

1 2



9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Catarina Pardal de Matos

**ANTI-ÁLGICOS NA RESPOSTA TERAPÊUTICA DOS
CARCINOMAS DA MAMA, BEXIGA E PRÓSTATA
ESTUDO PRÉ-CLÍNICO**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Professora Doutora Isabel Vitória Neves de Figueiredo Santos Pereira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Anti-álgicos na resposta terapêutica dos carcinomas da mama, bexiga e próstata Estudo pré-clínico

Ana Catarina Pardal de Matos

Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada pela Professora Doutora Ana Salomé dos Santos Pires Lourenço e pela Professora Doutora Isabel Vitória Neves de Figueiredo Santos Pereira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

No culminar de mais uma etapa do meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer a todos os que, de modo direto ou indireto, contribuíram não só para a realização deste trabalho e deste manuscrito, mas também para o alcance de um importante objetivo pessoal. Este projeto ainda que de carácter individual, resulta de um trabalho de investigação no contexto de uma equipa multidisciplinar, da qual para mim é uma grande honra fazer parte.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e diretora da Unidade de Biofísica da mesma instituição, agradeço a oportunidade de integrar a equipa de investigação por si liderada, por demonstrar a importância do rigor e do cuidado para o desenvolvimento de um trabalho, a atenção e disponibilidade demonstradas, a partilha de conhecimentos e experiência científica e, ainda, por todas as críticas e conselhos na revisão do manuscrito.

À Professora Doutora Ana Salomé Pires, Professora Assistente e orientadora desta dissertação, por todo o apoio incondicional, disponibilidade, amizade, simpatia, espírito positivo e pela motivação. Por todo o incentivo e pela contribuição essencial que deu neste trabalho, quer no dia a dia quer na revisão deste manuscrito, ajuda preciosa na análise estatística e pela correção da dissertação, mesmo quando o tempo era escasso. Certamente serão ensinamentos que guardarei para sempre.

À Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, orientadora interna desta dissertação, pelos seus ensinamentos e disponibilidade.

À Mestre Inês Marques, investigadora da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço toda a disponibilidade e atenção, todos os ensinamentos, a confiança, a ajuda constante, a paciência, mas também todos os momentos de amizade, descontração e boa disposição diários. Agradeço o profissionalismo, o rigor e o espírito crítico que sempre me incutiu e que tão bem a caracterizam. Agradeço também todas as correções e sugestões realizadas ao longo de todo o trabalho de investigação.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por toda a paciência e ajuda durante todo este percurso, por toda a disponibilidade e por me acolher sempre com simpatia.

Ao Mestre Edgar Tavares da Silva, médico do serviço de urologia do Centro Hospitalar e Universitário da Universidade de Coimbra, por todos os ensinamentos, disponibilidade e simpatia.

À Mestre Ana Valentim, coordenadora da unidade de Dor Crónica do Centro Hospitalar e Universitário da Universidade de Coimbra, por toda a disponibilidade.

Ao Mestre Ricardo Teixo, ao Mestre Eurico Pereira, à Mestre Beatriz Serambeque e à Mestre Ana Rita Gomes, que direta ou indiretamente me ajudaram neste projeto.

À Sra. Cláudia Caridade, secretária da Unidade de Biofísica, agradeço toda a disponibilidade, atenção e ajuda nas mais variadas tarefas do dia-a-dia.

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital de Dia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço a cedência dos fármacos para a realização dos estudos de resposta à terapêutica.

Aos meus amigos de sempre, agradeço a ajuda e o acompanhamento nesta etapa, pela presença constante nos momentos bons e menos bons. Um especial agradecimento à Xana, Brigitte, Maria Carolina, Baratinha, Inês e Beatriz pela compreensão e perdão pelas ausências, por todos os momentos que partilhamos ao longo da vida, um sincero obrigada.

Aos amigos que fiz durante a licenciatura e o mestrado, agradeço por me acompanharem, por partilharem comigo momentos inesquecíveis, mas sobretudo pela amizade que construímos.

À Mestre Ana Luísa Dias, que me acompanhou durante todo este processo. Por toda a ajuda, paciência e disponibilidade. Agradeço sobretudo por toda a amizade, apoio e por me ouvir sempre que precisei.

A todos os alunos que me acompanharam durante o projeto, Maria Combo, Ana Valentim e Margarida Quadros por toda a ajuda, disponibilidade, amizade e tempo para me ouvir quando mais precisei. Obrigada pela oportunidade de aprender convosco e transmitir todo o conhecimento que tenho.

Um agradecimento especial à minha família. Agradeço aos meus pais por todos os princípios, educação, ensinamentos e o amor que sempre me transmitiram. Obrigada pelo orgulho que sentem, pela confiança depositada e pelo acompanhamento e incentivo constante em todas as etapas da minha vida pessoal, do meu percurso académico e profissional e na conquista dos meus objetivos. Sem vós nada disto seria possível. Ao meu irmão, à minha tia e à minha madrinha, pela presença constante, por todo o orgulho que sentem. Obrigada por me aturarem e pela partilha de todos os momentos. Aos meus avós, agradeço o amor e o carinho, o acompanhamento ao longo de toda a minha vida, a experiência de vida e todo o orgulho que sentem. À Ana e à minha Mati por todos os momentos, companheirismo e ensinamentos.

Ao Guilherme, meu namorado, por toda a paciência, apoio e presença constantes, todo o amor, carinho e compreensão. Sobretudo por todas as palavras de incentivo e de força nos momentos mais difíceis e para as quais não tenho palavras para agradecer.

A todos vós um bem-haja.

Índice

Agradecimentos	VII
Índice	XI
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas.....	XVII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIX
Resumo	XXIII
Abstract	XXV
Introdução.....	I
1.1. Epidemiologia.....	3
1.2. Cancro da Mama.....	7
1.2.1. Mama, Carcinogénese e Fatores de risco.....	7
1.2.2. Diagnóstico e Estadiamento.....	9
1.2.3. Carcinoma da Mama Avançado.....	11
1.2.4. Opções Terapêuticas.....	12
1.2.4.1. Antraciclinas: Doxorrubicina e Epirubicina	13
1.3. Cancro da Bexiga.....	15
1.3.1. Bexiga, Carcinogénese e Fatores de risco.....	15
1.3.2. Diagnóstico e Estadiamento.....	16
1.3.3. Carcinoma da Bexiga Avançado.....	17
1.3.4. Opções Terapêuticas.....	18
1.3.4.1. Gemcitabina.....	19
1.3.4.2. Cisplatina.....	20
1.3.4.3. Associação de Gemcitabina e Cisplatina.....	20
1.4. Cancro da Próstata	21
1.4.1. Próstata e Carcinogénese.....	21
1.4.2. Fatores de risco.....	22
1.4.3. Diagnóstico e Estadiamento.....	24
1.4.4. Carcinoma da Próstata não Localizado.....	28
1.4.5. Opções Terapêuticas.....	28
1.4.5.1. Taxano: Docetaxel.....	30
1.5. Conceito de Dor e Dor Oncológica.....	31
1.5.1. Avaliação e Terapêutica.....	32

1.6. Analgésicos Opioides.....	35
1.6.1. Avanços recentes na investigação clínica.....	36
1.7. Anestésicos Locais	38
1.7.1. LAs e a Terapêutica convencional do cancro.....	39
Objetivos	41
Materiais e Métodos	45
3.1. Cultura celular e Fármacos	47
3.2. Tratamento com os fármacos	50
3.2.1. Anestésicos locais e docetaxel em monoterapia.....	50
3.2.2. Associação de anestésicos locais e docetaxel	50
3.3. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio MTT.....	52
3.4. Avaliação de efeitos celulares das melhores associações.....	53
3.4.1. Análise da viabilidade celular e perfil de morte celular por citometria de fluxo	54
3.4.2. Análise da migração celular pelo <i>wound healing assay</i>	55
3.5. Análise estatística	56
Resultados.....	59
4.1. Avaliação da atividade metabólica.....	61
4.1.1. Atividade metabólica em resposta aos anestésicos locais em monoterapia.....	61
4.1.2. Atividade metabólica em resposta ao docetaxel em monoterapia e em associação com os anestésicos locais	66
4.2. Avaliação dos efeitos celulares das melhores associações.....	69
4.2.1. Viabilidade celular e perfil de morte celular	70
4.2.2. Migração celular.....	72
Discussão.....	79
Conclusão e Perspetivas Futuras	89
Bibliografia.....	93
Anexos.....	III

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancros mais comuns em 2020, para ambos os sexos, a nível (A) Mundial e (B) Europeu. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (Sung et al., 2021)].	4
Figura 2: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancros mais comuns em 2020, a nível mundial para o sexo (A) Feminino e (B) Masculino. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (Sung et al., 2021)].	5
Figura 3: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancros mais comuns em 2020, a nível nacional, para (A) Ambos os sexos, (B) Sexo feminino e (C) Sexo masculino. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (The Global Cancer Observatory, 2021)].	6
Figura 4: Imagem ilustrativa da anatomia da mama e nódulos linfáticos. [Fonte: (Johns Hopkins Pathology, 2022)].	7
Figura 5: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para CaM, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Koh e Kim, 2019) e (Johns Hopkins Pathology, 2022)].	11
Figura 6: Imagem ilustrativa da anatomia da bexiga. [Adaptado de (Urology Care Foundation, 2020)].	15
Figura 7: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para o CaB, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Babjuk et al., 2022) e (European association of urology, 2021)].	17
Figura 8: Estrutura do isómero Cis do complexo diaminocloroplatina (II), cisplatina. [Adaptado de (Kenny et al., 2017)].	20
Figura 9: Imagem representativa da anatomia da glândula prostática. [Fonte: (Ittmann, 2018)].	21
Figura 10: Padrões histológicos do adenocarcinoma da próstata: Diagrama de Gleason original à esquerda e diagrama de Gleason modificado do ISUP 2015 à direita. [Fonte: (Epstein et al., 2016)].	25

Figura 11: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para CaB, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Mottet et al., 2021) e (National Cancer Institute, 2021)].	27
Figura 12: Esquema de classificação da dor. [Adaptado de [(Orr, Shank e Black, 2017)].....	32
Figura 13: Exemplo de escalas. 1 - escala visual analógica, 2 - escala numérica, 3 - escala qualitativa, 4 - escala de faces. [Adaptado de (Direcção-Geral de Saúde, 2003)].	33
Figura 14: A escada analgésica da WHO (1986). [Adaptado de [(World Health Organization, 2018)].....	34
Figura 15: Imagem representativa de células PC3 imediatamente após a criação do risco.....	56
Figura 16: Curvas de dose-resposta das células de mama (MCF-7 e MCF-12A) e queratinócitos (HaCaT) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.....	62
Figura 17: Curvas de dose-resposta das células de próstata (PC3, LNCaP e RWPE-1) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.....	63
Figura 18: Curvas de dose-resposta das células de bexiga (TCCSUP e HT1376) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.....	65
Figura 19: Curvas de dose-resposta das células tumorais de próstata (A) PC3 e (B) LNCaP após tratamento com Doc em monoterapia e em associação com os LAs. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com Doc, com Doc+Lid,	

com Doc+Rop e com Doc+Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média ± SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.....67

Figura 20: Viabilidade e vias de morte celular. Os resultados foram obtidos para as células PC3 por citometria de fluxo através da dupla marcação com AnV/IP 48h horas após o tratamento com os LAs e Doc em monoterapia e em associação: (A) Doc+Lid; (B) Doc+Rop e (C) Doc+Lev. Os resultados encontram-se expressos como a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo e após os tratamentos com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. Os resultados apresentam a média ± SEM de 3 experiências independentes em duplicado para cada ponto experimental.....70

Figura 21: Imagens representativas do ensaio de cicatrização de feridas nas linhas celulares (A) PC3 e (B) LNCaP incubadas com os LAs e Doc em monoterapia e em associação, às 0, 4, 24 e 48 horas. Os resultados são representativos das imagens de microscopia ótica da zona do risco (ampliação de 20x).....74

Figura 22: Migração celular de células PC3 a 0, 4, 24 e 48 horas em (A) Controlo; e quando incubadas com (B) Lid, Doc e Doc+ Lid, (C) Rop, Doc e Doc + Rop, (D) Lev, Doc e Doc+Lev. Os resultados estão expressos como média ± SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao tratamento com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$75

Figura 23; Migração celular de células LNCaP a 0, 4, 24 e 48 horas em (A) Controlo; e quando incubadas com (B) Lid, Doc e Doc+ Lid ou (C) Lev, Doc e Doc+Lev. Os resultados estão expressos como média ± SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao tratamento com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$77

Figura 24: Curvas de dose-resposta das células MCF-7 ao tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental. I 13

Lista de Tabelas

Tabela 1: Subtipos de CaM e suas características moleculares e manifestações clínicas. Abaixo estão as percentagens de incidência de cada subtipo [Adaptado de (Cardoso et al., 2019)].	8
Tabela 2: Descrição dos estádios de CaM de acordo com os critérios TNM e opções terapêuticas. [Adaptado de (Cardoso et al., 2019)].	12
Tabela 3: Descrição dos estádios de CaB, de acordo com os critérios TNM, e suas opções terapêuticas. [Adaptado de (Babjuk et al., 2022)]	18
Tabela 4: Concentrações de referência de PSA para intervalos etários, de acordo com a etnia dos doentes. [Adaptado de (Greene et al., 2009)].	24
Tabela 5: Estadiamento do CaP. [Adaptado de (Cleto et al., 2013)].	27
Tabela 6: Estratégias terapêuticas associadas a cada estadiamento do CaP. [Adaptado de (Cleto et al., 2013)].	29
Tabela 7: Lista de fármacos recomendados pela National comprehensive cancer network para alívio da dor oncológica, em função da intensidade da dor. [Adaptado de (Swarm et al., 2019)].	35
Tabela 8: Anestésicos locais classificados quanto ao início da ação, duração da ação, dose máxima recomendada e dose máxima absoluta recomendada. [Adaptado de (El-Boghdady, Pawa e Chin, 2018) e (Matos et al., 2022)].	38
Tabela 9: Concentrações de LAs (mM) testadas nas linhas celulares para avaliação da proliferação celular através do ensaio MTT.	50
Tabela 10. Concentrações de anestésicos locais Lid, Rop e Lev e de Doc em cada associação para avaliar a proliferação celular das células das linhas prostáticas PC3 e LNCaP.	53
Tabela 11: Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.	55
Tabela 12: Valores de IC ₅₀ , obtidos pelo ensaio de MTT, dos anestésicos Lid, Rop e Lev nas linhas celulares de mama (MCF-7 e MCF-12A), próstata (PC3, LNCaP e RWPE – I),	

bexiga (TCCSUP e HT1376) e queratinócitos (HaCaT). Os resultados dos IC_{50} e respectivos $IC_{95\%}$ estão expressos em mM. Para o cálculo do IC_{50} foram utilizadas 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.66

Tabela 13: Valores de índice de redução de dose (DRI) e de IC_{50} do Doc em monoterapia e em associação com Lid, com Rop e com Lev nas linhas celulares de próstata PC3 e LNCaP após 48h do tratamento. Os resultados dos IC_{50} estão expressos em nM. Para o cálculo do IC_{50} foram utilizadas 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.....67

Tabela 14: Valores dos índices de combinação (IC) obtidos nas linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP após 48h de tratamento.68

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A

ADT – do inglês, *Androgen deprivation therapy*

AJCC – do inglês, *American joint committee on cancer*

AKT – do inglês, *Protein kinase B*

ANOVA – do inglês, *Analysis of variance*

AnV – Anexina V

ATCC – do inglês, *American Type Culture Collection*

B

BCL-2 – do inglês, *B cell lymphoma 2 protein*

BPE – do inglês, *Bovine pituitary extract*

BRCA1 – do inglês, *BRCA1 DNA repair associated*

BRCA2 - do inglês, *BRCA2 DNA repair associated*

C

CaB – Carcinoma da Bexiga

CaM – Carcinoma da Mama

CaP - Carcinoma da próstata

CaPm - CaP metastático

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CPRCm – Carcinoma da próstata resistente à castração

D

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

Doc – Docetaxel

DRI – do inglês, *Drug reduction index*

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic acid*

E

E2 - 17 β -estradiol

EDTA – do inglês, *Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*

EGF – do inglês, *Epidermal growth factor*

EphB2 – do inglês, *Ephrin type-B receptor 2 gene*

ERBB2 – do inglês, *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ET - Ecografia prostática transretal

