, P. Eufrazio, E. Costa, P. Rocha-Pereira, A. Santos-Silva, A. Figueiredo, A. Mota and F. Teixeira (2009). "Hypertension induced by immunosuppressive drugs: a comparative analysis between sirolimus and cyclosporine." Transplant Proc **41**(3): 868-873.
 - Risch, A., D. M. Wallace, S. Bathers and E. Sim (1995). "Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer." Hum Mol Genet **4**(2): 231-236.
 - Robb, V. A., M. Karbowniczek, A. J. Klein-Szanto and E. P. Henske (2007). "Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma." J Urol **177**(1): 346-352.
 - Romanenko, A., K. Morimura, H. Wanibuchi, E. I. Salim, A. Kinoshita, M. Kaneko, A. Vozianov and S. Fukushima (2000). "Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident." Int J Cancer **86**(6): 790-798.
 - Roomi, M. W., V. Ivanov, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki and M. Rath (2006). "Antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, and green tea extract on bladder cancer cell line T-24." Int J Urol **13**(4): 415-419.
 - Ros, M. M., M. Gago-Dominguez, K. K. Aben, H. B. Bueno-de-Mesquita, E. Kampman, S. H. Vermeulen and L. A. Kiemeny (2012). "Personal hair dye use and the risk of bladder cancer: a case-control study from The Netherlands." Cancer Causes Control **23**(7): 1139-1148.
 - Rosenberg, L., C. Louik and S. Shapiro (1998). "Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma." Cancer **82**(12): 2326-2333.
 - Rosenblatt, R., S. Jonmarker, R. Lewensohn, L. Egevad, A. Sherif, K. M. Kalkner, S. Nilsson, A. Valdman and A. Ullen (2008). "Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer." Tumour Biol **29**(5): 311-322.
 - Roth, E. M. and W. S. Harris (2010). "Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease." Curr Atheroscler Rep **12**(1): 66-72.
 - Roudnicky, F., C. Poyet, P. Wild, S. Krampitz, F. Negrini, R. Huggenberger, A. Rogler, R. Stohr, A. Hartmann, M. Provenzano, V. I. Otto and M. Detmar (2013). "Endocan Is Upregulated on Tumor Vessels in Invasive Bladder Cancer Where It Mediates VEGF-A-Induced Angiogenesis." Cancer Res.
 - Ryffel, B. (1992). "The carcinogenicity of ciclosporin." Toxicology **73**(1): 1-22.
 - Sabichi, A. L., J. J. Lee, H. B. Grossman, S. Liu, E. Richmond, B. A. Czerniak, J. De la Cerda, C. Eagle, J. L. Viner, J. L.

- Palmer and S. P. Lerner (2011). "A randomized controlled trial of celecoxib to prevent recurrence of nonmuscle-invasive bladder cancer." Cancer Prev Res (Phila) **4**(10): 1580-1589.
- Sagara, Y., Y. Miyata, K. Nomata, T. Hayashi and H. Kanetake (2010). "Green tea polyphenol suppresses tumor invasion and angiogenesis in N-butyl-(-4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer." Cancer Epidemiol **34**(3): 350-354.
 - Sakai, M., H. Miyake, S. Tashiro, Y. Okumura and H. Kido (2004). "Inhibitory effect of FK506 and cyclosporine A on the growth and invasion of human liver cancer cells." J Med Invest **51**(1-2): 63-69.
 - Sala, M., S. Cordier, J. Chang-Claude, F. Donato, A. Escobar-Pujolar, F. Fernandez, C. A. Gonzalez, E. Greiser, K. H. Jockel, E. Lynge, A. Mannetje, H. Pohlmann, S. Porru, C. Serra, A. Tzonou, P. Vineis, J. Wahrendorf, P. Boffetta and M. Kogevinas (2000). "Coffee consumption and bladder cancer in nonsmokers: a pooled analysis of case-control studies in European countries." Cancer Causes Control **11**(10): 925-931.
 - Salem, H. K. and S. Mahfouz (2012). "Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade." Urology **79**(2): 379-383.
 - Salvado, M. D., A. Alfranca, J. Z. Haeggstrom and J. M. Redondo (2012). "Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2." Trends Mol Med **18**(4): 233-243.
 - Samanic, C., M. Kogevinas, M. Dosemeci, N. Malats, F. X. Real, M. Garcia-Closas, C. Serra, A. Carrato, R. Garcia-Closas, M. Sala, J. Lloreta, A. Tardon, N. Rothman and D. T. Silverman (2006). "Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(7): 1348-1354.
 - Saravanan, P., N. C. Davidson, E. B. Schmidt and P. C. Calder (2010). "Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids." Lancet **376**(9740): 540-550.
 - Sarisozen, C., I. Vural, T. Levchenko, A. A. Hincal and V. P. Torchilin (2012). "PEG-PE-based micelles co-loaded with paclitaxel and cyclosporine A or loaded with paclitaxel and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells." Drug Deliv **19**(4): 169-176.
 - Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old and K. Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-18543.
 - Saunders, R. N., M. S. Metcalfe and M. L. Nicholson (2001). "Rapamycin in transplantation: a review of the evidence." Kidney Int **59**(1): 3-16.
 - Sauter G, A. F., Amin M, et al. , S. G. In: Eble JN, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumours of and t. u. s. a. m. g. organs (2004). "Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias." In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, 2004, pp. 29-34.: 29-34.
 - Saydjari, R., C. M. Townsend, Jr., S. C. Barranco and J. C. Thompson (1988). "Differential sensitivity of pancreatic and

- colon cancer to cyclosporine and alpha-difluoromethylornithine in vivo." Invest New Drugs **6**(4): 265-272.
- Schairer, C., P. Hartge, R. N. Hoover and D. T. Silverman (1988). "Racial differences in bladder cancer risk: a case-control study." Am J Epidemiol **128**(5): 1027-1037.
 - Schmechel, A., M. Grimm, A. El-Armouche, G. Hoppner, A. P. Schwoerer, H. Ehmke and T. Eschenhagen (2009). "Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects." Cardiovasc Res **82**(1): 100-106.
 - Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.
 - Schonbeck, U. and P. Libby (2004). "Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents?" Circulation **109**(21 Suppl 1): III18-26.
 - Sehgal, S. N. (1998). "Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression." Clin Biochem **31**(5): 335-340.
 - Sehgal, S. N. (2003). "Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action." Transplant Proc **35**(3 Suppl): 7S-14S.
 - Sereno, J., A. M. Romao, B. Parada, P. Lopes, E. Carvalho, F. Teixeira and F. Reis (2012). "Cardiorenal benefits of early versus late cyclosporine to sirolimus conversion in a rat model." J Pharmacol Pharmacother **3**(2): 143-148.
 - Shah, G., F. A. Middleton, K. L. Gentile, S. Tripathi, D. Bruch, K. G. Maier and D. S. Kittur (2008). "Cyclosporine inhibition of angiogenesis involves the transcription factor HESR1." J Surg Res **149**(2): 171-176.
 - Shahbazian, D., J. Sznol and H. M. Kluger (2012). "Vertical pathway targeting in cancer therapy." Adv Pharmacol **65**: 1-26.
 - Shannon, J., S. Tewoderos, M. Garzotto, T. M. Beer, R. Derenick, A. Palma and P. E. Farris (2005). "Statins and prostate cancer risk: a case-control study." Am J Epidemiol **162**(4): 318-325.
 - Shariat, S. F., C. Bolenz, P. I. Karakiewicz, Y. Fradet, R. Ashfaq, P. J. Bastian, M. E. Nielsen, U. Capitanio, C. Jeldres, J. Rigaud, S. C. Muller, S. P. Lerner, F. Montorsi, A. I. Sagalowsky, R. J. Cote and Y. Lotan (2010). "p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder." BJU Int **105**(4): 489-495.
 - Shariat, S. F., H. Tokunaga, J. Zhou, J. Kim, G. E. Ayala, W. F. Benedict and S. P. Lerner (2004). "p53, p21, pRB, and p16 expression predict clinical outcome in cystectomy with bladder cancer." J Clin Oncol **22**(6): 1014-1024.
 - Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2005). "Cancer: crime and punishment." Nature **436**(7051): 636-637.
 - Shaw, K. T., A. M. Ho, A. Raghavan, J. Kim, J. Jain, J. Park, S. Sharma, A. Rao and P. G. Hogan (1995). "Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11205-11209.
 - Shaw, L. M. (1989). "Advances in cyclosporine pharmacology, measurement, and therapeutic monitoring." Clin Chem **35**(7): 1299-1308.
 - Sheppard, K., K. M. Kinross, B. Solomon, R. B. Pearson and W. A. Phillips (2012). "Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer." Crit Rev Oncog **17**(1): 69-95.
 - Sherif, A., M. N. Hasan, P. Marits, M. Karlsson, O. Winqvist and M. Thorn (2010). "Feasibility of T-cell-based adoptive