F

FBS – do inglês, *Fetal bovine serum*

FITC – do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*

H

HBP - Hiperplasia benigna prostática

HER2 – do inglês, *Human epidermal growth factor receptor 2*

HGPIN – do inglês, *High-grade prostatic intraepithelial neoplasia*

HOXB13 – do inglês, *Homeobox B13*

I

IASP – do inglês, *Internacional Association for the Study of Pain*

IC – Índice de combinação

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IP – Iodeto de propídeo

IS – do inglês, *selectivity index*

ISUP - do inglês, *International Society of Urological Pathology*

K

K-SFM – do inglês, *Keratinocyte Serum Free Medium*

L

LAs – do inglês, *Local anesthetics*

Lev – Levobupivacaína

LHRH - do inglês, *Luteinizing hormone releasing hormone*

Lid - Lidocaína

M

MAPK – do inglês, *Mitogen- activated protein kinase*

MIBC - do inglês, *Muscle invasive bladder cancer*

MRI – do inglês, *Magnetic resonance imaging*

MTT - do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazolyl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*

N

NCCN – do inglês, *National Comprehensive Cancer Network*

NK – do inglês, *Natural killer cells*

NMIBC - do inglês, *Non-muscle invasive bladder cancer*

P

PBS – do inglês, *Phosphate buffer saline*

PET – do inglês, *Positron emission tomography*

PI3K – do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*

PI3KCA – do inglês, *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PIN – do inglês, *Prostatic intraepithelial neoplasia*

PSA – do inglês, *Prostate-specific antigen*

PTEN – do inglês, *Phosphatase and tensin homologue*

Q

QdV – Qualidade de vida

QT - Quimioterapia

R

RA – Recetor de androgénios

RASSFI – do inglês, *Ras association domain family member 1 isoform A*

RBI – do inglês, *RB transcriptional corepressor 1*

RE – Recetor de estrogénio

Rop – Ropivacaína

RP – Recetor de progesterona

RPMI – do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*

S

SRD5A2 – do inglês, *Steroid 5 alpha-reductase 2*

SREs – do inglês, *Skeletal-related events*

SV5 - Taxa de sobrevivência global aos 5 anos

T

TC - Tomografia computadorizada

TCC – do inglês, *Transitional cell carcinoma*

TENS - do inglês, *Transcutaneous electrical nerve stimulation*

TGF- β - do inglês, *Transforming growth factor beta*

TLR4 – do inglês, *Toll-like receptor 4*

TNM - do inglês, *Tumor-node-metastasis*

TP53 - Tumour protein p53

U

UICC – do inglês, *Union for International Cancer Control*

W

WHO - do inglês, *World Health Organization*

Resumo

Os carcinomas da mama (CaM), da bexiga (CaB) e da próstata (CaP) são três dos tipos de neoplasias sólidas mais comuns a nível mundial, europeu e nacional, correspondendo a cerca de 22% dos casos de neoplasias sólidas malignas diagnosticadas no mundo, em 2020. Os tratamentos de primeira linha para estes cancros, tais como cirurgia ou quimioterapia, são geralmente invasivos e frequentemente associados a efeitos secundários graves, resultando na diminuição da qualidade de vida dos doentes. Além disso, a quimioterapia, ao longo do tempo, está associada a elevada resistência. Consequentemente, são necessárias novas abordagens que permitam a diminuição dos efeitos adversos induzidos pelos agentes terapêuticos e, por conseguinte, permitam uma melhor tolerância aos tratamentos, mantendo ou melhorando a sua eficácia.

Estudos recentes sugerem que os anestésicos locais, comumente utilizados em abordagens clínicas de diagnóstico e terapêutica, apresentam efeitos anti-tumorais e que podem atuar em sinergia com outras terapêuticas convencionais oncológicas, além de promover a redução da dor do doente. Contudo, a escassez de informação relativa à sensibilidade e à especificidade destes fármacos, bem como o seu efeito na toxicidade de agentes quimioterapêuticos, impedem a extrapolação de uma conclusão mais definitiva sobre o efeito dos anestésicos locais em células tumorais.

Perante estes factos e a relativa ausência de informação, neste trabalho, pretendeu-se estudar o potencial de anestésicos locais como a lidocaína, ropivacaína e levobupivacaína no tratamento do CaM, CaB e CaP. Para tal, o efeito dos anestésicos locais na proliferação das linhas celulares de CaM (MCF-7), CaB (TCCSUP e HT1376) e de CaP (PC3 e LNCaP) foi avaliada através do ensaio de MTT, após 48h de incubação. A seletividade da atividade anti-tumoral dos anestésicos foi avaliada com recurso a células normais de mama (MCF-12A), de próstata (RWPE-1) e em queratinócitos (HaCaT) pelo mesmo método. Adicionalmente, pretendeu-se averiguar o efeito quimiossensibilizante destes fármacos *in vitro*, com a implementação de um modelo de associação de fármacos baseado num desenho experimental proposto por Chou e Talalay (1984). Alterações de viabilidade e do perfil de morte celular e da migração celular foram avaliados por citometria de fluxo e pelo *wound healing assay*, respetivamente.

Todos os anestésicos locais demonstraram atividade anti-proliferativa seletiva dependente da concentração em que estão presentes. Além disso, a levobupivacaína mostrou

ser o anestésico mais promissor e a linha celular tumoral MCF-7 apresentou maior sensibilidade ao efeito dos três anestésicos locais estudados.

O modelo de associação de fármacos mostrou que a concentração inibitória média de anestésico local sensibiliza as células de cancro da próstata ao efeito do docetaxel, demonstrando um efeito sinérgico. A associação de levobupivacaína com docetaxel revelou ser a mais promissora na redução da proliferação, da migração e da viabilidade celulares sobretudo através da indução de necrose celular.

Os resultados obtidos apontam o uso de anestésicos locais em associação com o docetaxel como uma mais-valia no tratamento de doentes com carcinoma da próstata. A avaliação dos anestésicos locais em associação com outros agentes de terapêutica convencional, noutros tipos de tumores malignos e em linhas celulares não tumorais, bem como a sua avaliação em modelos *in vivo* constituem algumas perspetivas futuras. Em curso, está um estudo observacional para avaliar a potencial relação entre a toma de opioides e a progressão tumoral, a sobrevivência e a qualidade de vida de indivíduos com carcinoma da próstata não localizado.

Palavras-Chave: Cancro da mama, Cancro da bexiga, Cancro da próstata, Anti-álgicos, Docetaxel

Abstract

Breast (CaM), bladder (CaB), and prostate (CaP) carcinomas are three of the most common types of solid neoplasms worldwide, European, and nationally, accounting for about 22% of cases diagnosed worldwide in 2020. First-line treatments for these cancers such as surgery or chemotherapy are generally invasive and often associated with severe side effects, resulting in decreased quality of life for patients. In addition, chemotherapy over time is associated with high resistance. Consequently, new approaches that allow the reduction of the adverse effects induced by conventional therapeutic agents are needed to allow for better tolerance of treatments while maintaining or improving their efficacy.

Recent studies suggest that local anesthetics, commonly used in diagnostic and therapeutic clinical approaches, present anti-tumor effects and may act in synergy with other conventional oncological therapies, besides promoting pain reduction. However, information regarding the sensitivity and specificity of these drugs, as well as their effect on the toxicity of chemotherapeutic agents is scarce, which preventing the extrapolation of a more definitive conclusions on the effect of local anesthetics against tumor cells.

Given these facts and the relative absence of information, in this work, we aimed to study the potential effect of the local anesthetics, such as lidocaine, ropivacaine and levobupivacaine in the therapeutic response of breast, bladder and prostate cancer. For this purpose, the effect of local anesthetics on the proliferation of CaM (MCF-7), CaB (TCCSUP and HT1376) and CaP (PC3 and LNCaP) cell lines was evaluated by MTT assay after 48h of incubation. The selectivity of the anesthetics' anti-tumoral activity was evaluated recurring to normal breast (MCF-12A), prostate (RWPE-1) and keratinocyte (HaCaT) cells by the same method. Additionally, we aimed to investigate the chemosensitizing effect of these drugs *in vitro* by implementing a drug combination model based on the experimental design proposed by Chou and Talalay (1984). Changes in cell viability and cell death and migration profiles were evaluated by flow cytometry and wound healing assay, respectively.

All local anesthetics showed selective anti-proliferative activity dependent on the concentration in which they were present. Furthermore, levobupivacaine showed to be the most promising anesthetic and the MCF-7 tumor cell line showed the highest sensitivity to the effect of the three local anesthetics studied.

The drug combination model showed that the mean inhibitory concentration of local anesthetic sensitizes prostate cancer cells to the effect of docetaxel, demonstrating a

synergistic effect. The combination of levobupivacaine with docetaxel was the most promising in reducing cell proliferation, migration, and viability mainly by inducing cell necrosis.

Thus, the results achieved, point out the use of local anesthetics in association with docetaxel as an added value in the treatment of prostate carcinoma patients. The evaluation of local anesthetics with other conventional therapeutic agents in these, and other tumor types and in non-tumor cell lines, as well as their evaluation in *in vivo* models are future perspectives. Currently ongoing is an observational study to assess the potential relation between opioid use and tumor progression, survival, and quality of life of patients with non-localized prostate carcinoma.

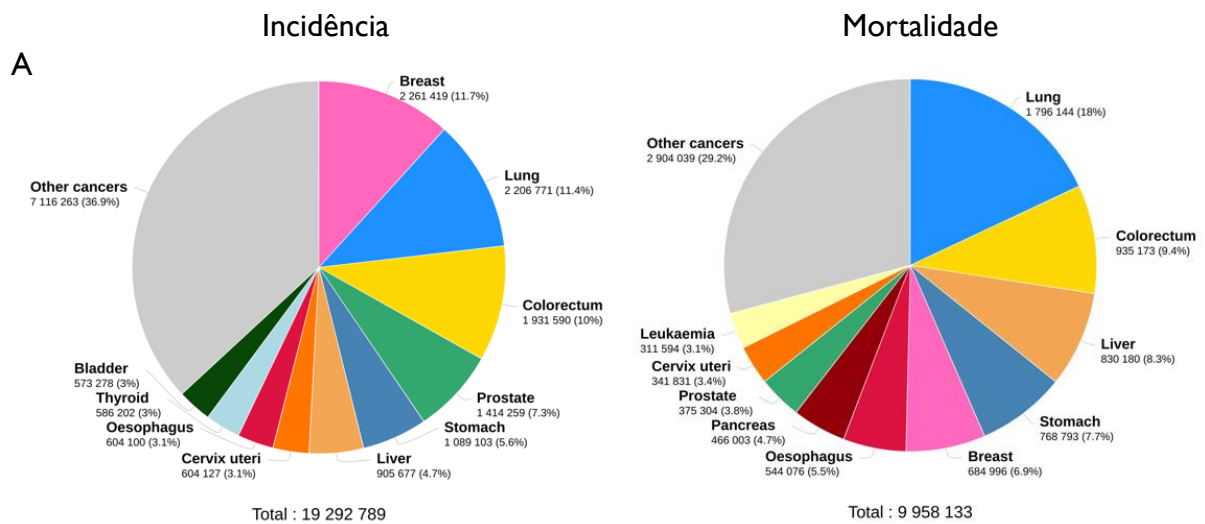
Keywords: Breast cancer, Bladder cancer, Prostate Cancer, Anti-algics, Docetaxel

Introdução

As neoplasias malignas caracterizam-se pela sua capacidade de proliferação celular anormal bem como da sua aptidão para invadir as células e metastizar (Hanahan e Weinberg, 2011). Ainda assim, este é um processo complexo denominado de carcinogénese e na qual as diversas células envolvidas sofrem alterações metabólicas e comportamentais (Leitão Costa, 2020).

I.1. Epidemiologia

Em todo o mundo, no ano de 2020, foram detetados aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de cancro e cerca de 10,0 milhões de mortes por cancro, como indicado na Figura I-A (Sung *et al.*, 2021). No mesmo período de 2018, detetaram-se 18,1 milhões de novos casos e ocorreram cerca de 9,6 milhões de mortes por cancro (Bray *et al.*, 2018). Este aumento deveu-se a diversos fatores, destacando-se o crescimento e envelhecimento da população, causas genéticas, estilos de vida pouco saudáveis e melhorias associadas às técnicas de diagnóstico. Pode ainda contribuir a prevalência de certas causas de cancro associadas ao desenvolvimento social e económico, sobretudo evidente em países de alto rendimento (Leitão Costa, 2020). Na Europa, em 2020, como visível na Figura I-B, foram diagnosticados cerca de 4,4 milhões de novos casos por cancro e cerca de 2 milhões de mortes por este grupo de doenças (Sung *et al.*, 2021).



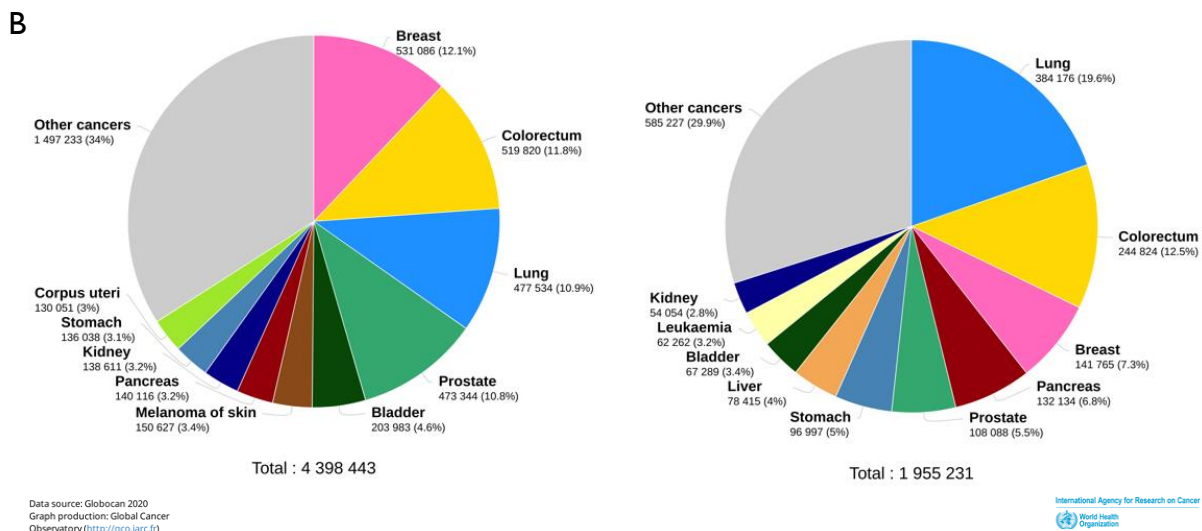


Figura 1: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancro mais comuns em 2020, para ambos os sexos, a nível (A) Mundial e (B) Europeu. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (Sung *et al.*, 2021)].

Em 2020, tanto na Europa como a nível global, o cancro da mama (CaM) foi considerado o tipo de cancro mais diagnosticado, ultrapassando o cancro do pulmão. De facto, foram diagnosticados cerca de 2,3 milhões de novos casos de CaM e mais de 680 milhares de mortes por esta patologia em todo o mundo (Figura 1). No sexo feminino, este tipo de cancro foi inclusive considerado a maior causa de mortalidade por cancro como observado na Figura 2-A (Sung *et al.*, 2021).

No sexo masculino, o carcinoma da próstata (CaP) é o segundo tipo de neoplasia mais frequentemente diagnosticado assim como a quinta causa de morte a nível mundial (Figura 2-B). Em 2020, o CaP foi responsável por mais de 1,4 milhões de novos casos nos homens em todo o mundo estando apenas atrás dos números apresentados para o cancro do pulmão. No mesmo ano registaram-se 375 milhares de mortes por esta patologia como observado na (Figura 2-B) (Sung *et al.*, 2021).

O cancro da bexiga (CaB) é um dos 10 tipos de cancro mais comumente diagnosticados a nível mundial, responsável por cerca de 573 milhares de novos casos e 213 milhares de mortes (Figura 1). É mais comum no sexo masculino, tanto a nível europeu como a nível mundial, sendo inclusive a sexta causa mais comum de cancro e a nona principal causa de morte entre os homens (Figura 2-B) (Sung *et al.*, 2021).

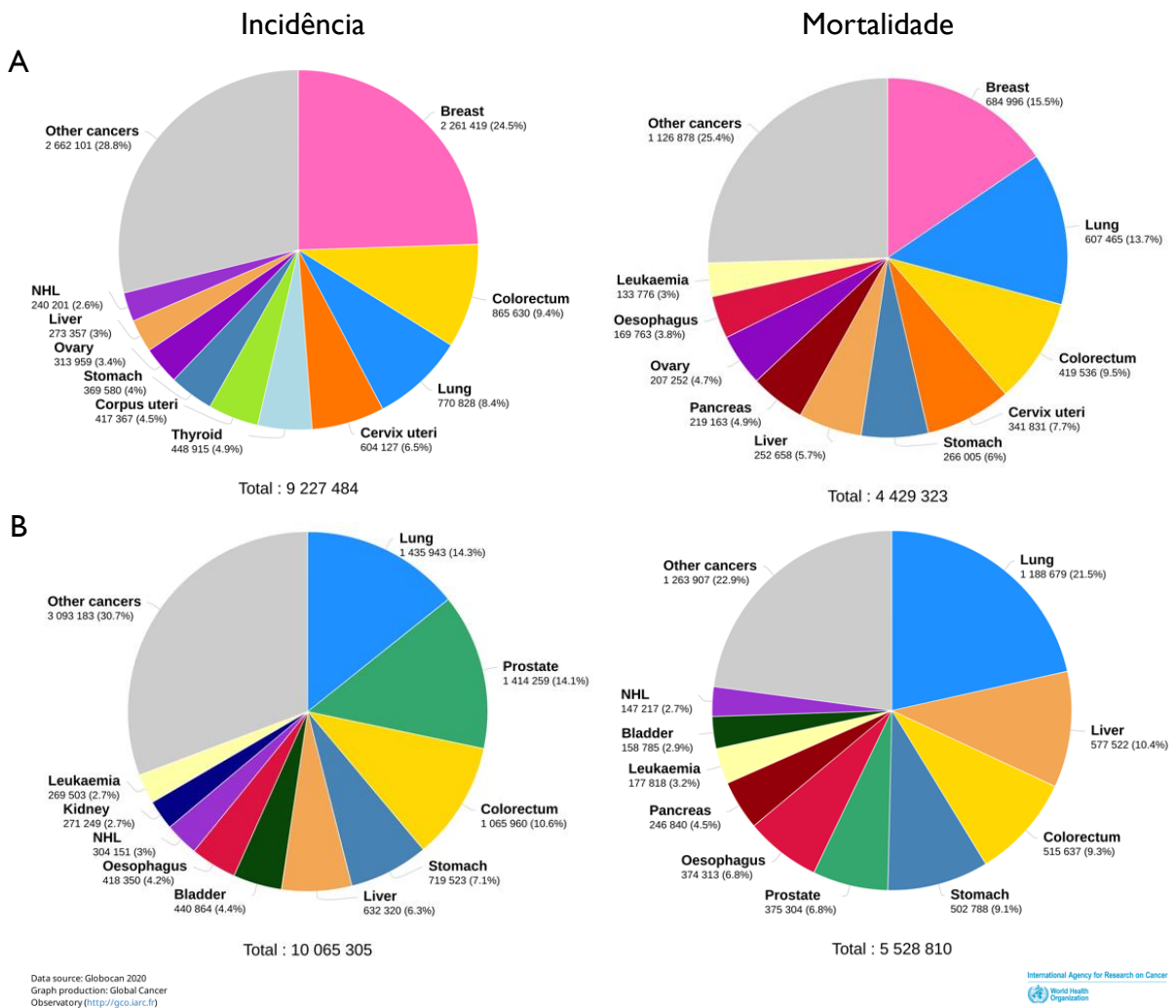
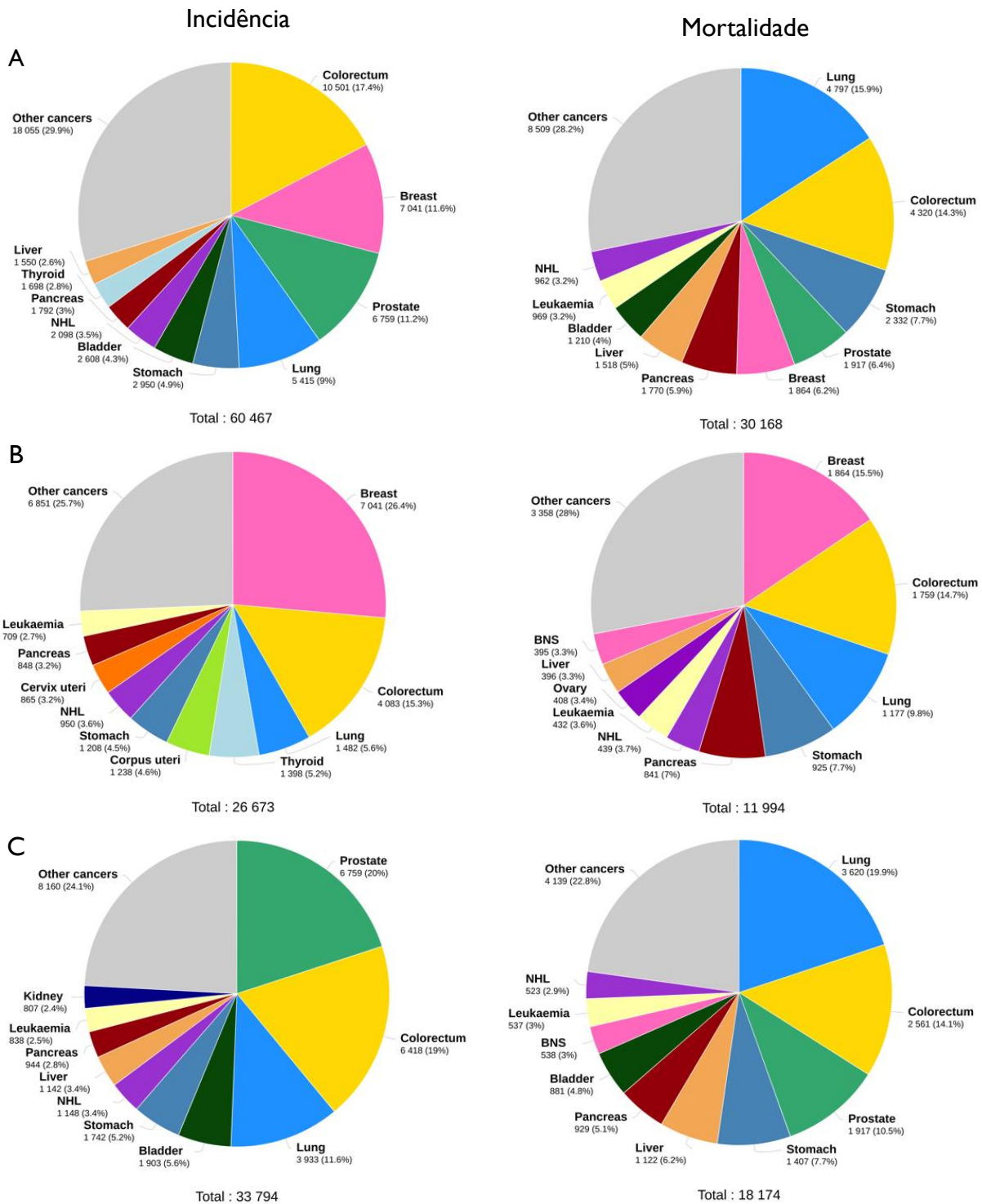


Figura 2: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancros mais comuns em 2020, a nível mundial para o sexo (A) Feminino e (B) Masculino. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (Sung *et al.*, 2021)].

Durante o ano de 2020, em Portugal, registaram-se cerca de 60,5 milhares de novos casos de cancro e 30,2 milhares de mortes por cancro (Figura 3-A), sendo que o CaM, o CaB e o CaP seguem o padrão da Europa e do Mundo para ambos os sexos. De facto, as estatísticas indicam que o CaM foi o tipo de cancro mais incidente (26,4%) e o mais mortal (15,6%) entre o sexo feminino (Figura 3-B). O CaP foi o tipo de neoplasia com maior incidência e a terceira causa de morte oncológica em homens (Figura 3-C). Em 2020, a incidência desta patologia ascendeu a 6759 casos (20%), sendo atribuídas cerca de 1917 mortes (10,5%) a este tumor. O CaB foi o oitavo tipo de cancro mais comumente diagnosticado em Portugal para ambos

os sexos, sendo mais incidente no sexo masculino. Além disso, o CaB foi a oitava causa de morte por cancro (Figura 3 – A). (The Global Cancer Observatory, 2021).



Data source: Globocan 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)



Figura 3: Distribuição dos casos e das mortes para os tipos de cancros mais comuns em 2020, a nível nacional, para (A) Ambos os sexos, (B) Sexo feminino e (C) Sexo masculino. A área do gráfico reflete a proporção do número total de casos ou mortes. [Fonte: (The Global Cancer Observatory, 2021)].

1.2. Cancro da Mama

1.2.1. Mama, Carcinogénese e Fatores de Risco

A mama é constituída pela glândula mamária, tecido fibroso e gordura. Por sua vez, a glândula mamária divide-se em quadrantes e o quadrante superior externo concentra a maioria do volume da mama, sendo este a localização mais comum de CaM (Pandya e Moore, 2011).

O tecido mamário feminino envolve elementos parenquimatosos epiteliais, que tomam cerca de 10-15% do volume total da mama e o estroma, que toma o restante volume (Pandya e Moore, 2011). Os elementos epiteliais são compostos por 15 a 20 lobos que se subdividem em lóbulos. Os ductos secretores convergem no mamilo. Cerca de 40 a 75% dos casos de CaM diagnosticados provêm das células que formam os lóbulos e os ductos terminais (Bombonati e Sgroi, 2011; Johns Hopkins Pathology, 2021).

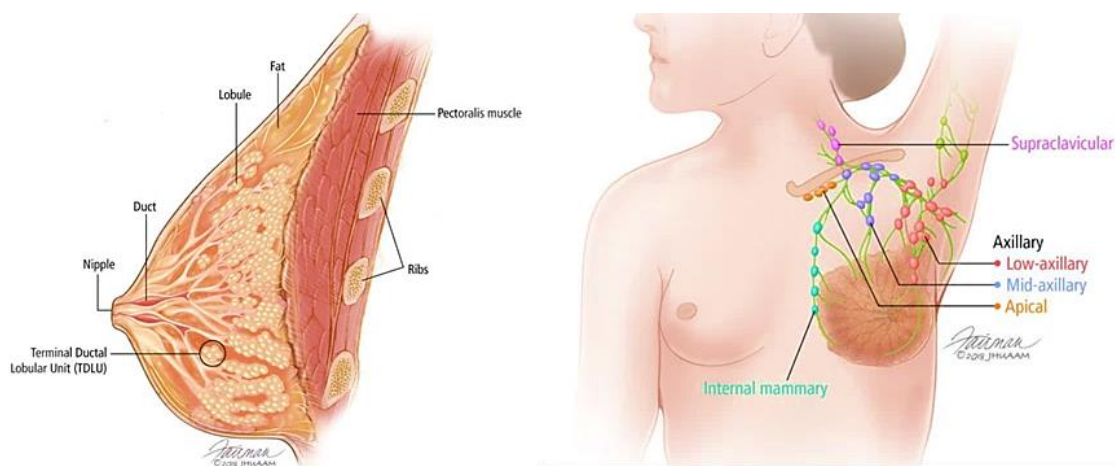


Figura 4: Imagem ilustrativa da anatomia da mama e nódulos linfáticos. [Fonte: (Johns Hopkins Pathology, 2022)].

O CaM pode ser classificado como lobular ou ductal consoante a localização do nódulo, isto, se se formar no lóbulo ou ducto da glândula mamária, respetivamente. Além disso, pode ser considerado não invasivo se não houver invasão dos tecidos envolventes e são exemplos o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ*. A progressão e crescimento do tumor leva ao aparecimento do CaM invasivo (Akram *et al.*, 2017; Harbeck *et al.*, 2019).

O CaM pode ainda ser classificado segundo a presença de recetores, nomeadamente recetores de estrogénio (RE), de progesterona (RP) e HER2 (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*). Estes permitem que as células recebam sinais através da ligação de mensageiros químicos e, conseqüentemente, estimulam o crescimento tumoral (Cardoso *et al.*, 2019). As características moleculares e manifestações clínicas dos diferentes subtipos de CaM estão indicadas na Tabela I.

Tabela 1: Subtipos de CaM e suas características moleculares e manifestações clínicas. Abaixo estão as percentagens de incidência de cada subtipo [Adaptado de (Cardoso *et al.*, 2019)].

Subtipo (Incidência)	Características Moleculares	Manifestações Clínicas
Luminal A (60-70%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo para RE e RP ▪ Negativo para HER2 ▪ Baixo grau ▪ Ki67⁽¹⁾ reduzido 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crescimento lento e menos agressivo ▪ Baixa recorrência e melhor prognóstico ▪ Responde à terapia endócrina
Luminal B HER2⁺ (13-15%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo para RE ou RP ▪ Positivo para HER2 ▪ Grau elevado ▪ Qualquer valor Ki67⁽¹⁾ 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevadas taxas de proliferação ▪ Pior prognóstico que o subtipo Luminal A ▪ Maior sensibilidade à quimioterapia
Luminal B HER2⁻ (10-20%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo para RE ▪ Negativo para HER2 ▪ Grau elevado ▪ Ki67⁽¹⁾ elevado ou RP positivo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maior sensibilidade à quimioterapia
HER2⁺ (13-15%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Negativo para RE e RP ▪ Positivo para HER2 ▪ Grau elevado ▪ Ki67⁽¹⁾ elevado 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crescimento mais agressivo ▪ Baixa sobrevivência a curto prazo ▪ Existem terapias específicas
Triplo negativo (10-15%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Negativo para RE, RP e HER2 ▪ Grau elevado ▪ Ki67⁽¹⁾ elevado 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Idade mais jovem no diagnóstico ▪ Mau prognóstico a curto prazo ▪ Opções de terapêutica escassas

⁽¹⁾ Ki67, Marcador de proliferação.

Os tumores que expressam RE ou RP são descritos como CaM hormonodependentes (luminal-A e luminal-B). Por outro lado, os tumores que não expressam RE, RP ou HER2 são designados como tumores triplo-negativos. Este último subtipo, traduz-se por uma doença heterogênea que apresenta subtipos, geralmente observado em mulheres em pré-menopausa e apresenta o pior prognóstico (Akram *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de CaM pode estar associado a diversos fatores, destacando-se o papel dos estrogénios e a predisposição genética. O 17 β -estradiol (E₂) é o esteroide do ovário mais predominante em circulação e a hormona biologicamente mais ativa no tecido mamário. Na menopausa, os níveis plasmáticos de E₂ diminuem cerca de 90% (Russo e Russo, 2006). Durante os ciclos menstruais, um desequilíbrio entre os níveis de estrogénio e os níveis de progesterona conduzem ao aumento da proliferação celular e podem provocar uma acumulação de DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) danificado. Com a repetição deste processo em cada ciclo menstrual, pode ocorrer um processo de reparação defeituoso, levando a mutações malignas. O estrogénio liga-se ao RE localizado no núcleo, que é um fator de transcrição nuclear que regula a expressão génica e permite interagir diretamente com proteínas, tais como recetores de fatores de crescimento, a fim de promover a proliferação e a sobrevivência celulares. Assim, o estrogénio atua como promotor de CaM, através da

suplementação endógena e exógena (i.e. contraceptivos orais e terapia hormonal de substituição). Estilos de vida poucos saudáveis, tais como o consumo excessivo de álcool, uma dieta rica em gordura e o excesso de peso, podem acelerar este processo, elevando o nível de hormonas relacionadas com estrogénios no sangue (Harbeck et al., 2019).

Os genes mais frequentemente mutados nas células tumorais de CaM são *TP53* (41% dos tumores), *PIK3CA* (30%) e *ERBB2* (13%). Estes genes codificam moduladores do ciclo celular que podem ser reprimidos (por exemplo, P53) ou ativados (por exemplo, ciclina D1), promovendo a proliferação ou inibindo a apoptose. Os tumores do tipo luminal A têm uma alta prevalência de mutações no gene *PIK3CA* (49%), enquanto os tumores triplo-negativo apresentam uma alta prevalência de mutações no gene *TP53* (84%) (Harbeck et al., 2019). O gene *ERBB2* amplificado conduz à ativação da via de HER2 que, por sua vez, ativa a proliferação e a sobrevivência celulares e a metastização, através de diversas vias, tais como as vias RAS e PI3K/AKT/MAPK (Harbeck et al., 2019).

O CaM hereditário constitui cerca de 5 a 10% dos casos diagnosticados e deve-se a uma mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que em condições ideais, funcionam como genes supressores tumorais. Quando ocorre uma mutação nestes genes, o crescimento anormal da célula deixa de ser suprimido e pode desenvolver-se um tumor. Esta alteração pode ser transmitida de pais para filhos e indivíduos portadores de mutação nestes genes têm um risco superior para CaM em relação à população em geral (Sun et al., 2017).

Para além dos fatores de risco acima mencionados, o sexo feminino, o envelhecimento e a história reprodutiva como a menarca precoce, a menopausa tardia, a idade tardia na primeira gravidez e nunca ter tido uma gravidez estão também associados com esta doença, observando-se o aumento o risco de CaM (Cardoso et al., 2019; Sun et al., 2017).