- immunotherapy in the first 12 patients with advanced urothelial urinary bladder cancer. Preliminary data on a new immunologic treatment based on the sentinel node concept." Eur Urol **58**(1): 105-111.
- Sherif, A., L. Holmberg, E. Rintala, O. Mestad, J. Nilsson, S. Nilsson, P. U. Malmstrom and G. Nordic Urothelial Cancer (2004). "Neoadjuvant cisplatinum based combination chemotherapy in patients with invasive bladder cancer: a combined analysis of two Nordic studies." Eur Urol **45**(3): 297-303.
 - Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 731-737.
 - Shimazui, T., Y. Ami, N. Miyanaga, Y. Ideyama, T. Nakahara and H. Akaza (2002). "Telomerase is upregulated in irreversible preneoplastic lesions during bladder carcinogenesis in rats." Jpn J Cancer Res **93**(5): 495-500.
 - Sievert, K. D., B. Amend, U. Nagele, D. Schilling, J. Bedke, M. Horstmann, J. Hennenlotter, S. Kruck and A. Stenzl (2009). "Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?" World J Urol **27**(3): 295-300.
 - Simon, R., E. Eltze, K. L. Schafer, H. Burger, A. Semjonow, L. Hertle, B. Dockhorn-Dworniczak, H. J. Terpe and W. Bocker (2001). "Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells." Cancer Res **61**(1): 355-362.
 - Singh, A. V., A. A. Franke, G. L. Blackburn and J. R. Zhou (2006). "Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis." Cancer Res **66**(3): 1851-1858.
 - Singh, B., J. A. Berry, A. Shoher, V. Ramakrishnan and A. Lucci (2005). "COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells." Int J Oncol **26**(5): 1393-1399.
 - Snow, E. T., P. Sykora, T. R. Durham and C. B. Klein (2005). "Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses: what are the implications for low dose cancer risk?" Toxicol Appl Pharmacol **207**(2 Suppl): 557-564.
 - Sobin LH, G. M., Wittekind C (eds) (2009). "TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer." 262-265.
 - Solomon, K. R. and M. R. Freeman (2008). "Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?" Trends Endocrinol Metab **19**(4): 113-121.
 - Sontag, J. M. (1980). "Experimental identification of genitourinary carcinogens." Urol Clin North Am **7**(3): 803-814.
 - Spiess, P. E. and B. Czerniak (2006). "Dual-track pathway of bladder carcinogenesis: practical implications." Arch Pathol Lab Med **130**(6): 844-852.
 - Spyridopoulos, I., J. Haendeler, C. Urbich, T. H. Brummendorf, H. Oh, M. D. Schneider, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004). "Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells." Circulation **110**(19): 3136-3142.
 - Steenland, K. and S. Palu (1999). "Cohort mortality study of 57,000 painters and other union members: a 15 year update." Occup Environ Med **56**(5): 315-321.
 - Stein, J. P., G. Lieskovsky, R. Cote, S. Groshen, A. C. Feng, S. Boyd, E. Skinner, B. Bochner, D. Thangathurai, M. Mikhail, D. Raghavan and D. G. Skinner (2001). "Radical cystectomy in the

- treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients." J Clin Oncol **19**(3): 666-675.
- Steinmaus, C., Y. Yuan, M. N. Bates and A. H. Smith (2003). "Case-control study of bladder cancer and drinking water arsenic in the western United States." Am J Epidemiol **158**(12): 1193-1201.
 - Stenzl, A., N. C. Cowan, M. De Santis, M. A. Kuczyk, A. S. Merseburger, M. J. Ribal, A. Sherif, J. A. Witjes and U. European Association of (2011). "Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines." Eur Urol **59**(6): 1009-1018.
 - Stephenson, T. J., L. Henry, S. C. Harris, D. D. Giri, M. Fox and J. C. Underwood (1989). "Pseudomembranous trigonitis of the bladder: hormonal aetiology." J Clin Pathol **42**(9): 922-926.
 - Stepkowski, S. M. (2003). "Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models." Transplant Proc **35**(3 Suppl): 219S-226S.
 - Su, C. C., J. L. Lu, K. Y. Tsai and B. Lian Ie (2011). "Reduction in arsenic intake from water has different impacts on lung cancer and bladder cancer in an arseniasis endemic area in Taiwan." Cancer Causes Control **22**(1): 101-108.
 - Subbaramaiah, K. and A. J. Dannenberg (2003). "Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment." Trends Pharmacol Sci **24**(2): 96-102.
 - Subramonian, K., R. A. Cartwright, P. Harnden and S. C. Harrison (2004). "Bladder cancer in patients with spinal cord injuries." BJU Int **93**(6): 739-743.
 - Sun, C. L., J. M. Yuan, K. Arakawa, S. H. Low, H. P. Lee and M. C. Yu (2002). "Dietary soy and increased risk of bladder cancer: the Singapore Chinese Health Study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(12): 1674-1677.
 - Sun, C. L., J. M. Yuan, X. L. Wang, Y. T. Gao, R. K. Ross and M. C. Yu (2004). "Dietary soy and increased risk of bladder cancer: a prospective cohort study of men in Shanghai, China." Int J Cancer **112**(2): 319-323.
 - Suttman, H., M. Jacobsen, K. Reiss, D. Jocham, A. Bohle and S. Brandau (2004). "Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation." J Urol **172**(4 Pt 1): 1490-1495.
 - Svatek, R. S., M. B. Fisher, S. F. Matin, A. M. Kamat, H. B. Grossman, G. M. Nogueras-Gonzalez, D. L. Urbauer, K. A. Kennedy and C. P. Dinney (2010). "Risk factor analysis in a contemporary cystectomy cohort using standardized reporting methodology and adverse event criteria." J Urol **183**(3): 929-934.
 - Sylvester, R. J. (2009). "Bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for the treatment of intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer: the debate continues." Eur Urol **56**(2): 266-268; discussion 268-269.
 - Sylvester, R. J., W. Oosterlinck and A. P. van der Meijden (2004). "A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials." J Urol **171**(6 Pt 1): 2186-2190, quiz 2435.
 - Sylvester, R. J., W. Oosterlinck and J. A. Witjes (2008). "The schedule and duration of intravesical chemotherapy in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review of the published results of randomized clinical trials." Eur Urol **53**(4): 709-719.

-
- Sylvester, R. J., M. A. van der and D. L. Lamm (2002). "Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials." J Urol **168**(5): 1964-1970.
 - Sylvester, R. J., A. P. van der Meijden, W. Oosterlinck, J. A. Witjes, C. Bouffloux, L. Denis, D. W. Newling and K. Kurth (2006). "Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials." Eur Urol **49**(3): 466-465; discussion 475-467.
 - Takahashi, C., N. Sasaki and S. Kitajima (2012). "Twists in views on RB functions in cellular signaling, metabolism and stem cells." Cancer Sci.
 - Tan, M., X. Song, G. Zhang, A. Peng, X. Li, M. Li, Y. Liu and C. Wang (2013). "Statins and the risk of lung cancer: a meta-analysis." PLoS One **8**(2): e57349.
 - Tanaka, T., K. Miyazawa, T. Tsukamoto, T. Kuno and K. Suzuki (2011). "Pathobiology and chemoprevention of bladder cancer." J Oncol **2011**: 528353.
 - Tang, L., G. R. Zirpoli, K. Guru, K. B. Moysich, Y. Zhang, C. B. Ambrosone and S. E. McCann (2010). "Intake of cruciferous vegetables modifies bladder cancer survival." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(7): 1806-1811.
 - Taylor, J. A., D. M. Umbach, E. Stephens, T. Castranio, D. Paulson, C. Robertson, J. L. Mohler and D. A. Bell (1998). "The role of N-acetylation polymorphisms in smoking-associated bladder cancer: evidence of a gene-gene-exposure three-way interaction." Cancer Res **58**(16): 3603-3610.
 - Tedesco, D. and L. Haragsim (2012). "Cyclosporine: a review." J Transplant **2012**: 230386.
 - Theodoropoulos, V. E., A. Lazaris, F. Sofras, I. Gerzelis, V. Tsoukala, I. Ghikonti, K. Manikas and I. Kastriotis (2004). "Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer." Eur Urol **46**(2): 200-208.
 - Tilki, D., M. Burger, G. Dalbagni, H. B. Grossman, O. W. Hakenberg, J. Palou, O. Reich, M. Roupert, S. F. Shariat and A. R. Zlotta (2011). "Urine markers for detection and surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer." Eur Urol **60**(3): 484-492.
 - Tjon, A. S., J. Sint Nicolaas, J. Kwekkeboom, R. A. de Man, G. Kazemier, H. W. Tilanus, B. E. Hansen, L. J. van der Laan, T. Tha-In and H. J. Metselaar (2010). "Increased incidence of early de novo cancer in liver graft recipients treated with cyclosporine: an association with C2 monitoring and recipient age." Liver Transpl **16**(7): 837-846.
 - Torre-Amione, G., R. D. Beauchamp, H. Koeppen, B. H. Park, H. Schreiber, H. L. Moses and D. A. Rowley (1990). "A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1486-1490.
 - Travis, L. B., R. E. Curtis, B. Glimelius, E. J. Holowaty, F. E. Van Leeuwen, C. F. Lynch, A. Hagenbeek, M. Stovall, P. M. Banks, J. Adami and et al. (1995). "Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma." J Natl Cancer Inst **87**(7): 524-530.
 - Trepanier, D. J., H. Gallant, D. F. Legatt and R. W. Yatscoff (1998). "Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and

- therapeutic range investigations: an update." Clin Biochem **31**(5): 345-351.
- Tricker, A. R., M. H. Mostafa, B. Spiegelhalder and R. Preussmann (1991). "Urinary nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in bladder cancer patients with schistosomiasis (bilharzia)." IARC Sci Publ(105): 178-181.
 - Trifan, O. C. and T. Hla (2003). "Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis." J Cell Mol Med **7**(3): 207-222.
 - Uchida, A., H. Yonou, E. Hayashi, K. Iha, M. Oda, M. Miyazato, Y. Oshiro, S. Hokama, K. Sugaya and Y. Ogawa (2007). "Intravesical instillation of bacille Calmette-Guerin for superficial bladder cancer: cost-effectiveness analysis." Urology **69**(2): 275-279.
 - Valera, V. A., B. A. Walter, N. Yokoyama, Y. Koyama, T. Iiai, H. Okamoto and K. Hatakeyama (2007). "Prognostic groups in colorectal carcinoma patients based on tumor cell proliferation and classification and regression tree (CART) survival analysis." Ann Surg Oncol **14**(1): 34-40.
 - van der Horst, G., L. Bos and G. van der Pluijm (2012). "Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma." Mol Cancer Res **10**(8): 995-1009.
 - van Rhijn, B. W., T. H. van der Kwast, A. N. Vis, W. J. Kirkels, E. R. Boeve, A. C. Jobsis and E. C. Zwarthoff (2004). "FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma." Cancer Res **64**(6): 1911-1914.
 - Vecchio, A. J., D. M. Simmons and M. G. Malkowski (2010). "Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2." J Biol Chem **285**(29): 22152-22163.
 - Veltman, J. D., M. E. Lambers, M. van Nimwegen, R. W. Hendriks, H. C. Hoogsteden, J. G. Aerts and J. P. Hegmans (2010). "COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function." BMC Cancer **10**: 464.
 - Vezina, C., A. Kudelski and S. N. Sehgal (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 721-726.
 - Vignot, S., S. Faivre, D. Aguirre and E. Raymond (2005). "mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives." Ann Oncol **16**(4): 525-537.
 - Villanueva, C. M., D. T. Silverman, C. Murta-Nascimento, N. Malats, M. Garcia-Closas, F. Castro, A. Tardon, R. Garcia-Closas, C. Serra, A. Carrato, N. Rothman, F. X. Real, M. Dosemeci and M. Kogevinas (2009). "Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk." Cancer Causes Control **20**(1): 121-127.
 - Vineis, P. and L. Simonato (1991). "Proportion of lung and bladder cancers in males resulting from occupation: a systematic approach." Arch Environ Health **46**(1): 6-15.
 - Vinogradova, Y., C. Coupland and J. Hippisley-Cox (2011). "Exposure to statins and risk of common cancers: a series of nested case-control studies." BMC Cancer **11**: 409.
 - Visnjar, T., P. Kocbek and M. E. Kreft (2012). "Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and

- maintaining high transepithelial resistance." Histochem Cell Biol **137**(2): 177-186.
- Vlaovic, P. and M. A. Jewett (1999). "Cyclophosphamide-induced bladder cancer." Can J Urol **6**(2): 745-748.
 - Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-310.
 - Volm, T., P. Pfaff, R. Gnann and R. Kreienberg (2001). "Bladder carcinoma associated with cyclophosphamide therapy for ovarian cancer occurring with a latency of 20 years." Gynecol Oncol **82**(1): 197-199.
 - Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 275-283.
 - Wagner, O., E. Schreier, F. Heitz and G. Maurer (1987). "Tissue distribution, disposition, and metabolism of cyclosporine in rats." Drug Metab Dispos **15**(3): 377-383.
 - Wan, X. and L. J. Helman (2007). "The biology behind mTOR inhibition in sarcoma." Oncologist **12**(8): 1007-1018.
 - Wang, I. K., S. Y. Lin-Shiau and J. K. Lin (2000). "Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells." Pharmacol Toxicol **86**(2): 83-91.
 - Wang, X., Y. W. Lin, S. Wang, J. Wu, Q. Q. Mao, X. Y. Zheng and L. P. Xie (2012). "A Meta-Analysis of Tea Consumption and the Risk of Bladder Cancer." Urol Int.
 - Wassef, R., Z. Cohen and B. Langer (1985). "Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage." Transplantation **40**(5): 489-493.
 - Wassmann, S., U. Laufs, K. Muller, C. Konkol, K. Ahlbory, A. T. Baumer, W. Linz, M. Bohm and G. Nickenig (2002). "Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(2): 300-305.
 - Wei, H., A. Kamat, M. Chen, H. L. Ke, D. W. Chang, J. Yin, H. B. Grossman, C. P. Dinney and X. Wu (2012). "Association of polymorphisms in oxidative stress genes with clinical outcomes for bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin." PLoS One **7**(6): e38533.
 - Weijenberg, M. P., L. A. Hughes, M. J. Bours, C. C. Simons, M. van Engeland and P. A. van den Brandt (2013). "The mTOR Pathway and the Role of Energy Balance Throughout Life in Colorectal Cancer Etiology and Prognosis: Unravelling Mechanisms Through a Multidimensional Molecular Epidemiologic Approach." Curr Nutr Rep **2**(1): 19-26.
 - Weis, M., C. Heeschen, A. J. Glassford and J. P. Cooke (2002). "Statins have biphasic effects on angiogenesis." Circulation **105**(6): 739-745.
 - Wendel, M. and A. R. Heller (2009). "Anticancer actions of omega-3 fatty acids--current state and future perspectives." Anticancer Agents Med Chem **9**(4): 457-470.
 - White, C. (1909). "On the occurrence of crystals in tumours." J. Pathol. Bacteriol. **13**: 3-10.
 - Wientjes, M. G. and G. Levy (1988). "Nonlinear pharmacokinetics of aspirin in rats." J Pharmacol Exp Ther **245**(3): 809-815.
 - Williams, C. S., M. Mann and R. N. DuBois (1999). "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development." Oncogene **18**(55): 7908-7916.
 - Woodburne, R. T. (1968). "Anatomy of the bladder and bladder outlet." J Urol **100**(4): 474-487.