1.2.2. Diagnóstico e Estadiamento

O diagnóstico precoce e o tratamento atempado e adequado possibilitam ao doente uma maior probabilidade de cura e um melhor prognóstico, uma vez que possibilita a intervenção nas fases mais precoces da doença, verificando-se uma maior eficácia do tratamento na maioria dos casos (Direcção-Geral de Saúde, 2003).

Os exames de diagnóstico precoce utilizados são o exame clínico da mama, exames imagiológicos e a biópsia. No exame clínico, o médico procede à palpação das mamas para procurar alterações e/ou nódulos ou outros sinais da doença (Ginsburg et al., 2020). No que

respeita a exames imagiológicos, estes permitem revelar a presença e a localização de um tumor. Destaca-se a mamografia que é o método imagiológico mais importante no rastreio e no diagnóstico de CaM, o qual utiliza raios-X em baixas doses. Além disso, pode ser realizada uma ecografia que possibilita a avaliação da mama e dos gânglios linfáticos, especialmente os da zona axilar. Este método permite distinguir um quisto de uma massa sólida que pode, ou não, ser maligna. Por fim, a ressonância magnética (MRI, do inglês *Magnetic resonance imaging*) é o método mais sensível para a deteção de CaM, mas apresenta muitos falsos positivos, sendo recomendado apenas em doentes de alto risco. Se o resultado dos exames acima identificados apresentar qualquer anomalia, pode estar indicada a realização de uma biópsia que consiste na remoção de amostras de tecido ou de fluido para análise histológica, na qual se avalia a expressão dos recetores hormonais e da proteína HER2 (Cardoso *et al.*, 2019).

As pessoas com CaM podem ter diferentes prognósticos e têm acesso a um vasto leque de opções terapêuticas que depende de um conjunto de fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento do tumor, o tipo de tumor e a avaliação de risco. A classificação TNM (do inglês, *tumor-node-metastasis*) é o sistema de estadiamento mais comumente utilizado, além de ser considerado o mais consistente, tendo sido desenvolvido por diversas entidades, nomeadamente, pela American Joint Committee on Cancer (AJCC), Union for International Cancer Control (UICC) e pelo TNM Prognostic Factors Committee. Este sistema permite dar informações sobre o tumor, os gânglios linfáticos e as metástases, bem como agrupar os doentes em grupos de prognóstico semelhante. Tal como evidenciado em detalhe na Figura 5, o critério T é definido pelo tamanho do tumor primário, o envolvimento de gânglios linfáticos regionais define o critério N e a presença de metástases à distância define o critério M (Koh e Kim, 2019).

Tumor primário (T)		Invasão ganglionar regional (N)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado	NX	Os gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
T0	Não há evidência de tumor primário Carcinoma <i>in situ</i> Tis (CDIS): Carcinoma ductal <i>in situ</i>	N0	Não há evidência de metástases nos gânglios linfáticos regionais Micrometástases ou metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos axilares N1mi: Micrometástases >0,2 mm ou mais do que 200 células com tamanho <2 mm
Tis	Tis (LCI): Carcinoma lobular <i>in situ</i> Tis (Paget): Doença de Paget do mamilo não associada com carcinoma invasivo e/ou carcinoma <i>in situ</i> Tumor ≤ 2 cm de maior diâmetro T1mi: Tumor ≤ 0,1cm	N1	N1a: Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos axilares, incluindo pelo menos um <2 mm N1b: Gânglios linfáticos da cadeia mamária interna N1c: Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos axilares e gânglios da cadeia mamária interna
T1	T1a: Tumor > 0,1 cm, mas ≤ 0,5cm T1b: Tumor > 0,5 cm, mas ≤ 1cm T1c: Tumor > 1 cm, mas ≤ 2cm	N2	Metástases em 4 a 9 gânglios linfáticos axilares N2a: Metástases em 4 a 9 gânglios linfáticos axilares, incluindo pelo menos um <2 mm N2b: Metástases nos gânglios linfáticos da cadeia mamária interna N2c: Metástases em 10 ou mais gânglios linfáticos axilares (pelo menos um <2 mm)
T2	Tumor > 2cm, mas ≤ 5 cm	N3	N3b: Metástases nos gânglios da cadeia mamária interna na presença de gânglios linfáticos axilares N3c: Metastização dos gânglios linfáticos homolaterais supraclaviculares
T3	Tumor >5cm Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede do tórax ou pele (ulceração ou nódulos na pele) T4a: Extensão para a parede torácica (não inclui invasão muscular peitoral)		
T4	T4b: Ulceração, nódulos cutâneos homolaterais, ou edema cutâneo T4c: Ambos T4a e T4b T4d: Carcinoma inflamatório		
Metástases à distância (M)			
M0	Sem metástases à distância		
M1	Presença de metástases à distância		

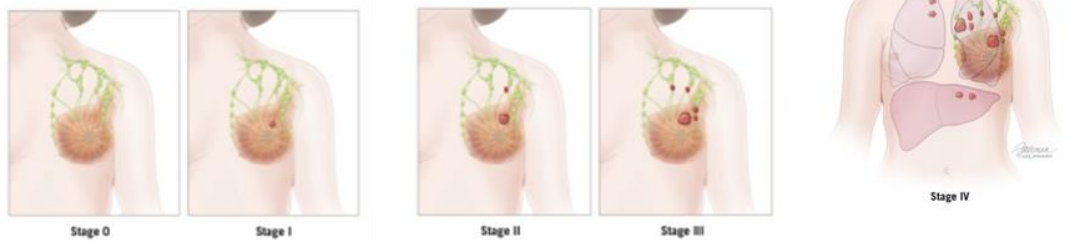


Figura 5: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para CaM, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Koh e Kim, 2019) e (Johns Hopkins Pathology, 2022)].

Os três critérios que estabelecem a classificação TNM permitem categorizar globalmente o CaM em cinco estádios, de 0 a IV. De acordo com este sistema, o CaM de estágio 0 (também designado de CaM *in situ*) é caracterizado pela presença de células malignas confinadas apenas ao tecido mamário, enquanto os estádios I, II, III e IV já envolvem a disseminação para outros tecidos, isto é, o desenvolvimento de extensão locorregional e de metástases à distância (Cardoso *et al.*, 2019).

1.2.3. Carcinoma da Mama Avançado

Em termos gerais, em doentes com CaM não metastático, a taxa de sobrevivência global aos cinco anos (SV5) é superior a 90%, mas esta não é considerada cura. Por outro lado, tem sido reportado que cerca de 30% destes doentes podem desenvolver metástases

após o diagnóstico e tratamento do tumor primário, levando a que a SV5 diminua para 40-80% quando há envolvimento de metástases regionais e para 20% quando há envolvimento de metástases à distância (Allemani *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2020). No momento do diagnóstico do CaM, estima-se que um terço dos doentes já apresente doença metastática (Martins, 2017).

O CaM metastiza para diversos órgãos, essencialmente para o osso em cerca de 80% dos casos e, neste caso, apresenta uma SV5 de cerca de 30%. Alternativamente, cerca de 20 a 50% dos doentes apresentam metástases pulmonares e um SV5 de aproximadamente 17%. Cerca de 2-12% dos doentes apresentam metástases hepáticas, contudo, tem um SV5 de cerca de 9%. Cerca de 15 a 30% dos doentes apresentam metástases (Fernandes e Cortes, 2020; Liang *et al.*, 2020). As metástases viscerais, nomeadamente hepáticas e pulmonares, são normalmente assintomáticas, no entanto podem provocar náuseas, perda de peso e dores no peito e abdómen entre outros (American Cancer Society, 2020).

As lesões ósseas podem conduzir a complicações como a hipercalcemia e a anemia, que induzem alterações na estrutura e na integridade óssea, resultando em fragilidade óssea. Esta, por sua vez, pode resultar no surgimento de eventos relacionados com o esqueleto (SREs, do inglês *skeletal-related events*), como o aumento de fraturas patológicas e da compressão na medula espinhal, que promovem dores severas, diminuição da qualidade de vida (QdV) e aumento da mortalidade (Liang *et al.*, 2020). Cerca de 50 a 90% dos doentes com metástases ósseas apresentam dor intensa, particularmente na zona lombar (Li, Wong e Pavlakis, 2014).

1.2.4. Opções Terapêuticas

O objetivo dos tratamentos é, no caso de estádios mais iniciais, a cura e a prevenção da recorrência metastática. No caso de estádios mais avançados (possivelmente com metástases) o objetivo passa pelo prolongamento da vida do doente, atenuação de sintomas e, por consequência, a melhoria da QdV (Direcção-Geral de Saúde, 2003). Na Tabela 2 apresentam-se os diversos estádios existentes de CaM com uma breve descrição geral, de acordo com os critérios TNM, e suas opções terapêuticas (Cardoso *et al.*, 2019).

Tabela 2: Descrição dos estádios de CaM de acordo com os critérios TNM e opções terapêuticas. [Adaptado de (Cardoso *et al.*, 2019)].

Estádio	T ⁽¹⁾	N ⁽²⁾	M ⁽³⁾	Opções terapêuticas
0	Tis ⁽⁴⁾	N0	M0	Cirurgia com possível radioterapia
I IA	TI	N0	M0	Cirurgia e Radioterapia

Anti-álgicos na resposta terapêutica dos carcinomas da mama, bexiga e próstata

II	IB	T0-T1	N1mi ⁽⁵⁾	M0	Tratamento adjuvante ou neoadjuvante sistêmico
	IIA	T0-T1	N1	M0	
		T2-T3	N0	M0	
IIIB	T2	N1	M0		
III	IIIA	T0-T2	N2	M0	Tratamento neoadjuvante sistêmico Cirurgia com possível radioterapia
		T3	N1-N2	M0	
	IIIB	T4	N0-N2	M0	
	IIIC	Qualquer T	N3	M0	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	Tratamento adjuvante sistêmico Radioterapia e Cirurgia	

⁽¹⁾ T, tumor primário; ⁽²⁾ N, gânglios linfáticos regionais; ⁽³⁾ M, metástases à distância; ⁽⁴⁾ Tis, *in situ*; ⁽⁵⁾ mi, micrometástase

A quimioterapia (QT) neoadjuvante visa o controlo da doença e cerca de 80% dos doentes cuja doença é considerada inoperável ao diagnóstico são candidatas a cirurgia após a realização de QT (Coudert *et al.*, 2006). Por outro lado, a QT adjuvante, a mais comum na terapêutica de CaM, é usada como uma medida de profilaxia para prevenir o crescimento de células neoplásicas remanescentes, após cirurgia ou radioterapia, e como terapêutica paliativa, quando já não é possível controlar o curso natural da doença. A QT está assim associada a menor recorrência local, morbidade e mortalidade assim como a um melhor prognóstico. Em tumores com sobreexpressão de HER2 geralmente administra-se terapia específica e dirigida ao HER2. Os doentes com CaM triplo-negativo não são candidatos à terapia hormonal nem à terapia dirigida ao HER2, sendo a QT a única opção terapêutica antes ou depois da radioterapia (Cardoso *et al.*, 2019).

No que concerne a terapêutica sistêmica para CaM, destacam-se os regimes terapêuticos baseados nas antraciclinas, como a doxorrubicina e a epirrubicina, seja em monoterapia ou em associação a ciclofosfamida, o 5-fluorouracil ou o docetaxel (Fernandes e Cortes, 2020).

1.2.4.1. Antraciclinas: Doxorrubicina e Epirrubicina

As antraciclinas fazem parte do grupo dos antibióticos antitumorais. Este grupo pertence aos agentes antineoplásicos mais importantes (Anampa, Makower e Sparano, 2015). O seu mecanismo de ação passa pela indução da apoptose celular devido à sua capacidade de intercalarem o DNA, afetando diretamente a transcrição e a replicação. As antraciclinas reagem com a topoisomerase II, a enzima responsável pela quebra das ligações de hidrogénio entre os pares de bases do DNA antes da sua replicação. A inexistência das quebras das

ligações, impossibilita a transcrição celular, o que acaba por induzir a apoptose das células. A doxorubicina e a epirubicina são compostos quinona que permitem ainda aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio através de ciclos redox na qual estas quinonas são reduzidas a semiquinonas, contribuindo para a sua citotoxicidade. Deste modo, por inibirem a síntese de DNA por uma série complexa de ações, as antraciclina não são específicas para o ciclo celular (Singh Yadav *et al.*, 2014; Westbrook e Stearns, 2013).

A doxorubicina é um composto sintetizado a partir de um fungo denominado de *Streptococcus peucetius* variante *caesius*. É um dos fármacos quimioterapêuticos mais eficazes utilizado para tratar o CaM e é administrado através de injeção intravenosa ou por infusão contínua (Anampa, Makower e Sparano, 2015). No entanto, este fármaco está associado ao aumento do risco de infecções devido à diminuição abrupta de glóbulos brancos e a cardiotoxicidade, originada pela inibição da topoisomerase-II β nos cardiomiócitos, pela formação de espécies reativas de oxigênio e pela acumulação de produtos metabólicos (McGowan *et al.*, 2017). A doxorubicina pode levar a uma disfunção ventricular, que pode evoluir para cardiomiopatia grave, para a insuficiência cardíaca congestiva e, inclusivamente, ser fatal. Ainda assim, o aparecimento de cardiomiopatia depende da dose cumulativa de doxorubicina, com uma incidência de cerca de 4% quando a dose total de doxorubicina atinge os 500-550 mg/m², de 18% quando atinge os 551- 600 mg/m² e 36% quando a dose excede os 600 mg/m² (Chatterjee *et al.*, 2010).

Como forma de ultrapassar a limitação do uso da doxorubicina, surgiu a epirubicina que é um estereoisómero da doxorubicina e a diferença entre estes compostos reside na epimerização do grupo hidroxilo na posição C-4' do anel de daunosamina (Khasraw, Bell e Dang, 2012). Esta alteração tem pouca interferência no espectro de ação bem como no mecanismo de ação, mas induz importantes alterações nas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. Em particular, a epirubicina é uma base mais fraca e mais lipofílica que a doxorubicina. Consequentemente, a epirubicina apresenta, em comparação com a doxorubicina, uma glucuronidação exclusiva pela UDP-glucuronosiltransferase 2B7 e, consequentemente, uma semi-vida mais curta. Assim, estas modificações, alteram a atividade anti-proliferativa relacionada com a dose de epirubicina, bem como apresentam cardiotoxicidade significativamente menor, em comparação com a doxorubicina, quando administrada em doses que resultam em níveis idênticos de mielossupressão (Khasraw, Bell e Dang, 2012; Mordente *et al.*, 2009).

1.3. Cancro da Bexiga

1.3.1. Bexiga, Carcinogênese e Fatores de Risco

A bexiga é um órgão oco, situado na parte inferior do abdômen, capaz de expandir e contrair para armazenar ou expulsar a urina produzida pelos rins, conforme necessário (American Society of Clinical Oncology, 2020). Tal como descrito na Figura 6, a sua parede é constituída por diversas camadas: o urotélio ou camada mucosa (camada mais interna da bexiga formada por células epiteliais), a camada submucosa ou lâmina própria (composta por tecido conjuntivo estromal, vasos sanguíneos e a *muscularis mucosae*), a muscular própria ou músculo detrusor (composto por três camadas de músculo liso) e mais externamente, a camada serosa. Esta camada é constituída por tecido adiposo, tecido fibroso e vasos sanguíneos (Hickling, Sun e Wu, 2015).

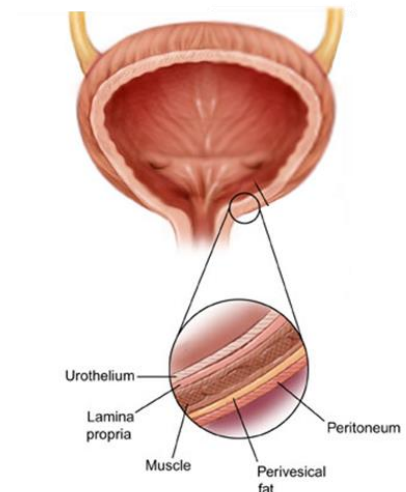


Figura 6: Imagem ilustrativa da anatomia da bexiga. [Adaptado de (Urology Care Foundation, 2020)].

O CaB pode desenvolver-se quando as células da bexiga proliferam de forma descontrolada. Consoante o tipo histológico que origina o tumor, pode classificar-se os diversos tipos de CaB. (Lenis, Lec e Chamie, 2020).