- Wu, J. W., A. J. Cross, D. Baris, M. H. Ward, M. R. Karagas, A. Johnson, M. Schwenn, S. Cherala, J. S. Colt, K. P. Cantor, N. Rothman, D. T. Silverman and R. Sinha (2012). "Dietary intake of meat, fruits, vegetables, and selective micronutrients and risk of bladder cancer in the New England region of the United States." Br J Cancer **106**(11): 1891-1898.
- Wu, X., T. Obata, Q. Khan, R. A. Highshaw, R. De Vere White and C. Sweeney (2004). "The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion." BJU Int **93**(1): 143-150.
- Wu, X. R. (2005). "Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways." Nat Rev Cancer **5**(9): 713-725.
- Wu, X. R. (2009). "Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice." Cancer Metastasis Rev **28**(3-4): 281-290.
- Wu, X. R., X. P. Kong, A. Pellicer, G. Kreibich and T. T. Sun (2009). "Uroplakins in urothelial biology, function, and disease." Kidney Int **75**(11): 1153-1165.
- Xiao, Z., T. J. McCallum, K. M. Brown, G. G. Miller, S. B. Halls, I. Parney and R. B. Moore (1999). "Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model." Br J Cancer **81**(4): 638-646.
- Yang, H., J. Gu, X. Lin, H. B. Grossman, Y. Ye, C. P. Dinney and X. Wu (2008). "Profiling of genetic variations in inflammation pathway genes in relation to bladder cancer predisposition." Clin Cancer Res **14**(7): 2236-2244.
- Yasui, Y., R. Suzuki, S. Miyamoto, T. Tsukamoto, S. Sugie, H. Kohno and T. Tanaka (2007). "A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis." Int J Cancer **121**(10): 2331-2339.
- Yatscoff, R. W. (1996). "Pharmacokinetics of rapamycin." Transplant Proc **28**(2): 970-973.
- Ye, D. W., J. F. Zheng, S. X. Qian and Y. J. Ma (1993). "Correlation between the expression of oncogenes ras and c-erbB-2 and the biological behavior of bladder tumors." Urol Res **21**(1): 39-43.
- Yee, D. S., N. M. Ishill, W. T. Lowrance, H. W. Herr and E. B. Elkin (2011). "Ethnic differences in bladder cancer survival." Urology **78**(3): 544-549.
- Yeh, K. Y., H. M. Wang, J. W. Chang, J. S. Huang, C. H. Lai, Y. J. Lan, T. H. Wu, P. H. Chang, H. Wang, C. J. Wu, S. Hsia and C. H. Wang (2013). "Omega-3 fatty acid-, micronutrient-, and probiotic-enriched nutrition helps body weight stabilization in head and neck cancer cachexia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.
- Youssef, R., P. Kapur, W. Kabbani, S. F. Shariat, A. Mosbah, H. Abol-Enein, M. Ghoniem and Y. Lotan (2011). "Bilharzial vs non-bilharzial related bladder cancer: pathological characteristics and value of cyclooxygenase-2 expression." BJU Int **108**(1): 31-37.
- Yu, K., L. Toral-Barza, C. Discafani, W. G. Zhang, J. Skotnicki, P. Frost and J. J. Gibbons (2001). "mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer." Endocr Relat Cancer **8**(3): 249-258.
- Yu, M. C., R. K. Ross, K. K. Chan, B. E. Henderson, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum and G. A. Coetzee (1995). "Glutathione S-transferase M1 genotype affects aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels in white, black and Asian smokers and nonsmokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(8): 861-864.

-
- Yu, M. C., P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, K. K. Chan and R. K. Ross (2002). "Arylamine exposures and bladder cancer risk." Mutat Res **506-507**: 21-28.
 - Zeegers, M. P., R. A. Goldbohm and P. A. van den Brandt (2001). "Are retinol, vitamin C, vitamin E, folate and carotenoids intake associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study." Br J Cancer **85**(7): 977-983.
 - Zeegers, M. P., R. A. Goldbohm and P. A. van den Brandt (2002). "A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands)." Cancer Causes Control **13**(1): 83-90.
 - Zeegers, M. P., E. Kellen, F. Buntinx and P. A. van den Brandt (2004). "The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review." World J Urol **21**(6): 392-401.
 - Zhang, H. P., B. Yu, X. D. Zheng, H. J. Hu, Z. B. Gao, L. Li and L. F. Zhou (2008). "[Expressions of MMP-2 and COX-2 mRNA in bladder transitional cell carcinoma and their correlation]." Zhonghua Nan Ke Xue **14**(11): 1011-1014.
 - Zhang, W., Y. B. Xiang, R. R. Fang, J. R. Cheng, J. M. Yuan and Y. T. Gao (2010). "[Total fluid intake, urination frequency and risk of bladder cancer: a population-based case-control study in urban Shanghai]." Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi **31**(10): 1120-1124.
 - Zhang, X. L., J. Geng, X. P. Zhang, B. Peng, J. P. Che, Y. Yan, G. C. Wang, S. Q. Xia, Y. Wu and J. H. Zheng (2013). "Statin use and risk of bladder cancer: a meta-analysis." Cancer Causes Control **24**(4): 769-776.
 - Zhang, Z. T., J. Pak, H. Y. Huang, E. Shapiro, T. T. Sun, A. Pellicer and X. R. Wu (2001). "Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation." Oncogene **20**(16): 1973-1980.
 - Zheng, T., K. P. Cantor, Y. Zhang and C. F. Lynch (2002). "Occupation and bladder cancer: a population-based, case-control study in Iowa." J Occup Environ Med **44**(7): 685-691.
 - Zhou, J., S. Smith, E. Giovannucci and D. S. Michaud (2012). "Reexamination of total fluid intake and bladder cancer in the Health Professionals Follow-up Study Cohort." Am J Epidemiol **175**(7): 696-705.
 - Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." Nat Rev Immunol **6**(10): 715-727.
 - Zou, C., M. Liebert, C. Zou, H. B. Grossman and R. Lotan (2001). "Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells." J Urol **165**(3): 986-992.
 - Zu, X., Z. Tang, Y. Li, N. Gao, J. Ding and L. Qi (2006). "Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis." BJU Int **98**(5): 1090-1093.
 - Zwanenburg, T. S. and A. Cordier (1994). "No cyclosporin-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes in vitro." Mutat Res **320**(3): 217-221.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Classificação TNM do cancro da bexiga (Sobin LH 2009)

T	Tumor primário
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma in situ: "tumor plano"
T1	Tumor invade o tecido conjuntivo sub-epitelial
T2	Tumor invade o músculo
T2a	Tumor invade o músculo superficial (metade interna)
T2b	Tumor invade o músculo profundo (metade externa)
T3	Tumor invade os tecidos perivesicais
T3a	Microscopicamente
T3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor invade qualquer uma das seguintes estruturas:
T4a	Próstata, útero, vagina
T4b	Parede pélvica ou parede abdominal
N	Gânglios linfáticos
NX	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases num único gânglio linfático nas cadeias pélvicas (cadeia hipogástrica, obturadora, ilíaca externa ou pré-sagrada)
N2	Metástases em múltiplos gânglios linfáticos nas cadeias pélvicas (cadeia hipogástrica, obturadora, ilíaca externa ou pré-sagrada)
N3	Metástases em gânglio(s) ilíaco(s) comum(s)
M	Metástases à distância
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Sem Metástases à distância
M1	Com Metástases à distância

.....
APÊNDICE 2: Classificação dos tumores uroteliais pela OMS, 1973 e 2004 (Sauter G et al. 2004)

Classificação OMS 1973
Papiloma Urotelial
Grau 1: bem diferenciado
Grau 2: moderadamente diferenciado
Grau 3: pobremente diferenciado
Classificação OMS 2004
Lesões planas
Hiperplasia (Lesão plana, sem atipia ou aspectos papilares)
Atipia reactiva (Lesão plana, com atipia)
Atipia de significado desconhecido
Displasia urotelial
Cis urotelial
Lesões papilares uroteliais (não invasivas)
Papiloma
Neoplasia papilar de baixo potencial de malignidade (TaG1)
Carcinoma papilar de baixo grau (TaG2)
Carcinoma papilar de alto grau (TaG3)
Neoplasias uroteliais invasivas
Invasão da lâmina própria (T1)
Invasão da muscularis propria (Músculo detrusor) (T2)

.....
APÊNDICE 3: Processamento das amostras para estudo histopatológico

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). Os blocos de parafina foram efectuados nessa bancada de inclusão.

a. Obtenção dos cortes histológicos

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 desgorduradas 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.

b. Técnicas histológicas: hematoxilina & eosina

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).

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.

.....

APÊNDICE 4: Protocolo de marcação imunohistoquímica pela técnica estreptavidina-biotina-peroxidase

No estudo de imunohistoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: M 7248 (DakoCytomation), MS-04-PO (Neomarkers-Labvision) e WM 59 (Abcam) para avaliar a imunexpressão dos antigénios Ki67, p53 e CD31, respectivamente. Os anticorpos foram testados no tecido vesical do rato, para avaliar a sua aplicação na espécie, otimizar a diluição e verificar a necessidade de efectuar tratamentos térmicos, no sentido de melhorar a exposição dos epitopos e aumentar a sua imunexpressão.

a. Soluções e Reagentes:

- Xilol.
- Etanol (100% e 95%).
- Água destilada.
- Tampão fosfato salino (PBS): 0,58 M de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), 0,17 M de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), 0,68 M de cloreto de sódio (NaCl). Para preparar um 1 litro de solução tampão, combinar 82,33 g de Na_2HPO_4 , 23,45 g de NaH_2PO_4 e 40 g de NaCl. Ajustar pH a 7,4.
- Tampão citrato de sódio 10 mM: adicionar 2,94 g de citrato de sódio a 1 litro de água destilada. Ajustar pH a 6,0.
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a 1%: adicionar 10 ml de H_2O_2 a 30%, a 290 ml de água destilada.
- Solução bloqueadora: 5% de soro de cavalo ou de cabra em PBS.
- Complexo de Estraptavidina-biotina-peroxidase Complexo de Estraptavidina-biotina-peroxidase (TS-125-HR, Labvision Corporation®): preparar de acordo com as instruções do fabricante, 30 minutos antes do uso.
- Reagente DAB: adicionar 7 μl de H_2O_2 a 30% a 10 ml de água destilada. Adicionar esta mistura a 10 ml de 1mg/ml de tetrahidrocloreto de diaminobenzina (DAB), filtrado.

b. Protocolo

1. Desparafinação/hidratação dos cortes histológicos:
 - a) Incubação em Xilol, por períodos de cinco minutos (3x).
 - b) Incubação em Etanol a 100%, por períodos de 10 minutos (3x).
 - c) Incubação em Etanol a 95%, por períodos de 10 minutos (3x).
2. Lavagem das amostras em água destilada, cinco minutos (2x).

-
3. Lavagem em PBS, cinco minutos.
 4. Tratamento térmico no microondas em tampão citrato de sódio 10 mM (pH6), 10 minutos. (Manter as lâminas totalmente imersas no tampão a uma temperatura imediatamente abaixo da fervura). Arrefecer as lâminas durante 20 minutos.
 5. Lavagem com água destilada, 5 minutos (3x).
 6. Incubação com H₂O₂ a 1%, 10 minutos.
 7. Lavagem com água destilada, 5 minutos (3x).
 8. Lavagem com PBS, 5 minutos.
 9. Bloqueio da imunorreatividade inespecífica com 100 µl de solução bloqueadora, à temperatura ambiente, 1 hora.
 10. Remoção da solução bloqueadora e adição de 10-40 µl de anticorpo primário. Incubar a 4°C, durante a noite.
 11. Remover a solução do anticorpo e lavar os cortes histológicos em PBS, 5 minutos (3x).
 12. Adição de 10-40 µl de anticorpo secundário, diluído em solução bloqueadora. Incubar 30 minutos, à temperatura ambiente (soro de ligação secundário biotinilado de coelho/cabra anti-rato).
 13. Remoção do anticorpo secundário e lavagem com solução PBS, 5 minutos (3x).
 14. Adicionar 10-40 µl do complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase e incubar durante 30 minutos, à temperatura ambiente.
 15. Lavar com PBS, 5 minutos (3x).
 16. Incubação com cromogéneo compatível (10-40 µl de reagente DAB). Monitorizar a coloração.
 17. Logo que as preparações fiquem castanhas, imergir as lâminas em água destilada.
 18. Coloração reversa com hematoxilina, durante 10 segundos, se desejado.
 19. Lavagem com água destilada, 5 minutos (2x).
 20. Desidratação dos cortes histológicos:
 - a) Incubação em Etanol a 95%, por períodos de 10 segundos (2x).
 - b) Incubação em Etanol a 100%, por períodos de 10 segundos (2x).
 - c) Incubação em Xilol, por períodos de 10 segundos (2x).
 21. Cobertura.

APÊNDICE 5: Protocolo para análise de expressão génica na bexiga

Para análise de expressão génica da bexiga, foi isolado RNA total a partir de cortes histológicos dos blocos de parafina.

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo de purificação do RNA total de tecido RNeasy kit FFPE® (Qiagen, Hilden, Alemanha). O RNA total foi diluído em 30 µl de água RNase-free (sem tratamento opcional com DNase). Para quantificar a quantidade de RNA total extraído e verificar a integridade do RNA (utilizando o número de integridade do RNA), as amostras foram analisadas usando 6000 Nano Chip kit®, Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Walbronn, Alemanha) e software 2100 expert, seguindo as instruções do fabricante. O rendimento do isolamento foi 0,5-3 µg; os números de integridade do RNA foram 6,0-9,0 e a pureza (A_{260}/A_{280}) foi 1,8-2,0.

A transcrição reversa de RNA foi efectuada com *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, CA, EUA); 1 µg de RNA total foi misturado com um 2× *First-Strand Reaction Mix* e *SuperScript™ III Enzyme Mix* [oligo (dT) mais hexâmeros aleatórios], de acordo com as instruções do fabricante.

As reacções foram realizadas num termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CO, EUA), por 10 min a 25 °C, 50 min a 50 °C e 5 min a 85 °C. Os produtos da reacção foram então digeridos com 1 µL de RNase H, por 20 min a 37 °C e, finalmente, cDNA diluído a um volume final de 50 µl e armazenado a -20 °C.

A expressão génica relativa foi quantificada por PCR em tempo real usando o *LightCycler® 480 II* (Roche, Rotkreuz, Suíça). A etapa de normalização precedeu a quantificação da expressão génica, utilizando o *geNorm Housekeeping Gene selection kit* para *Rattus norvegicus* (Primer Design, Southampton, UK) e *geNorm software* (Ghent University Hospital, Centro de Genética Médica, Ghent, Bélgica) para seleccionar genes de referência ideal para estudo; os genes seleccionados foram gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) e proteína ribossômica L13 (Rp113).