O carcinoma urotelial ou carcinoma de células de transição (TCC, do inglês *transitional cell carcinoma*) é o tipo mais comum de CaB, correspondendo a cerca de 90% dos casos diagnosticados e tem origem nas células da camada interna denominadas por células de transição (American Cancer Society, 2019). Pode ser classificado de acordo com o grau de invasão da parede da bexiga, como cancro não-músculo invasivo da bexiga (NMIBC, do inglês *non-muscle invasive bladder cancer*) ou cancro músculo invasivo da bexiga (MIBC, do inglês *muscle invasive bladder cancer*). No primeiro tipo, o tumor permanece circunscrito na camada

mais interna do epitélio de transição, sem atingir as camadas mais profundas. Quando o tumor atinge as camadas mais profundas da bexiga denomina-se de MIBC, em que o tumor afeta a lâmina própria ou penetra a musculatura. Esta última subforma é potencialmente mais agressiva e propaga-se frequentemente para outros tecidos ou órgãos, formando metástases. São exemplos de CaB invasivos o adenocarcinoma, que tem origem nas células das glândulas do revestimento que produzem muco, e o carcinoma de células escamosas, que tem origem nas células finas e planas do revestimento da bexiga (American Cancer Society, 2019; National Cancer Institute, 2016).

O desenvolvimento de CaB está associado a diversos fatores de risco, dos quais se destaca o tabagismo e a exposição a determinados carcinogêneos. Os indivíduos fumadores, cerca de 50% dos casos diagnosticados, apresentam um risco três vezes superior de vir a desenvolver CaB em comparação com não fumadores uma vez que o fumo do tabaco contém substâncias que, processadas endogenamente, chegam à bexiga através da urina (Powles *et al.*, 2022). No entanto, outros fatores de risco podem ser considerados, como infecções crônicas das vias urinárias, polimorfismos genéticos de alguns genes, como os genes *RBI* e *PTEN/MMAC1*, antecedentes familiares, sexo masculino e envelhecimento (American Cancer Society, 2019).

1.3.2. Diagnóstico e Estadiamento

O diagnóstico de CaB é feito através de uma avaliação clínica completa do doente com o intuito de averiguar o estado de saúde geral e eventuais sinais ou sintomas. Em casos de suspeita de CaB, o diagnóstico final é feito recorrendo a análises de urina para detetar a presença de sangue ou células tumorais e à citoscopia com o objetivo de visualizar a bexiga e detetar a presença de tumores (American Cancer Society, 2019). Pode ainda recorrer-se a exames como a tomografia computadorizada (TC), a MRI, atomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) e a ecografia para identificar infiltrações nos tecidos e propagação para órgãos adjacentes (American Society of Clinical Oncology, 2020; Powles *et al.*, 2022).

O estadiamento de CaB é feita de acordo com o sistema TNM descrito no Figura 7, onde o critério T diz respeito ao tamanho do tumor, o envolvimento dos gânglios linfáticos define o critério N e a existência de metástases à distância define o critério M. A combinação dos diferentes parâmetros de avaliação da classificação TNM permite uma avaliação mais

cuidada das decisões terapêuticas, o agrupamento dos doentes pelos diferentes estádios da doença e a avaliação do prognóstico para cada doente (Babjuk *et al.*, 2022; Sanguedolce *et al.*, 2015).

Tumor primário (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "tumor plano"
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial
T2	O tumor invade o músculo
T2a:	O tumor invade o músculo superficial (metade interna)
T2b:	O tumor invade o músculo profundo (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical:
T3a:	Invasão microscópica
T3b:	Invasão macroscópica (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas:
T4a:	O tumor invade a próstata, o útero ou a vagina
T4b:	O tumor invade a parede pélvica ou a parede abdominal
Invasão ganglionar regional (N)	
NX	Nódulos linfáticos regionais não acessíveis
N0	Não há envolvimento de nódulos linfáticos regionais
N1	Metástases em num único gânglio linfático
N2	Metástases em dois ou mais nódulos na cavidade pélvica
N3	Envolvimento de qualquer nódulo nas artérias ilíacas
Metástases à distância (M)	
M0	Sem metástases à distância
M1	M1a: Metástases em nódulos linfáticos distantes
M1b:	Presença de outras metástases à distância tais como nos ossos, pulmões e fígado

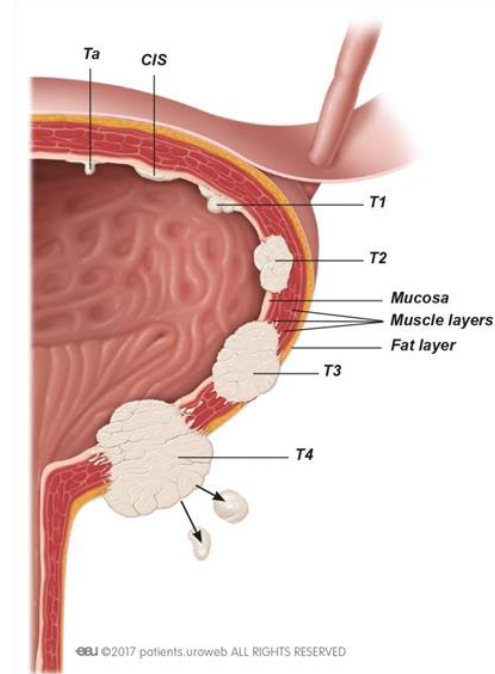


Figura 7: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para o CaB, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Babjuk *et al.*, 2022) e (European association of urology, 2021)].

1.3.3. Carcinoma da Bexiga Avançado

Em estádios de doença mais precoces, a hematúria macroscópica indolor é o sinal mais comum (85%) entre os doentes diagnosticados com CaB (Rebola, 2019). Neste tipo de CaB, a SV5 é de 96%. Contudo, estes tumores, geralmente removidos por cirurgia, tendem a reincidir em cerca de 40-70% dos casos ao fim de dois anos, e a progredir para a invasão muscular em aproximadamente 20% dos casos. Ainda assim, 30% dos casos diagnosticados já apresentam invasão do músculo detrusor (Martini *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2018).

O CaB pode propagar-se a outras regiões além da bexiga como os gânglios linfáticos (25,4%), diminuindo a SV5 para 40% ou para locais à distância como os ossos (24,7%), o trato urinário (23,5%), o fígado (19,4%), os pulmões (18,1%) e o cérebro (3,1%), diminuindo a SV5 para 10%. Aproximadamente 10-15% dos casos diagnosticados com CaB já apresentam metástases a quando do diagnóstico (American Society of Clinical Oncology, 2022; Mushtaq,

Thurairaja e Nair, 2019). Particularmente, as metástases ósseas localizam-se mais frequentemente nos ossos da bacia (68%), na coluna vertebral (cervical 12%, torácica 38% e lombar 34%), nas costelas (24%) e no fémur (22%) (Stellato *et al.*, 2021). Esta localização das metástases promovem o aparecimento de dor severa, além de fraturas patológicas devido à fragilidade óssea. A disseminação linfática, por sua vez, manifesta-se sobretudo por insuficiência renal, hidronefrose e dor abdominal. As metástases viscerais, nomeadamente hepáticas e pulmonares, podem provocar náuseas, perda de peso e dores no tórax e no abdómen, entre outros. Estas lesões culminam na diminuição da QdV do doente (Chin, Siddiqui e Tran, 2017).

I.3.4. Opções Terapêuticas

Cerca de 75% dos doentes apresentam NMIBC que se manifesta essencialmente a nível da mucosa (Ta e Tis ou Cis) ou sub-mucosa (T1). Apesar destes tumores apresentarem um prognóstico favorável, têm uma elevada taxa de recidiva. Aproximadamente 15% dos doentes são diagnosticados com MIBC, classificado com T2, T3 e T4, visto que apresentam invasão do tecido muscular da bexiga. Os tumores do tipo T4 apresentam também extensão para os órgãos e para as regiões envolventes da bexiga (Babjuk *et al.*, 2022; Sanguedolce *et al.*, 2015). Na Tabela 3 encontram-se os estádios de CaB, de acordo com os critérios TNM, e suas opções terapêuticas (Babjuk *et al.*, 2022).

Tabela 3: Descrição dos estádios de CaB, de acordo com os critérios TNM, e suas opções terapêuticas. [Adaptado de (Babjuk *et al.*, 2022)].

Estádio	T⁽¹⁾	N⁽²⁾	M⁽³⁾	Opções terapêuticas
0	Ta-Tis	N0	M0	Ressecção transuretral QT
I	T1	N0	M0	Imunoterapia Cistectomia
II	T2a-T2b	N0	M0	Cistectomia radical
III	T3a-T3b	N0	M0	QT neoadjuvante
	T4a	N0	M0	Radioterapia
	T4b	N0	M0	
IV	Qualquer T	N1-N3	M0	QT adjuvante
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Imunoterapia

⁽¹⁾ T, tumor primário; ⁽²⁾ N, gânglios linfáticos regionais; ⁽³⁾ M, metástases à distância

Em estádios da doença mais precoces (estádios 0 e I), o objetivo principal do tratamento é a cura, pelo que se recorre à ressecção transuretral para remover completamente

o tumor e adicionalmente a terapia intravesical adjuvante (QT ou a imunoterapia), de modo a minimizar a possibilidade de recidiva. No caso de não existir resposta aos tratamentos anteriores recorre-se à cistectomia. No entanto, em estádios mais avançados desta patologia (estádios II e III), nos quais já não é medicamento recomendável ou possível a excisão do tumor por completo, a terapêutica visa, principalmente, atacar as células tumorais através de terapêuticas adjuvantes. Deste modo, a terapêutica associada ao controlo do CaB pode incluir a cirurgia após quimioterapia nos casos em que haja diminuição do tumor, ou pode recorrer-se à cistectomia radical ou à radioterapia. Ainda assim, o tratamento de CaB metastizado (estádio IV) é feito essencialmente por quimioterapia ou por imunoterapia. O tipo de tratamento eleito dependerá de diversos fatores, tais como o estado geral do doente, a idade, o estágio do tumor, a preferência do doente e os possíveis efeitos secundários (Babjuk *et al.*, 2022).

As opções quimioterapêuticas convencionais para o CaB incluem, essencialmente, o antimetabolito gemcitabina e o composto de platina, cisplatina, em monoterapia ou em associação, nos casos mais avançados (Chin, Siddiqui e Tran, 2017).

1.3.4.1. Gemcitabina

A gemcitabina ou dFdC (2,2'-difluorodesoxicitidina) é um antimetabolito análogo da citidina. Durante o processo de replicação do DNA, a molécula de gemcitabina liga-se à guanosina, ao invés da citidina, impedindo a síntese de DNA (terminação da cadeia mascarada) e induzindo a morte por apoptose. Além disso, a gemcitabina é um pró-fármaco que, por ação de desoxicitidina cinases gera anabolitos ativos, nomeadamente o dFdC difosfato e o dFdC trifosfato. O dFdC difosfato inibe a ribonucleotídeo redutase responsável pela catálise de reações que originam os desoxinucleótidos-trifosfatos para a síntese do DNA. Por outro lado, o dFdC trifosfato integra-se na cadeia de DNA provocando a terminação desta (Cavalcante e Monteiro, 2014; Toschi *et al.*, 2005).

A administração de gemcitabina é feita por perfusão intravenosa durante 30 minutos e a sua ação citotóxica, *in vitro*, demonstrou ser específica para a fase S do ciclo celular e de forma dependente da concentração e do tempo. Em monoterapia é um fármaco geralmente bem tolerado pelos doentes e o seu perfil de toxicidade pode variar de acordo com o regime de administração. O regime em que as administrações são próximas está associado a uma elevada resposta ao tratamento e, por outro lado, os regimes em que as administrações são feitas com uma diferença de 4 ou 5 dias têm associada uma baixa resposta à terapêutica.

Apresenta como efeitos adversos neutropenia, trombocitopenia, anemia, dispneia, cefaleia e o aumento das transaminases hepáticas, da fosfatase alcalina e da bilirrubina (Cavalcante e Monteiro, 2014; Toschi *et al.*, 2005).

I.3.4.2. Cisplatina

A cisplatina é um composto inorgânico que contém um átomo metálico [Cis-diaminedicloridoplatina (II)] e atua, sobretudo, através da inibição da síntese de DNA. A cisplatina ao entrar nas células tumorais, liga-se ao DNA nuclear. Este composto de platina, pouco solúvel em água e estável à temperatura e pressão normais, é composto por um átomo de platina ligado a dois íons cloreto (Cl) e a dois grupos amónia (NH₃), ambos na posição *Cis* como observado na Figura 8. Os ligandos de cloro são substituídos por água, formando-se aductos de cisplatina com carga positiva, que se ligam irreversivelmente às bases nucleotídicas do DNA formando aductos de platina-DNA. Este processo leva à inibição da replicação e da transcrição de DNA, levando à indução da apoptose das células tumorais (Kenny *et al.*, 2017).

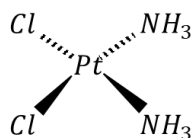


Figura 8: Estrutura do isómero *Cis* do complexo diaminocloroplatina (II), cisplatina. [Adaptado de (Kenny *et al.*, 2017)].

No que respeita ao tratamento do cancro, a cisplatina é administrada por via intravenosa. Ainda assim, a sua utilização contínua apresenta várias limitações, tais como a resistência por parte de diversos tipos de cancro e ainda diversos efeitos indesejáveis e graves, tais como a nefrotoxicidade, a ototoxicidade, a neurotoxicidade, a cardiotoxicidade e a supressão mieloide (Silva, 2012; Tchounwou *et al.*, 2021).

I.3.4.3. Associação de Gemcitabina e Cisplatina

Em doentes com CaB avançado é comum recorrer-se à associação de gemcitabina com cisplatina para controlo da doença. Estudos *in vitro* têm demonstrado interações sinérgicas entre estes dois fármacos, possivelmente devido ao aumento da formação de aductos de cisplatina-DNA. Ainda assim, foi demonstrado que quando a gemcitabina é administrada em associação com derivados de platina, o risco de neutropenia e de trombocitopenia é maior (Chin, Siddiqui e Tran, 2017; Moorsel, Van *et al.*, 1999; Toschi *et al.*, 2005).

I.4. Cancro da Próstata

I.4.1. Próstata e Carcinogénese

A próstata é um órgão músculo-glandular localizado no compartimento subperitoneal, entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal, imediatamente por baixo da bexiga (Lee, Akin-Olugbade e Kirschenbaum, 2011). A sua função principal como glândula acessória da reprodução é segregar um fluido alcalino, parte do ejaculado e que auxilia na motilidade e na nutrição dos espermatozoides (Drudge-Coates e Turner, 2012).

Tal como observado na Figura 9, a glândula prostática é constituída maioritariamente por três zonas glandulares, a zona periférica, a zona central e a zona de transição, que se distinguem entre si histológica e biologicamente (McNeal, 1988). A zona periférica corresponde a cerca de 70% do volume da porção glandular da próstata e constitui o local de origem de 70-80% do CaP (Sinnott *et al.*, 2015). A zona central constitui 25% do volume da porção glandular da próstata e rodeia os canais ejaculadores, por onde o esperma vai passar para a uretra. A zona de transição constitui cerca de 5% do volume e, é normalmente, a zona onde se desenvolve a hiperplasia benigna da próstata. Além das zonas glandulares, McNeal descreve ainda uma zona não glandular composta por tecido muscular e fibroso denominada de estroma fibromuscular anterior (McNeal, 1969, 1988).

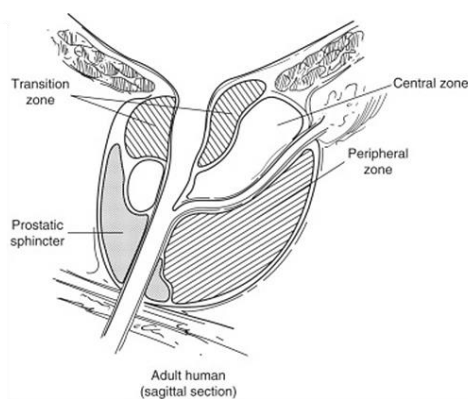


Figura 9: Imagem representativa da anatomia da glândula prostática. [Fonte: (Ittmann, 2018)].

O epitélio glandular da próstata humana é constituído, maioritariamente, por três tipos de células: as luminais ou secretoras, as basais e as neuroendócrinas. As células luminais são responsáveis por segregar diversos produtos para o lúmen, e contribuem para a formação do líquido seminal. Estes produtos incluem o antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *prostate-specific antigen*). As células basais são adjacentes à membrana basal, e são menos abundantes que as anteriores. A ausência destas células pode ser um marcador determinante de CaP (Ittmann, 2018). As células neuroendócrinas são células reguladoras intra-epiteliais que

segregam serotonina e diversas hormonas peptídeas, regulam o crescimento e a diferenciação das células prostáticas e estão envolvidas na regulação da atividade secretora exócrina (McNeal, 1969; Sant'agnese, 1998).

A próstata pode ser afetada por diversas patologias de lenta evolução e manifestação. Dentro destas destaca-se a prostatite, a hiperplasia benigna prostática (HBP) e o CaP. A prostatite consiste na inflamação da próstata. Por sua vez, na HBP verifica-se um aumento do volume da próstata desencadeado pelo aumento do número de células epiteliais e do estroma da zona de transição, pelo que esta hiperplasia é mais frequentemente nesta zona. A HBP depende de androgénios para o seu desenvolvimento (Krušlin *et al.*, 2017; Sciarra *et al.*, 2008).