As reacções de PCR em tempo real usaram *QuantiTect® Primer Assay* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para os genes em estudo e os controles endógenos seleccionados previamente, juntamente com *QuantiTect SYBR Green PCR Kit Gene expression*. As reacções de RT-PCR foram realizadas com 100 ng de amostra de cDNA, primers (5-20 nM) e 1 × *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*.

Foram usadas reacções de controlo para cada gene, para garantir a ausência de amplificação inespecífica. As reacções foram realizadas

.....
com o seguinte perfil térmico: 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Os resultados da PCR em tempo real foram analisados com *LightCycler 480*, versão 1.5 (Roche, Rotkreuz, Suíça) e quantificação utilizou o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

.....
APÊNDICE 6: 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, controlos 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 reacção 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.

Parâmetro analisado	Tipo de amostra	Diluição	Absorvância leitura / Comprimento onda correcção	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		1:100	450 / 620	2,5
	0	ng/mL		

Marcadores inflamatórios e tumorais avaliados

.....

APÊNDICE 7: Protocolo de doseamento dos marcadores de equilíbrio oxidativo

a. Preparação das amostras

Para além do soro, foram analisados o fígado, os rins e o coração nos vários 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 sanicados 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 medida a peroxidação lipídica (através do TBARS) e a capacidade antioxidante total (TAS).

b. Medição da concentração sérica de malondialdeído (MDA) pelo método das espécies reactivas ao TBA: TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances)

A avaliação da peroxidação lipídica pode ser feita por diferentes metodologias, conforme o que se pretende e as técnicas disponíveis. O método mais vulgarmente utilizado é o que mede as substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), designadas de TBARS. O doseamento é baseado na medição espectrofotométrica de uma substância colorida (cromogénio), formada entre uma molécula de aldeído malónico ou MDA, resultante da peroxidação de duas moléculas de TBA.

Para quantificação das concentrações de MDA nas amostras (tecidos e soro) foi necessária a construção de uma curva de calibração (realizada em duplicado). Da solução comercial de malondialdeído bis(dimetilacetil), 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-hidroxitoluento (BHT) dissolvido em etanol; 100 µl de catalizador tricloreto de ferro hexahidratado (FeCl₃.6H₂O), 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.

c. 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, FeCl₃.6H₂O 20 mM, Reagente FRAP (tampão acetato, TPTZ e FeCl₃.6H₂O) 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 prepararam 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.

.....

APÊNDICE 8: Resultados dos hemogramas e dos parâmetros bioquímicos dos Grupos em Estudo

Grupo	Controlo		BBN		p
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,578 (0,290)	6,18 - 8,18	8,072 (0,112)	7,79 - 8,77	0,070
Hg (g/dl)	14,150 (0,524)	11,60 - 15,10	14,600 (0,146)	14,20 - 15,40	0,795
Htc (%)	40,417 (1,686)	32,10 - 43,30	42,112 (0,441)	40,90 - 44,10	0,897
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,600 (0,558)	3,40 - 5,60	3,517 (0,255)	2,90 - 4,40	0,148
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,667 (46,207)	814 - 1108	1008,125 (46,959)	797 - 1222	0,800

Quadro A1: Hemograma dos grupos Controlo e Carcinogénio. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); p vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		BBN		p
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159 - 205	204,25 (10,32)	163 - 248	0,141
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49 - 0,98	0,56 (0,03)	0,42 - 0,67	0,201
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,40 - 19,60	20,68 (0,47)	19,20 - 22,90	0,008
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40 - 0,70	0,84 (0,16)	0,30 - 1,50	0,173
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52 - 70	71,71 (8,66)	50 - 111	0,518
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24 - 32	33,13 (2,74)	21 - 46	0,174
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54 - 97	79,43 (5,96)	57 - 107	0,240
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19 - 43	38,25 (3,47)	28 - 57	0,160
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14 - 67	40,86 (6,10)	12 - 65	0,744
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118 - 229	137,00 (10,54)	94 - 171	0,257

Quadro A2: Parâmetros bioquímicos dos grupos Controlo e Carcinogénio. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); p vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Sir		Sir 1 PP		Sir 2 PT	
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (DP/EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	8,06 (0,13)	7,70-8,43	7,85 (0,14)	7,28-8,29	8,86 (0,09)	8,54-9,08
<i>p</i>	-		0,144		0,561		0,006	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60-15,10	14,60 (0,25)	13,90-15,20	14,38 (0,12)	14,0-14,9	15,30 (0,25)	14,60-15,90
<i>p</i>	-		0,711		0,557		0,052	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10-43,30	41,32 (0,68)	39,40-43,0	41,76 (0,45)	40,30-44,10	44,50 (0,78)	42,50-46,10
<i>p</i>	-		0,715		0,746		0,018	
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	4,96 (0,19)	4,20-5,20	4,42 (0,36)	3,10-5,70	5,82 (0,20)	5,40-6,30
<i>p</i>	-		0,578		0,779		0,112	
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	909,80 (26,17)	810-956	958,38 (40,25)	760-1070	806,00 (44,48)	717-886
<i>p</i>	-		0,185		0,608		0,026	

Quadro A3: Hemograma dos Grupos do Sirolimus. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		CsA		CsA PP		CsA PT	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	7,77 (0,16)	7,35-8,11	7,46 (0,16)	6,57-7,90	9,02 (0,23)	8,52-9,44
<i>p</i>	-		0,831		0,332		0,011	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60-15,10	13,90 (0,11)	13,60-14,10	13,59 (0,21)	12,60-14,50	15,55 (0,39)	14,80-16,40
<i>p</i>	-		0,087		0,052		0,042	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10-43,30	40,08 (0,32)	39,60-41,00	38,89 (0,70)	35,60-41,00	44,15 (1,38)	41,40-47,20
<i>p</i>	-		0,088		0,039		0,240	
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	4,30 (0,58)	3,30-5,30	7,15 (0,52)	5,50-9,00	3,90 (0,36)	3,20-4,40
<i>p</i>	-		0,243		0,012		0,343	
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	797,00 (40,37)	702-878	851,12 (37,67)	697-1000	913,50 (93,73)	718-1101
<i>p</i>	-		0,019		0,036		0,435	

Quadro A4: Hemograma dos Grupos da Ciclosporina A. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Sir		Sir 1 PP		Sir 2 PT	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	203,75 (9,29)	158-242	204,67 (5,29)	160-243	210,00 (21,04)	144-259
<i>p</i>	-		0,136		0,140		0,221	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,68 (0,04)	0,58-0,76	0,62 (0,03)	0,50-0,71	0,76 (0,05)	0,59-0,85
<i>p</i>	-		0,846		0,661		0,363	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	20,58 (1,07)	18,2-23,4	18,36 (0,39)	16,4-20,1	16,52 (1,48)	13,4-21,5
<i>p</i>	-		0,056		0,346		0,546	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	0,62 (0,06)	0,50-0,80	0,45 (0,07)	0,30-0,70	0,64 (0,07)	0,52-0,60
<i>p</i>	-		0,618		0,187		0,588	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	104,25 (8,37)	92-129	84,62 (2,34)	75-95	118,60 (16,61)	74-171
<i>p</i>	-		0,001		0,001		0,006	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	81,00 (10,69)	60-95	35,25 (2,37)	29-50	23,40 (1,66)	18-28
<i>p</i>	-		0,035		0,044		0,128	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	126,50 (18,23)	92-158	81,50 (5,96)	57-111	57,80 (2,71)	52-67
<i>p</i>	-		0,044		0,170		0,174	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	82,40 (11,09)	57-115	62,62 (4,60)	47-81	28,40 (1,29)	26-33
<i>p</i>	-		0,008		0,000		0,477	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	37,75 (7,56)	21-56	18,87 (1,96)	10-30	29,40 (1,44)	26-34
<i>p</i>	-		0,984		0,073		0,373	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	316,25 (40,06)	233-411	195,25 (26,64)	96-314	164,80 (9,60)	143-198
<i>p</i>	-		0,003		0,283		0,866	

Quadro A5: Parâmetros bioquímicos dos Grupos do Sirolimus. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		CsA		CsA PP		CsA PT	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	200,25 (11,97)	165-217	214,50 (24,13)	121-325	141,80 (23,04)	97-231
<i>p</i>	-		0,216		0,246		0,097	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,62 (0,031)	0,55-0,69	0,66 (0,03)	0,54-0,74	0,64 (0,04)	0,54-0,73
<i>p</i>	-		0,724		0,996		0,851	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	19,00 (1,91)	15,0-22,6	19,51 (2,65)	14,3-37,8	22,62 (3,09)	17,2-31,5
<i>p</i>	-		0,530		0,588		0,121	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	0,58 (0,10)	0,40-0,80	1,80 (0,67)	0,30-6,20	2,58 (0,10)	0,60-5,30
<i>p</i>	-		0,966		0,090		0,115	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	57,75 (6,24)	47-74	77,25 (8,95)	52-118	127,80 (33,09)	59-230
<i>p</i>	-		0,392		0,299		0,044	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	25,50 (2,22)	22-32	27,62 (2,40)	17-41	39,40 (9,30)	21-64
<i>p</i>	-		0,485		0,994		0,277	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	52,75 (8,23)	42-77	49,62 (4,66)	36-80	49,80 (6,96)	29-71
<i>p</i>	-		0,157		0,014		0,075	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	30,25 (5,30)	24-46	29,12 (2,47)	20-43	24,80 (3,04)	15-32
<i>p</i>	-		0,878		0,617		0,189	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	22,50 (2,96)	18-31	20,50 (2,44)	16-37	25,00 (4,09)	14-39
<i>p</i>	-		0,192		0,137		0,234	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	92,75 (8,40)	72-110	88,50 (9,22)	48-123	57,40 (6,35)	36-72
<i>p</i>	-		0,013		0,001		0,000	

Quadro A6: Parâmetros bioquímicos dos Grupos da Ciclosporina A. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Celecox		Celecox 1 PP		Celecox 10 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	7,34 (0,08)	7,15-7,52	6,39 (0,45)	4,26-7,47	7,66 (0,10)	7,38-8,14
<i>p</i>	-		0,540		0,022		0,366	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60- 15,10	13,28 (0,14)	13,10- 13,70	12,26 (0,65)	9,60-13,80	14,05 (0,20)	13,50- 15,10
<i>p</i>	-		0,224		0,021		0,242	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10- 43,30	38,02 (0,43)	37,50- 39,30	33,87 (2,55)	22,40- 39,50	40,41 (0,67)	38,40- 44,00
<i>p</i>	-		0,295		0,022		0,302	
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	4,20 (0,60)	3,60-4,80	2,13 (0,63)	0,40-5,40	4,14 (0,44)	1,60-5,60
<i>p</i>	-		0,684		0,028		0,671	
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	884,75 (42,58)	764-959	662,00 (65,91)	468-946	942,38 (36,89)	750-1080
<i>p</i>	-		0,152		0,002		0,424	

Quadro A7: Hemograma dos Grupos do Celecoxib. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		AAS		AAS 25 PP		AAS 250 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
GV (x10 ⁶ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	7,62 (0,18)	7,39-7,97	7,61 (0,15)	6,89-8,04	6,28 (0,63)	3,30-8,31
<i>p</i>	-		0,606		0,568		0,118	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60-15,10	13,77 (0,46)	13,00-14,60	14,04 (0,24)	12,70-14,60	11,68 (0,96)	7,40-15,30
<i>p</i>	-		0,294		0,848		0,093	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10-43,30	39,43 (1,42)	37,50-42,20	41,10 (0,82)	36,80-43,90	32,96 (3,36)	16,90-44,20
<i>p</i>	-		0,439		0,886		0,100	
GB (x10 ³ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	3,53 (0,15)	3,30-3,80	2,29 (0,30)	1,30-3,10	2,12 (0,60)	0,50-5,00
<i>p</i>	-		0,157		0,003		0,025	
PLT (x10 ³ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	791,33 (11,57)	772-812	734,57 (50,01)	562-906	680,12 (77,57)	367-938
<i>p</i>	-		0,022		0,003		0,008	

Quadro A8: Hemograma dos Grupos do AAS. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

.....

Grupo	Controlo		Celecox		Celecox 1 PP		Celecox 10 PP		Celecox 10 PT	
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	205,00 (9,39)	193-233	183,43 (10,18)	144-218	247,29 (10,03)	211-293	172,56 (5,40)	159-205
<i>p</i>	-		0,089		0,984		0,000		0,240	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,60 (0,2)	0,55-0,64	0,60 (0,05)	0,38-0,81	0,74 (0,03)	0,64-0,83	0,62 (0,02)	0,49-0,98
<i>p</i>	-		0,473		0,482		0,407		0,649	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	19,45 (1,53)	16,5-23,7	15,83 (0,99)	13,70-20,80	24,28 (0,93)	20,5-29,5	16,54 (0,54)	4,20-2,90
<i>p</i>	-		0,287		0,123		0,000		0,292	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	0,47 (0,03)	0,40-0,50	0,90 (0,31)	0,50-2,70	1,61 (0,25)	0,90-2,50	0,58 (0,08)	0,40-1,10
<i>p</i>	-		0,214		0,866		0,005		0,577	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	55,00 (2,71)	51-63	67,86 (4,38)	53-83	64,57 (4,30)	52-84	102,11 (11,24)	66-156
<i>p</i>	-		0,086		0,314		0,830		0,003	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	28,25 (2,02)	24-33	35,86 (2,66)	25-47	30,14 (2,58)	24-40	54,00 (5,14)	37-77
<i>p</i>	-		0,819		0,042		0,477		0,001	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	49,50 (5,14)	37-62	56,86 (2,87)	49-68	68,88 (3,94)	56-88	54,78 (1,87)	44-63
<i>p</i>	-		0,062		0,099		0,977		0,044	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	30,00 (3,49)	22-39	32,29 (1,55)	28-38	40,88 (2,79)	34-54	29,33 (0,83)	25-33
<i>p</i>	-		0,817		0,748		0,042		0,519	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	19,50 (1,71)	15-23	24,57 (1,69)	19-30	28,00 (1,57)	22-35	25,44 (1,23)	19-30
<i>p</i>	-		0,120		0,179		0,303		0,203	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	95,25 (8,17)	75-115	119,71 (15,17)	49-166	108,62 (11,07)	62-153	111,67 (10,72)	72-165
<i>p</i>	-		0,015		0,094		0,018		0,021	

Quadro A9: Parâmetros bioquímicos dos Grupos do Celecoxib. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		AAS		AAS 25 PP		AAS 250 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	197,33 (9,49)	185-216	216,29 (17,41)	175-288	175,29 (11,66)	140-228
<i>p</i>	-		0,266		0,253		0,588	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,68 (0,04)	0,61-0,79	0,65 (0,02)	0,55-0,73	0,58 (0,02)	0,49-0,69
<i>p</i>	-		0,843		0,914		0,368	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	18,78 (1,63)	14,9-22,8	20,91 (1,11)	16,8-26,4	17,48 (0,97)	14-23
<i>p</i>	-		0,603		0,055		0,941	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	1,40 (0,39)	0,70-2,50	1,01 (0,22)	0,60-2,30	0,87 (0,23)	0,50-2,20
<i>p</i>	-		0,050		0,136		0,617	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	55,67 (7,69)	47-71	77,86 (9,53)	49-114	85,12 (9,25)	51-123
<i>p</i>	-		0,437		0,668		0,093	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	33,00 (4,14)	26-45	34,50 (3,52)	23-55	46,50 (4,85)	33-72
<i>p</i>	-		0,239		0,104		0,013	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	44,00 (2,12)	38-48	51,38 (4,66)	33-77	45,75 (1,89)	39-55
<i>p</i>	-		0,015		0,043		0,002	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	28,75 (2,29)	23-34	29,62 (2,32)	19-40	25,62 (1,67)	21-36
<i>p</i>	-		0,598		0,696		0,125	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	15,25 (0,63)	14-17	21,75 (2,87)	14-39	20,12 (0,88)	16-23
<i>p</i>	-		0,042		0,065		0,088	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	106,75 (14,06)	67-131	156,50 (12,30)	109-216	107,50 (15,03)	61-176
<i>p</i>	-		0,048		0,856		0,035	