O CaP é marcado por um crescimento descontrolado de células malignas na glândula prostática. O seu desenvolvimento está, frequentemente, associado à neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HGPIN, do inglês *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*). De facto, a HGPIN e o CaP apresentam diversas semelhanças como a localização preferencial na zona periférica, as transições morfológicas e a partilha de vários marcadores genéticos e moleculares. A neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), consiste numa displasia das glândulas prostáticas que revestem o epitélio e esta lesão pode preceder o CaP, em 10 ou mais anos, acompanhada de diversos processos moleculares (Brawer, 2005; Sciarra *et al.*, 2008).

1.4.2. Fatores de Risco

O desenvolvimento de CaP está maioritariamente associado a três principais fatores de risco, sendo o mais significativo a faixa etária, seguido da etnia e da predisposição familiar. De facto, a taxa de incidência aumenta drasticamente com o avanço da idade, verificando-se que cerca de 75-85% dos casos estão registados em homens com mais de 65 anos. São raros os registos de ocorrência de CaP antes dos 40 anos de idade (Drudge-Coates e Turner, 2012; Rawla, 2019).

A etnia é outro fator de risco que faz variar as taxas de incidência de CaP. Os indivíduos de etnia negra estão associados a um maior risco de CaP avançado e agressivo em idade jovem, sendo geralmente afetados por esta doença cerca de 2-3 anos mais cedo que os homens caucasianos. Esta relação entre a etnia e o desenvolvimento de CaP poderá ser explicada pela interação entre fatores epidemiológicos e genéticos (Hussein, Satturwar e Kwast, van der, 2015). Pressupõe-se que os homens de etnia negra têm acesso a cuidados de saúde de menor qualidade, e conseqüentemente, são mais suscetíveis a um diagnóstico tardio desta doença. Além disso, os indivíduos com descendência africana, com ou sem CaP, apresentaram níveis

de PSA e de testosterona significativamente mais elevados quando comparado com homens de etnia caucasiana (Vijayakumar *et al.*, 1998). Deste modo, outra possível explicação são as alterações na expressão de genes associados à manutenção dos níveis de testosterona em circulação, tal como o *SRD5A2* (Zeigler-Johnson *et al.*, 2008), ou de genes associados à supressão de tumores como o *EphB2* ou de regulação da apoptose celular como o *BCL-2* (Rawla, 2019).

Outro fator que desempenha um papel de destaque na incidência de CaP é a predisposição genética, responsável por 5-10% dos casos desta patologia. O CaP hereditário manifesta-se, geralmente em idades mais jovens e em particular, o risco relativo de desenvolver CaP aumenta de 1,5 para 2,5 em homens cujos familiares de primeiro grau tenham sido diagnosticados com CaP, antes dos 60 anos em comparação com a população em geral (Hussein, Satturwar e Kwast, van der, 2015). Esta relação entre a predisposição genética e o aumento da incidência de CaP poderá ser explicada pela presença de fatores genéticos bem como um padrão semelhante de exposição a certos carcinogêneos ambientais e hábitos de vida comuns (Rawla, 2019). Diversos genes predisponentes têm sido identificados, em várias regiões cromossômicas. Destacam-se as mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, associadas a apresentações da doença mais precoces e agressivas e caracterizadas por uma elevada taxa de metastização, bem como uma maior taxa de mortalidade em comparação com os indivíduos não portadores. As mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por 0,9-1,25% e 1,2-5,3% dos casos de CaP hereditário, respetivamente (Hussein, Satturwar e Kwast, van der, 2015; Vietri *et al.*, 2021). O gene *HOXB13* interage com o recetor de androgénios (RA), promovendo o desenvolvimento e a diferenciação da próstata normal em carcinoma. Os portadores de mutações neste gene constituem 0,6-6,25% dos casos de CaP hereditário (Vietri *et al.*, 2021). A síndrome de *Lynch* tem também sido associada ao aumento da incidência desta patologia (Hsing e Chokkalingam, 2006).

Outros fatores tais como a obesidade, o tabagismo, a ingestão de gordura animal, os níveis mais elevados de androgénios, a radiação ionizante utilizada em técnicas de diagnóstico e a inflamação crónica da próstata estão associados a um maior risco e incidência de CaP. Por outro lado, a ingestão de vegetais e de vitamina E e níveis mais baixos de testosterona livre podem estar associados a um menor risco de desenvolver CaP. Além disso, a existência de diabetes poderá correlacionar-se inversamente com o risco para o CaP e exposição à radiação solar UV está inversamente associada à incidência e à mortalidade por CaP devido à síntese e papel fisiológico da vitamina D (Feng *et al.*, 2020; Mullins e Loeb, 2012; Rawla, 2019; Stallone *et al.*, 2014; Venkateswaran e Klotz, 2010; Watts *et al.*, 2018).

I.4.3. Diagnóstico e Estadiamento

Durante a última década, observou-se um aumento da taxa de incidência de CaP, mas por outro lado, a taxa de mortalidade diminuiu cerca de 7% desde 2015. Esta diminuição pode estar associada à detecção e diagnóstico mais precoces, bem como ao aumento do número de opções terapêuticas disponíveis e eficazes (Carioli *et al.*, 2020).

O rastreio é efetuado com recurso a dois exames: a pesquisa do PSA e o toque retal. Se o resultado destes exames apresentar anomalias poderá ser indicada a realização de uma biópsia prostática ou o uso de outras técnicas de imagem tais como a ecografia prostática transretal (ET), a MRI, a TC, a cintigrafia óssea e a PET que permitem determinar as características associadas à glândula prostática e CaP (American Cancer Society, 2019).

O PSA é uma glicoproteína serino-protease produzida em concentrações elevadas pelo epitélio prostático normal e maligno. Apresenta baixas concentrações no soro, em condições normais, mas a libertação de PSA está aumentada na doença prostática. Deste modo, o PSA é um marcador sérico sensível para o CaP, mas não específico, uma vez que fatores como o aumento da idade, a presença de HBP, infeções do trato urinário e certos fármacos podem conduzir ao aumento dos níveis de PSA (Stenman *et al.*, 1999). De acordo com a idade e com a etnia dos indivíduos foram determinados valores de referência para a PSA livre no soro, que estão apresentadas na Tabela 4. Não existe nenhum valor de “*cut off*” definido para indicar se um homem tem ou não CaP. Assim, em grande parte da Europa considera-se que concentrações séricas de PSA superiores ou iguais a 4 ng/mL são anormais e recomenda-se a biópsia prostática. No entanto, alguns médicos recomendam a realização da biópsia para concentrações séricas de PSA acima de 3 ng/mL. Cerca de 15% dos indivíduos com PSA inferior a 4 ng/mL serão diagnosticados com CaP se uma biópsia for realizada. Homens com níveis de PSA livre entre 4 e 10 ng/mL têm cerca de 25% de probabilidade de ter CaP e, se o valor for superior a 10 ng/mL, esta probabilidade aumenta para 50% (American Cancer Society, 2019; Greene *et al.*, 2009).

Tabela 4: Concentrações de referência de PSA para intervalos etários, de acordo com a etnia dos doentes. [Adaptado de (Greene *et al.*, 2009)].

Faixa etária (anos)	Valores de referência (ng/mL)		
	Asiático-Americanos	Afro-Americanos	Caucasianos
40 - 49	0 - 2,0	0 - 2,0	0 - 2,5
50 - 59	0 - 3,0	0 - 4,0	0 - 3,5
60 - 69	0 - 4,0	0 - 4,5	0 - 4,5
70 - 79	0 - 5,0	0 - 5,5	0 - 6,5

O toque retal permite a avaliação da região periférica da próstata, procurando nódulos suspeitos. Ainda assim, é menos eficaz que a análise à PSA, mas por vezes consegue encontrar nódulos malignos em indivíduos com níveis de PSA normais (American Cancer Society, 2019).

No que concerne as técnicas de obtenção de imagem: a ecografia transretal (mais utilizada) permite a avaliação da anatomia e volume da próstata e é mais fiável e preciso que o toque retal; a MRI que permite a avaliação rigorosa de uma eventual extensão extra-prostática da doença; a TC é útil para a deteção de adenopatias (aumento do volume dos gânglios linfáticos) ou metástases noutros órgãos e tecidos moles; a cintigrafia óssea é utilizada para deteção de metástases ósseas; e a PET permite identificar células tumorais pelas mudanças que ocorrem no metabolismo celular (American Cancer Society, 2019).

Os tumores da próstata apresentam diferentes graus de agressividade. Assim, quanto menos diferenciadas forem as células malignas, mais agressivo será o tumor, ou seja, mais rápida e mais grave será a sua evolução. Deste modo, o grau de diferenciação histológico, obtido pela análise de amostras recolhidas por biópsias guiadas por ET, é essencial para a escolha da melhor terapêutica, bem como para o prognóstico que daí advém (American Cancer Society, 2019). A escala de *Gleason* é um sistema de classificação histopatológico desenvolvido em 1966 por Donald F. Gleason, que atualmente continua a ser amplamente utilizada na prática clínica. Este sistema classifica em cinco graus, sendo que o grau 1 corresponde ao mais diferenciado e menos agressivo e o grau 5 ao menos diferenciado e mais agressivo, com base nas características celulares e histológicas do tumor (American Cancer Society, 2019). Em 2015, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês *International Society of Urological Pathology*) fez algumas modificações no sistema de *Gleason* e padrões histológicos (Figura 10) (Epstein et al., 2016).

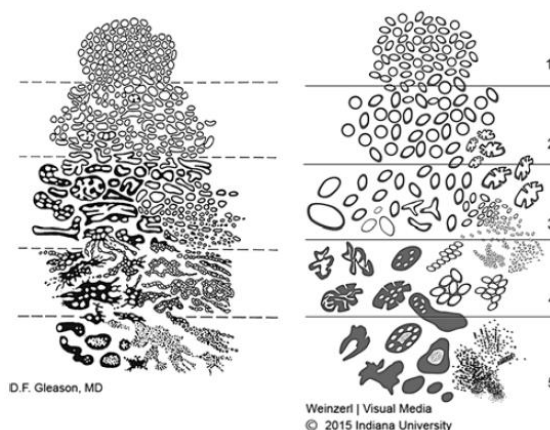
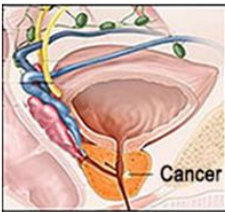



Figura 10: Padrões histológicos do adenocarcinoma da próstata: Diagrama de Gleason original à esquerda e diagrama de Gleason modificado do ISUP 2015 à direita. [Fonte: (Epstein et al., 2016)].

O score de *Gleason*, isto é, a classificação final, indica o tipo histológico e é atribuída em função dos dois tipos celulares predominantes no tumor. O resultado final resulta da soma dos dois graus mais frequentes e pode variar entre 2 (mais diferenciado) e 10 (menos diferenciado, mais agressivo). Os tumores com classificação de *Gleason* de 2 a 6 correspondem ao grau I da escala ISUP e indicam baixa agressividade das células tumorais e estão associados a melhor prognóstico que os tipos mais agressivos. Os scores de 8 a 10, correspondem aos graus 4 e 5 da escala ISUP e indicam tumores mais agressivos e na qual há maior probabilidade do tumor metastizar mais precocemente. Um score de 7 é um score intermédio no qual os tumores apresentam características e agressividade intermédias e corresponde aos graus 2 e 3 da escala ISUP (American Cancer Society, 2017).

Atualmente, o sistema TNM desenvolvido pela AJCC/UICC é o sistema de classificação do estadiamento de CaP mais utilizado, tal como descrito no Figura 11. Este sistema é constituído por diversas subdivisões que permitem dar informações sobre o tumor (T), os gânglios linfáticos (N) e as metástases (M), bem como agrupar os doentes em grupos de prognóstico semelhante (Mottet *et al.*, 2021). Deste modo, é possível classificar a doença em três grandes grupos: localizada, quando se encontra restrita apenas à próstata; localmente avançada, quando a doença se estende para a região extra-prostática; e por último, o carcinoma da próstata metastático ou não localizado (CaPm) definido pela presença de metástases à distância, geralmente nos gânglios linfáticos e/ou no osso (National Cancer Institute, 2015; Union for International Cancer Control, 2022).

Tumor primário (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente não identificável e não palpável T1a: Tumor incidental com menos de 5% de tecido ressecado T1b: Tumor incidental em mais de 5% de tecido ressecado T1c: Tumor diagnosticado por biópsia secundário a PSA elevado
T2	Tumor palpável confinado à próstata T2a: Tumor envolve metade de um lobo prostático T2b: Tumor envolve mais de metade de um lobo mas não os dois T2c: Tumor envolve os dois lobos
T3	Tumor estende-se através da cápsula prostática T3a: Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral) T3b: Tumor envolve as vesículas seminais
T4	Tumor é fixado ou envolve estruturas adjacentes para além vesículas seminais: esfíncter externo, reto, músculos do lado da parede pélvica
Invasão ganglionar regional (N)	
NX	Nódulos linfáticos regionais não acessíveis
N0	Não há envolvimento de nódulos linfáticos regionais
N1	Metástases em nódulos linfáticos regionais
Metástases à distância (M)	
M0	Sem metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância M1a: Metástases em nódulos linfáticos distantes M1b: Metástases ósseas M1c: Metástases noutros locais

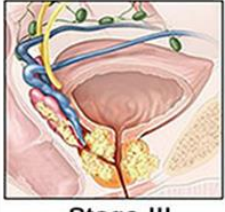




Figura 1 I: Representação do sistema de classificação TNM de 2017 para CaB, com imagem ilustrativa da evolução da patologia. [Adaptado de (Mottet *et al.*, 2021) e (National Cancer Institute, 2021)].

O estadiamento pode depois ser apresentado com a classificação TNM ou em combinação com o *score* de *Gleason* e com o nível sérico de PSA como apresentado na Tabela 5 (Cleto *et al.*, 2013).

Tabela 5: Estadiamento do CaP. [Adaptado de (Cleto *et al.*, 2013)].

Prognóstico	Estádio	Possíveis combinações				
		T ⁽¹⁾	N ⁽²⁾	M ⁽³⁾	“Score” de Gleason	PSA (ng/mL)
Localizado de baixo risco	I	T1-T2a	N0	M0	≤6	< 10
		T1	N0	M0	7	< 20
	IIA	T1	N0	M0	≤6	10 ≤ PSA < 20
T2a		N0	M0	≤7	< 20	
Localizado de risco intermédio		T2b	N0	M0	≤7	< 20
		T2c	N0	M0	Q _s ⁽⁴⁾	Q _v ⁽⁵⁾
Localizado de alto risco	IIB	T1-T2	N0	M0	Q _s ⁽⁴⁾	≥20
		T1-T2	N0	M0	≥8	Q _v ⁽⁵⁾
	III	T3	N0	M0	Q _s ⁽⁴⁾	Q _v ⁽⁵⁾
Localmente avançado Metastático	IV	T4	N0	M0	Q _s ⁽⁴⁾	Q _v ⁽⁵⁾
		Q _v ⁽⁵⁾	N1	M0	Q _s ⁽⁴⁾	Q _v ⁽⁵⁾
		Q _v ⁽⁵⁾	Q _v ⁽⁵⁾	M1	Q _s ⁽⁴⁾	Q _v ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ T, tumor primário; ⁽²⁾ N, gânglios linfáticos regionais; ⁽³⁾ M, metástases à distância; ⁽⁴⁾ Q_s, qualquer “score”; ⁽⁵⁾ Q_v, qualquer valor

I.4.4. Carcinoma da Próstata Não Localizado

O CaP pode propagar-se a outras regiões além da próstata, incluindo os ossos e órgãos distantes como o fígado, o pulmão e os gânglios linfáticos, passando a denominar-se de cancro da próstata avançado ou metastático (CaPm). Entre 20 e 30% dos doentes inicialmente diagnosticados com CaP localizado irão progredir para CaP não localizado e cerca de 10 a 20% dos doentes serão diagnosticados inicialmente com CaP não localizado (Bahl, 2013). A mortalidade associada ao CaP é cerca de 90% dos casos devido às metástases ao invés do tumor original (Middleton, Sivakumar e Hai, 2021).

Cerca de 5 a 12% dos doentes com CaP não localizado apresentam evidências de metástases em gânglios linfáticos, mas a sua presença é raramente uma condição fatal. Ainda assim, as células tumorais induzem alterações na arquitetura dos gânglios adjacentes ao tumor primário, que culminam no aumento da pressão e permeabilidade tecidual a fluidos e a células e, portanto, permite a invasão das células tumorais no sistema linfático. Uma vez neste sistema, estas células podem circular livremente e alcançar, numa primeira fase, os gânglios linfáticos regionais e depois através da via linfática metastizar para órgãos distantes (Datta *et al.*, 2010).

A presença de metástases ósseas tem sido observada em cerca de 85 a 90% dos doentes com CaPm, sendo o primeiro local de metastização para cerca de 80% dos doentes (Gonçalves, 2020; Ribeiro, 2018). Estas localizam-se mais frequentemente nas vértebras (69%), seguidas da pélvis (41%), dos ossos longos, mais frequentemente o fémur proximal (25%), e do crânio (14%). Menos frequentemente ocorrem nas costelas, no esterno, e no úmero proximal. Estas metástases podem conduzir à fragilidade óssea, bem como, à perda de funcionalidade óssea, que se vai traduzir em dor severa, fraturas patológicas e compressão da medula espinhal. E, conseqüentemente, na diminuição da QdV e aumento da mortalidade nestes doentes (Gonçalves, 2020; Ribeiro, 2018).

I.4.5. Opções Terapêuticas

Os tratamentos do CaP diferem consoante a fase em que a doença é diagnosticada. Em casos de doença localizada o objetivo é a cura e em casos de doença avançada o objetivo é impedir a progressão da doença e aliviar o sofrimento que esta possa causar. As decisões terapêuticas são tomadas considerando as melhores opções disponíveis de acordo com o estadiamento de CaP. Os doentes devem ser informados sobre os benefícios e os riscos

associados a cada uma das abordagens (Parker *et al.*, 2020). Na Tabela 6 podemos observar as estratégias terapêuticas associadas a cada estágio de CaP (Mottet *et al.*, 2021).

Tabela 6: Estratégias terapêuticas associadas a cada estadiamento do CaP. [Adaptado de (Cleto *et al.*, 2013)].

Prognóstico	Estádio	Estratégia terapêutica
Localizado de baixo risco	I	Vigilância ativa Braquiterapia Prostatectomia radical Radioterapia externa + ADT neoadjuvante ⁽¹⁾
	IIA	Vigilância ativa Prostatectomia radical + linfadenectomia pélvica Radioterapia externa + ADT neoadjuvante ⁽¹⁾ Braquiterapia
Localizado de alto risco	IIB	Neoadjuvante ADT ⁽¹⁾ + Radioterapia externa + adjuvante ADT ⁽¹⁾
	III	Radioterapia externa + prostatectomia radical + linfadenectomia pélvica QT adjuvante ou neoadjuvante
Localmente avançado	IV	Radioterapia externa + prostatectomia radical + linfadenectomia pélvica ADT adjuvante ⁽¹⁾ QT adjuvante
Metastático		ADT adjuvante ⁽¹⁾ QT adjuvante

⁽¹⁾ ADT, terapêutica de privação androgénica

O CaP normalmente evolui lentamente ao longo de muitos anos e poucos são os casos que se disseminam rapidamente. Assim, para estádios de doença mais precoces (estádios I e IIA), a terapêutica de CaP pode passar pela vigilância ativa através da verificação regular dos níveis de PSA, realização de biópsias ou MRI. Para os doentes que optam por um tratamento ativo, pode optar-se pela prostatectomia radical complementada por uma linfadenectomia pélvica ou pela braquiterapia ou radioterapia externa isoladamente ou em associação com a terapêutica de privação androgénica (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*) quando o tumor é hormonossensível (American Cancer Society, 2020; Cleto *et al.*, 2013).

Nos casos de CaP localizado de alto risco (estádios IIB, III e IV), a terapêutica inclui radioterapia externa complementada com ADT ou a abordagem cirurgia após QT neoadjuvante com docetaxel (Doc). Se o tumor for diagnosticado numa fase avançada da doença (estádio IV) são necessários tratamentos mais agressivos. De facto, neste estágio, se o tumor for hormonodependente, a abordagem terapêutica *standard* é a hormonoterapia, particularmente a ADT em monoterapia ou em associação com análogos da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH, do inglês *luteinizing hormone releasing hormone*),

antagonistas da LHRH e antiandrogénios e estrogénios. No entanto, esta opção terapêutica não é considerada um método curativo, uma vez que, em alguns casos, o cancro se torna resistente a este tratamento e passa a denominar-se de CaP resistente à castração (CPRCm) (Parker *et al.*, 2020). A abordagem terapêutica prescrita a estes doentes inclui normalmente regimes de QT convencional, nomeadamente através do uso de Doc, sendo este taxano considerado o tratamento padrão de primeira linha para o CPRCm. Em doentes cujo tratamento prévio com Doc não foi eficaz, pode recorrer-se, em segunda linha, a fármacos como o acetato de abiraterona e enzalutamida (inibidores da biossíntese de androgénio); sipuleucel-T (utilizado em imunoterapia), rádio-223 (atua como um mimético de cálcio) e o taxano cabazitaxel (Mottet *et al.*, 2021; Parker *et al.*, 2020).

1.4.5.1. Taxano: Docetaxel

O primeiro composto do grupo dos taxanos a ser descoberto, em 1971, foi o paclitaxel proveniente da casca da *Taxus brevifolia*. No entanto, este fármaco apresenta diversos efeitos adversos, tais como neutropenia, reações de hipersensibilidade, neurotoxicidade periférica e cardíaca e diversas interações farmacológicas, levando à impossibilidade de algumas combinações terapêuticas (Apolinário, 2012; Santos, 2016).

Com o objetivo de contornar os problemas associados ao paclitaxel, foi desenvolvido um agente semissintético derivado das agulhas das árvores do Teixo do Pacífico, o Doc. Este fármaco, apresenta um mecanismo de ação semelhante ao do paclitaxel, isto é, atua no bloqueio do processo mitótico. O taxano liga-se à proteína β -tubulina, levando à inibição da formação dos microtúbulos que compõem o citoesqueleto da célula e impedindo a divisão celular. Visto que não ocorre a separação dos cromatídeos para os polos durante a anafase, estes são, portanto, específicos do ciclo celular, atuando na fase de mitose. No entanto, e ainda que estes fármacos sejam extremamente eficazes contra as células em proliferação, também os neurónios (que não são células em divisão) são afetados pela sua ação, através de uma reconfiguração dos microtúbulos dos axónios com consequente reconfiguração do axónio que inclui alteração do seu comprimento, orientação e distribuição. Esta reconfiguração e alteração da estrutura do axónio conduz a alterações no transporte axonal e que clinicamente se traduz no desenvolvimento de neuropatia essencialmente sensorial que se manifesta pela perda sensorial, parestesias e dor (Carozzi, Canta e Chiorazzi, 2015; Yu Tian *et al.*, 2015).

O Doc é mais potente e solúvel em água que o paclitaxel, pelo que a sua administração é por via endovenosa. Além disso, o Doc apresenta efeitos adversos semelhantes aos do paclitaxel, no entanto, em menor frequência e de forma menos gravosa. Conduz a retenção hídrica, particularmente com o aumento das doses cumulativas (Apolinário, 2012; Pienta, 2001; Santos, 2016).

O Doc está ainda associado ao aparecimento de resistência medicamentosa em diversos tipos de tumores sólidos. De facto, os tumores adaptam-se ao ambiente outrora letal de Doc através de alterações nos vasos sanguíneos o que afeta a distribuição do fármaco, nas bombas de efluxo que diminuem a concentração intracelular do mesmo, e através de alterações na estrutura ou na função dos microtúbulos ou da sobrerregulação de vias anti-apoptóticas (Antonarakis e Armstrong, 2011).

1.5. Conceito de Dor e Dor Oncológica

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual potencial ou real, ou cuja descrição pode corresponder à existência de tal lesão. E, esta definição permite que a dor seja uma experiência pessoal, multidimensional que resulta da complexa interação entre fatores biológicos, psicológicos e sociais. Consequentemente pode ter diversos efeitos nefastos na QdV do indivíduo, resultando em sofrimento e alterações fisiopatológicas que vão contribuir para o aparecimento de comorbilidades e de alterações orgânicas e psicológicas e que podem conduzir à perpetuação do fenómeno doloroso. A dor não é determinada pela quantidade de dano físico (International Association for the Study of Pain, 2011).

A dor pode ser classificada de acordo com a sua duração, local de origem, intensidade, fisiopatologia e etiologia (Figura 12). De acordo com a duração, define-se dor aguda quando esta ocorre subitamente e tem uma duração limitada, havendo normalmente uma definição temporal e/ou causal. Quando a dor dura mais de três meses, persistindo além do curso normal de uma doença aguda ou da cura da lesão que lhe deu origem, passa a definir-se por dor crónica. Esta apresenta diversas repercussões no bem-estar e QdV do indivíduo e sociedade pelo que é encarada como uma doença por si só e pode estar associada a uma etiologia relacionada, ou não, com cancro (Janeiro, 2017; Orr, Shank e Black, 2017).

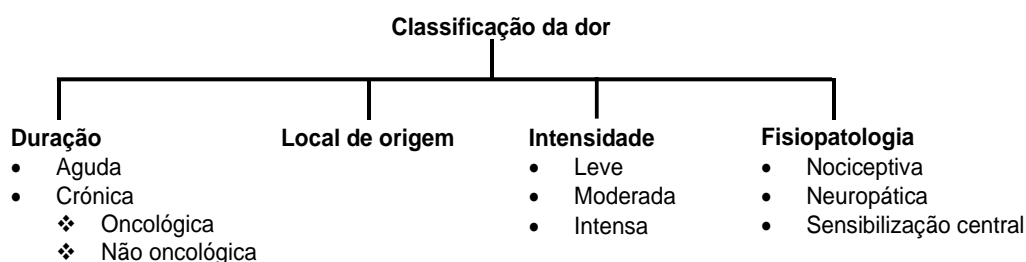


Figura 12: Esquema de classificação da dor. [Adaptado de [(Orr, Shank e Black, 2017)].

A dor oncológica é qualquer dor relacionada à experiência de uma doença oncológica, seja causada pelo tumor, seu diagnóstico ou seu tratamento. De facto, a dor é comum em doentes com cancro, particularmente na fase intermédia e avançada da doença, quando a prevalência é estimada em mais de 70%. Ainda assim, a presença de cancro nem sempre é sinónimo de presença de dor, além da frequência da dor depender do tipo de tumor e do seu estágio, as causas podem ser variadas (Lameiras, 2010; National Cancer Institute, 2002). O crescimento do tumor e/ou metástases podem provocar dor, dado que pressionam estruturas adjacentes às massas tumorais (*i.e.* ossos, órgãos, vasos sanguíneos, nervos, etc.). No entanto, a terapêutica cirúrgica pode conduzir a lesões inflamatórias que podem ser dolorosas no pós-operatório. Já a radioterapia pode levar à inflamação ou fibrose nas zonas irradiadas, provocando dor. A QT pode provocar mucosites, neuropatias e dores musculares generalizadas (Associação de Enfermagem Oncológica Portuguesa, 2015; Matos *et al.*, 2022).

I.5.1. Avaliação e Terapêutica

Dada a complexidade do conceito da dor e a sua subjetividade, um dos grandes desafios da medicina atual prende-se com a avaliação desta. A quantificação de um fenómeno subjetivo como a dor é difícil, pelo que a sua avaliação deve ser feita de forma contínua e regular. De uma forma geral, a avaliação da dor faz-se recorrendo ao uso de escalas, que podem ser visuais analógicas, escalas numéricas, escalas qualitativas ou, ainda, escalas de faces (Figura 13). A escolha da escala deve ser baseada nas características de cada doente e aspetos cognitivos deste. Após a escolha, a escala deve ser mantida no futuro, em intervalos de tempo regulares, para detetar qualquer alteração. Ainda assim, o doente deve ser também inquirido sobre a localização, extensão e irradiação da dor. Além de questionado sobre os fatores que conduzem ao agravamento e alívio da dor, bem como historial de patologias clínicas que podem ter associada dor ou não, antecedentes medicamentosos e respetivos *outcomes* e ainda

questionado sobre como esta dor afeta a sua vida diária (Direcção-Geral de Saúde, 2001, 2008).

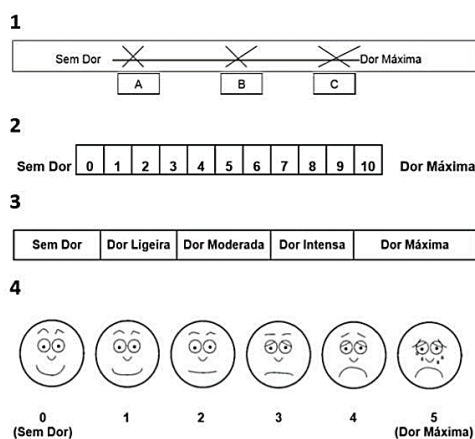


Figura 13: Exemplo de escalas. 1 - escala visual analógica, 2 - escala numérica, 3 - escala qualitativa, 4 - escala de faces. [Adaptado de (Direcção-Geral de Saúde, 2003)].

O tratamento adequado da dor assume um aspeto relevante e prioritário na medicina atual, uma vez que a ineficácia no controlo da dor relacionada com o cancro pode levar a uma resposta de stress exacerbada e prolongada, resultando em imunossupressão e promovendo a propagação das células tumorais à distância (Afsharimani, Cabot e Parat, 2011; Matos *et al.*, 2022). Assim, existem múltiplas intervenções que devem ser usadas, de forma combinada, de acordo com a dor de cada doente e, segundo indicações específicas para um tratamento eficaz da dor (Janeiro, 2017).

Os objetivos do controlo da dor são a redução da mesma e a melhoria da QdV do doente. Assim, em 1986, a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) publicou as primeiras *guidelines* relacionadas com o uso de analgésicos no tratamento da dor em doentes oncológicos. Esta abordagem, a “escada analgésica” de três degraus (Figura 14), consiste na diferenciação do uso de analgésicos de acordo com a intensidade da dor e é o instrumento padronizado mais utilizado no controlo da dor a nível mundial. Em 2019 a escala foi atualizada. A cada degrau corresponde um nível de intensidade de dor que o doente apresenta: leve, moderada ou intensa, ao qual se associa a terapêutica farmacológica mais indicada (World Health Organization, 1986, 2018).

No primeiro degrau, a dor é considerada leve pelo que se recorre ao uso de analgésicos não opioides que vão ter ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória (World Health Organization, 1986). No degrau II, dor considerada moderada, sugerem-se para controlo de dor o uso de opioides fracos. No degrau III, dor severa, recorre-se ao uso de

opioides fortes. Quando a dor persiste ou aumenta além da toma destes fármacos opioides pode associar-se a analgésicos não opioides (World Health Organization, 1986).

Cada degrau da escada analgésica, pode ainda ser complementado com fármacos adjuvantes de forma a melhorar a terapêutica eleita. Estes adjuvantes, apesar de não serem verdadeiros analgésicos, contribuem para o alívio da dor, potenciando os analgésicos e interferindo nos vários fatores que podem agravar o quadro algico, pelo que podem permitir a redução da dose de opioide necessária e contribuir para um controlo adequado da dor. São exemplo os corticosteroides, os antidepressivos, os anticonvulsionantes, os bifosfonastos, os anestésicos locais, entre outros. Em 40-50% dos casos, a dor oncológica não é passível de ser controlada apenas com a toma de opioides, sendo necessário associar um fármaco adjuvante(Lisboa, 2015; World Health Organization, 1986).

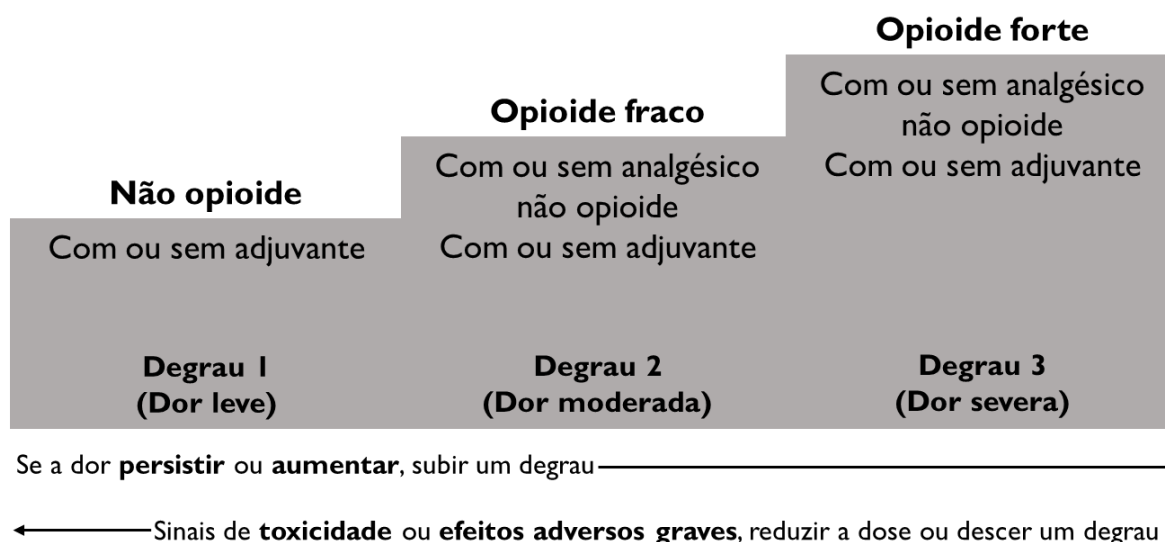


Figura 14: A escada analgésica da WHO (1986). [Adaptado de [(World Health Organization, 2018)].