Quadro A10: Parâmetros bioquímicos dos Grupos do AAS. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Atorva		Atorva 3 PP		Atorva 30 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max						
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	7,17 (0,29)	6,60-7,86	7,21 (0,12)	6,91-7,78	7,11 (0,24)	6,17-7,89
<i>p</i>	-		0,286		0,100		0,109	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60-15,10	13,50 (0,37)	12,60-14,10	13,11 (0,19)	12,30-13,60	13,05 (0,30)	12,10-14,20
<i>p</i>	-		0,086		0,074		0,064	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10-43,30	37,80 (0,88)	36,00-39,60	37,99 (0,57)	35,40-39,20	37,12 (0,97)	34,20-40,70
<i>p</i>	-		0,088		0,173		0,120	
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	3,41 (0,26)	3,0-4,1	3,88 (0,40)	3,10-4,40	3,53 (0,13)	3,30-3,90
<i>p</i>	-		0,146		0,340		0,154	
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	700,25 (25,22)	644-765	712,33 (43,33)	575-808	665,83 (36,81)	510-776
<i>p</i>	-		0,001		0,001		0,000	

Quadro A11: Hemograma dos Grupos da Atorvastatina. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Omega 3		Omega 3 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (DP/EP)	Min-Max	\bar{x} (DP/EP)	Min-Max
GV ($\times 10^6$ /dl)	7,58 (0,29)	6,18-8,18	7,79 (0,58)	6,12-8,71	7,47 (0,15)	6,83-8,34
<i>p</i>	-		0,286		0,156	
Hg (g/dl)	14,15 (0,52)	11,60-15,10	13,95 (0,86)	11,50-15,30	13,72 (0,31)	12,70-15,10
<i>p</i>	-		0,838		0,217	
Htc (%)	40,42 (1,69)	32,10-43,30	40,10 (2,79)	32,20-44,30	38,41 (0,88)	35,70-42,90
<i>p</i>	-		0,670		0,121	
GB ($\times 10^3$ /dl)	4,60 (0,56)	3,40-5,60	3,48 (0,85)	1,90-5,90	3,42 (0,74)	1,60-7,00
<i>p</i>	-		0,248		0,268	
PLT ($\times 10^3$ /dl)	990,67 (46,21)	814-1108	760,75 (77,07)	556-928	811,00 (37,13)	596-904
<i>p</i>	-		0,026		0,010	

Quadro A12: Hemograma dos Grupos do Ómega 3. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Atorva		Atorva 3 PP		Atorva 30 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	210,00 (3,61)	205-217	201,33 (21,70)	145-276	249,25 (13,75)	223-288
<i>p</i>	-		0,034		0,455		0,001	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,64 (0,02)	0,60-0,68	0,67 (0,04)	0,58-0,85	0,65 (0,02)	0,60-0,73
<i>p</i>	-		0,792		0,897		0,921	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	16,78 (0,89)	14,90-18,30	19,18 (0,68)	17,40-21,80	17,72 (0,62)	16,30-20,60
<i>p</i>	-		0,525		0,159		0,715	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	0,60 (0,04)	0,50-0,70	1,71 (0,45)	0,60-3,30	0,48 (0,07)	0,30-0,70
<i>p</i>	-		0,798		0,065		0,290	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	54,00 (2,31)	50-58	111,25 (5,72)	103-128	60,00 (5,13)	46-75
<i>p</i>	-		0,152		0,010		0,242	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	31,00 (1,00)	29-32	53,43 (6,10)	37-73	31,60 (1,44)	29-37
<i>p</i>	-		0,157		0,005		0,124	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	46,67 (3,18)	41-52	61,60 (1,96)	58-69	41,20 (1,93)	36-47
<i>p</i>	-		0,020		0,349		0,004	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	27,00 (1,53)	24-29	39,83 (1,97)	33-47	23,20 (0,66)	21-25
<i>p</i>	-		0,414		0,044		0,054	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	19,67 (1,76)	17-23	22,40 (1,60)	19-27	18,00 (1,52)	13-22
<i>p</i>	-		0,183		0,126		0,063	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	160,25 (21,13)	108-211	134,50 (10,22)	110-157	156,40 (7,71)	126-169
<i>p</i>	-		0,998		0,268		0,583	

A13: Parâmetros bioquímicos dos Grupos da Atorvastatina. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

Apêndices

Grupo	Controlo		Omega 3		Omega 3 PP	
	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max	\bar{x} (EP)	Min-Max
Glicémia (mg/dl)	183,17 (6,79)	159-205	177,33 (9,84)	161-195	184,38 (11,94)	142-246
<i>p</i>	-		0,637		0,937	
Creatinina (mg/dl)	0,66 (0,08)	0,49-0,98	0,40 (0,02)	0,36-0,43	0,38 (0,02)	0,29-0,47
<i>p</i>	-		0,056		0,013	
Azoto ureico (mg/dl)	17,58 (0,80)	15,4-19,6	22,12 (1,36)	19,50-25,50	16,91 (0,47)	15,20-18,50
<i>p</i>	-		0,019		0,457	
Ácido úrico (mg/dl)	0,58 (0,06)	0,40-0,70	0,60 (0,06)	0,50-0,70	0,56 (0,11)	0,40-1,30
<i>p</i>	-		0,829		0,255	
TGO (UI/l)	62,00 (2,96)	52-70	62,00 (1,08)	59-64	73,86 (3,45)	59-87
<i>p</i>	-		0,392		0,022	
TGP (UI/l)	27,60 (1,83)	24-32	23,00 (0,91)	21-25	38,62 (1,86)	33-45
<i>p</i>	-		0,068		0,002	
Colesterol total (mg/dl)	68,67 (6,28)	54-97	46,75 (2,56)	41-52	55,29 (2,48)	43-63
<i>p</i>	-		0,027		0,059	
HDL-c (mg/dl)	31,17 (3,21)	19-43	26,75 (1,11)	24-29	33,29 (1,73)	24-38
<i>p</i>	-		0,313		0,557	
Não HDL-c (mg/dl)	37,50 (8,20)	14-67	20,00 (1,87)	15-24	22,00 (1,29)	17-27
<i>p</i>	-		0,130		0,118	
Triglicerídeos (mg/dl)	160,17 (15,98)	118-229	82,00 (2,31)	78-86	84,57 (10,01)	60-128
<i>p</i>	-		0,013		0,002	

Quadro A14: Parâmetros bioquímicos dos Grupos do Ômega 3. (Resultados expressos em \bar{x} (EP); *p* vs grupo Controlo)

.....
Informações Adicionais:

1. A tese foi elaborada de acordo com as normas de Identidade Visual da Universidade de Coimbra, acessíveis em:

<http://www.uc.pt/identidadevisual/identidadevisual/templates>»».

2. As fotografias da capa incluem:

- Aspecto macroscópico de bexiga do grupo carcinogénio, com tumor, distendida com formol e após corte sagital.
- Neoplasia urotelial do grupo carcinogénio, corada pelo método de H&E, com ampliação 200X.
- Imunorreactividade de Cox-2 no urotélio hiperplásico do grupo carcinogénio, com ampliação 400X.

3. As Figuras 6, 7, 8 e 81 foram realizadas por Diana Marques (www.dianamarques.com), especialista em ilustração científica, adaptando-as das ilustrações originais, devidamente referenciadas.

4. A figura 81 é igual à figura 7.