Esta escala revolucionou a terapêutica de controlo de dor e de facto é eficaz em cerca de 80-90% dos casos. Ainda assim, alguns autores sugerem a criação de um quarto degrau para dar resposta aos doentes cuja dor não foi controlada com os três degraus anteriores. Este quarto degrau apoiar-se-ia em técnicas específicas como bloqueios de plexos, ou administração de opioides por via intraespinhal (Vargas-Schaffer, 2010).

No que respeita à terapêutica farmacológica, estão apresentados na Tabela 7 os principais fármacos propostos pela *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para o controlo da dor oncológica, em função da sua intensidade (Swarm et al., 2019).

Tabela 7: Lista de fármacos recomendados pela National comprehensive cancer network para alívio da dor oncológica, em função da intensidade da dor. [Adaptado de (Swarm *et al.*, 2019)].

Classe	Fármacos	Alternativa
Não opioides	Ácido acetilsalicílico	Naproxeno
	Paracetamol	Diclofenac
	Ibuprofeno	Diflunisal
	Indometacina	
Opioides Fracos	Codeína	Tramadol Tapentadol
		Oxicodona Hidromorfina Buprenorfina Fentanilo
Opioides Fortes	Morfina	
Antagonistas dos recetores opioides	Naloxona	-
Antidepressivos	Amitriptilina	Imipramina
Anticonvulsivantes	Carbamazepina	Ácido valpróico
Corticosteróides	Prednisolona	Prednisona
	Dexametasona	Betametasona
Anestésicos Locais	Lidocaína	Ropivacaína Bupivacaína

Além do tratamento farmacológico, existem medidas não farmacológicas para controlo de dor que se centram na inibição da entrada nociceptiva, tais como as intervenções psicológicas, incluindo a gestão do stresse, a hipnose e intervenções cognitivas comportamentais, a acupunctura e a acupressão, as físicas incluindo a fisioterapia e a osteopatia e a estimulação nervosa eléctrica transcutânea (TENS, do inglês *Transcutaneous electrical nerve stimulation*) (Lewis *et al.*, 2018).

1.6. Analgésicos Opioides

Os fármacos opioides são substâncias derivadas do ópio, uma substância extraída da papoila com propriedades analgésicas e incluem a morfina, codeína, entre outros (Direcção-Geral de Saúde, 2008). A WHO considera o índice de consumo de medicamentos opioides *per capita* como um indicador da qualidade dos cuidados de saúde no âmbito da terapêutica da dor. A nível europeu, Portugal apresenta uma das taxas de prescrição de medicamentos opioides mais baixa possivelmente devido a fatores culturais, educacionais e económicos (Direcção-Geral de Saúde, 2008). Ainda assim, entre 2010 e 2018, registou-se um aumento de 141% do consumo de opioides em Portugal (PÚBLICO, 2019).

Os opioides são os únicos analgésicos que atuam diretamente em recetores cujo objetivo é o alívio da dor, particularmente, os recetores opioides denominados μ (MOR), κ

(KOR) e δ (DOR) (Pedro e Silva, 2017; Starke e Br, 2007). Os agonistas que se ligam a recetores μ podem causar analgesia, mas também obstipação (presente em cerca de 90% dos doentes), náuseas, vômitos, sedação, depressão respiratória, bradicardia, euforia e dependência física. A ativação dos recetores δ pode causar analgesia, mas também depressão respiratória enquanto a estimulação dos recetores κ pode produzir analgesia, depressão respiratória, sedação, dispneia e a disforia (Cardoso, 2014; Trescot *et al.*, 2008). Todavia, certos tratamentos como a QT e a radioterapia tendem a contribuir para a exacerbação destes sinais e sintomas (Lisboa, 2015).

A escolha do opioide deve efetuar-se tendo em conta a sua intensidade, duração de ação, via de administração e efeitos adversos. Estes fármacos podem ser classificados quanto à sua duração de ação como opioides de ação curta ou de ação prolongada. Os de ação curta devem ser utilizados em situações de dor aguda ou intermitente e incluem a morfina, a oxicodona, a hidromorfona, o fentanilo ou o tramadol. Os opioides de ação prolongada (*i.e.* meperidina) têm a vantagem de possibilitar um alívio de dor mais longo (Cardoso, 2014). Podem ainda ser subdivididos, com base na sua potência para controlo de dor, em opioides fracos (*i.e.* codeína, tramadol) e opioides fortes (*i.e.* morfina, metadona, fentanilo, oxicodona) (Cardoso, 2014).

Nem todos os doentes respondem de forma similar ao tratamento com os opioides. Estima-se que cerca de 80% dos doentes sob terapêutica opioide, tenham que, pelo menos uma vez, trocar o opioide com que estão a ser tratados. Esta necessidade pode surgir quando há um desequilíbrio entre a eficácia analgésica e os efeitos adversos aceitáveis (Bruera e Paice, 2015). Ainda assim, não existe limite de dose máxima de opioides. Todavia, o aumento da dose promove o aparecimento de efeitos adversos e possibilita o desenvolvimento de tolerância farmacológica (Cardoso, 2014). Além disso, esta classe farmacológica tem normalmente associada um aumento de tolerância, isto é, a necessidade de aumentar a dose para a obtenção do mesmo efeito. Ainda assim, a necessidade de aumentar a dose deve-se geralmente ao agravamento da dor em si e não com a tolerância ao fármaco (Cardoso, 2014).

1.6.1. Avanços recentes na investigação clínica

Os analgésicos opioides são fármacos bastante eficazes no controlo da dor relacionada com o cancro. Todavia, os recetores opioides encontram-se não só no sistema nervoso central, mas também em células do sistema imune como em macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos T. Deste modo, os opioides têm a capacidade de modular a

resposta imunitária através de mecanismos centrais e periféricos (Kim, 2018). Todavia também se pressupõe que os opioides poderão exercer os seus efeitos através da sua ligação a recetores não opioides como o recetor *toll-like* 4 (TLR4) (Börner *et al.*, 2008, 2009; Hutchinson *et al.*, 2010). Foi demonstrado um forte efeito modulador do sistema imune para a codeína, a metadona, a morfina, o fentanilo e o sufentanilo, e um fraco efeito modulador para a oxicodona e a hidromorfona (Sacerdote *et al.*, 1997; Zajaczkowska *et al.*, 2018). Por outro lado, o tramadol poderá ser um potencial estimulante da resposta imunitária (Gaspani *et al.*, 2002) e a buprenorfina um opioide neutro para o sistema imune (Martucci, Panerai e Sacerdote, 2004).

Em geral, verifica-se que o efeito que os analgésicos opioides poderão ter na formação e na progressão tumoral pode alterar consoante diversos fatores como a dose, a duração da exposição, o tipo de administração e o opioide em si, o que pode influenciar o tratamento e o resultado clínico dos doentes com cancro (Matos *et al.*, 2022). De facto, em concentrações clinicamente mais relevantes, os opioides parecem estimular angiogénese e a progressão do cancro (Bimonte *et al.*, 2015; Ustun *et al.*, 2011). Em concentrações mais baixas aparenta ter efeitos anti-proliferativos (Ge *et al.*, 2014). Alternativamente em doses analgésicas, estes fármacos parecem não influenciar o crescimento e a angiogénese do tumor nem facilitar a sua disseminação (Doornebal *et al.*, 2015). Relativamente ao tipo de administração, observou-se que a morfina administrada por via intratecal, diminui a atividade das células NK (do inglês, *natural killer cells*) de forma mais marcada que a morfina oral (Provinciali *et al.*, 1991). No que concerne ao tempo de exposição, para a mesma densidade celular, uma exposição curta aos opioides aparenta resultar em efeitos anti-proliferativos (Ge *et al.*, 2014), enquanto numa exposição mais duradoura ao opioide, promove a estimulação do efeito proliferativo celular (Bimonte *et al.*, 2015; Boland *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2015; Provinciali *et al.*, 1996). Esta evidência torna-se problemática uma vez que os doentes oncológicos apresentam sobretudo dor crónica associada a uma exposição aos opioides prologada.

Como consequência, não existem atualmente dados suficientes que permitam basear uma escolha mais racional de opioides para otimizar o controlo de dor sem afetar negativamente a função imunitária essencial dos doentes (Matos *et al.*, 2022). Assim, torna-se essencial clarificar o efeito ou o ponto de mudança do efeito dos opioides, em exclusivo ou associação com outros fatores influenciadores como técnicas de tratamento, estilos de vida e fatores de risco, a fim de incentivar ao uso racional de opioides em doentes oncológicos e promover um acompanhamento e vigilância ao doente e à sua situação clínica mais reforçada e fundamentada na evidência clínica.

I.7. Anestésicos Locais

A dor oncológica nem sempre é passível de ser aliviada com recurso aos analgésicos opioides e não opioides anteriormente referidos. Nestas situações recorre-se geralmente a fármacos adjuvantes como os anestésicos locais (LAs) (Raimundo, 2014).

Quase todos os LAs partilham a mesma estrutura química: uma cadeia hidrofóbica aromática, uma cadeia intermédia e uma amina terciária. A ligação entre a cadeia hidrofóbica e a cadeia intermédia pode ser efetuada através de uma ligação éster (-COO-), sendo os compostos com esta ligação denominados de aminoésteres (*i.e.* cloroprocaína, procaína, tetracaína); ou por uma ligação amida (-CONH-), sendo estes compostos denominados de aminoamidas (*i.e.* lidocaína, bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína). Os LAs do tipo amida são, atualmente, os mais usados na prática clínica pois representam uma alternativa menos tóxica, mais eficaz, com maior duração de ação e capazes de provocar menos alergias que os LAs do tipo éster. Estes fármacos podem ainda ser classificados de acordo com o seu início e duração de ação como representado na Tabela 8 (El-Boghdadly, Pawa e Chin, 2018).

Tabela 8: Anestésicos locais classificados quanto ao início da ação, duração da ação, dose máxima recomendada e dose máxima absoluta recomendada. [Adaptado de (El-Boghdadly, Pawa e Chin, 2018) e (Matos *et al.*, 2022)].

Fármaco	Início da ação	Duração da ação	Dose máxima recomendada (mg/Kg)	Dose máxima absoluta recomendada (mg)
Lidocaína	Rápido	Intermédio	4,4	300
Mepivacaína			4,4	300
Bupivacaína	Médio	Longa	2	175
Levobupivacaína			2	150
Ropivacaína			3	225
Procaína	Rápido	Curta	7	500
Cloroprocaína			10	800

Os LAs contactam com as fibras nervosas periféricas e bloqueiam os canais de sódio localizados nas membranas lipídicas dos axónios, o que interrompe a transmissão dos impulsos nervosos aferentes e eferentes, proporcionando analgesia e anestesia. Todavia, os LAs não são seletivos para as fibras de dor e bloqueiam também outras fibras sensoriais, motoras e autónomas, bem como os potenciais de ação no músculo esquelético e no músculo cardíaco, pelo que os LAs podem exercer efeitos gerais, principalmente a nível cardíaco (taquicardia e hipertensão) e neurológico (parestésias, tremores e desorientação), quando são atingidas elevadas concentrações sistémicas (Alves, 2013; Marvão e Guimarães, 2010).

1.7.1.LAs e a Terapêutica convencional do cancro

Além do uso dos LAs como co-adjuvantes no controlo da dor, esta classe farmacológica é habitualmente utilizada em procedimentos técnicos quer de diagnóstico quer de tratamento (Raimundo, 2014). No que concerne ao diagnóstico de CaM, CaB e CaP, os LAs são utilizados como adjuvantes nas biópsias mamárias, prostáticas, citoscopia e biópsia aos gânglios linfáticos invadidos. Nestes tipos de tumores, os LAs são ainda utilizados na ressecção cirúrgica dos tumores e nódulos linfáticos, bem como em associação com a radioterapia (Batista, 2010; DeGeorge, Holt e Hodges, 2017; Matos *et al.*, 2022).

Recentemente, tem sido demonstrado que os LAs podem afetar direta ou indiretamente a progressão de tumores. Estes fármacos têm a vantagem de proporcionar uma analgesia e anestesia eficaz, minimizando os efeitos adversos e imunossupressores da dor pré- e pós-operatória e, portanto, reduzindo a dose necessária de analgésicos no período pós-operatório. Quando utilizados como co-adjuvantes também permitem reduzir a dose de opioide prescrito, o que se traduz numa maior segurança da terapia em termos da imunossupressão induzida por opioides e menor risco potencial de progressão do cancro (Matos *et al.*, 2022; Zajaczkowska *et al.*, 2018). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os LAs reduzem a recorrência e o desenvolvimento do cancro através da inibição da proliferação, da viabilidade, da invasão e da migração celulares e da promoção da morte celular de células tumorais (Matos *et al.*, 2022). Alguma evidência clínica é corroborada por dados de ensaios clínicos (Biki *et al.*, 2008; Toner *et al.*, 2021; Wuethrich *et al.*, 2010). No entanto, a etiologia destes efeitos é provavelmente multifatorial (Zhang *et al.*, 2021).

É improvável que os LAs sejam utilizados como em terapêuticas anti-tumorais em monoterapia, contudo, estudos sugerem que os LAs podem ser utilizados como agentes sinérgicos de terapêuticas convencionais como a QT. Por exemplo, a lidocaína aumentou a toxicidade de fármacos quimioterapêuticos como a mitomicina C, a epirrubicina, a cisplatina e a sensibilidade de células tumorais ao tamoxifeno (Gong *et al.*, 2018; Sui *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017). O efeito que outros LAs podem ter na citotoxicidade dos agentes quimioterapêuticos, bem como na sensibilidade das células tumorais a estes, é escassa, pelo que esta capacidade dos LAs precisa de ser explorada em estudos futuros (Liu, Dilger e Lin, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Outro problema está associado à sensibilidade e à especificidade dos LAs. Em geral, a concentração e a duração da aplicação dos LAs necessárias para exercer um efeito anti-tumoral significativo não são passíveis de ser alcançados através da infiltração local. Ainda

assim, cada tipo de cancro apresenta uma resposta distinta aos LAs, pelo que podem existir tipos de cancro particularmente sensíveis aos LAs. E, portanto, surge a necessidade de estudar os efeitos dos LAs em diferentes tipos de células tumorais para identificar os tipos de cancro mais sensíveis aos LAs e comparar com os efeitos dos LAs em células normais de modo a determinar a especificidade dos LAs. Por fim, os estudos referentes ao efeito dos LAs na migração e invasão tumoral são escassos, pelo que são essenciais mais estudos acerca desta matéria (Liu, Dilger e Lin, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Objetivos

O CaM, CaB e CaP constituíram três dos tipos de cancro mais comumente diagnosticados no mundo durante o ano de 2020. Entre os casos diagnosticados com estas patologias, um dos maiores desafios centra-se no controlo de dor associada ao tumor em si e a abordagens de diagnóstico e terapêutica. O controlo ineficaz da dor oncológica pode levar a uma resposta de stresse exacerbada e prolongada, resultando em imunossupressão e promovendo a propagação das células tumorais para o resto do organismo (Afsharimani, Cabot e Parat, 2011). Entre as várias opções terapêuticas disponíveis no mercado para controlo de dor oncológica, o uso de analgésicos opioides continua a ser o mais destacado bem como considerados os mais eficazes.

Alternativamente, o uso terapêutico de LAs como co-adjuvantes no controlo de dor e em técnicas de diagnóstico e terapêutica tem sido demonstrado estar associado a uma menor progressão tumoral, através da inibição da proliferação, viabilidade, invasão e migração celular. Evidências destacam ainda uma menor presença de efeitos adversos e imunossupressores da dor pré- e pós-operatória, uma redução da necessidade de doses elevadas de opioides prescritos e a presença de um efeito sinérgico quando associados com agentes quimioterapêuticos (Zhang *et al.*, 2021).

Assim, o propósito do projeto “Anti-álgicos na resposta terapêutica dos carcinomas da mama, bexiga e próstata: Estudo pré-clínico” foi identificar e caracterizar os efeitos de três LAs na resposta terapêutica de CaM, CaB e CaP. Com este intuito foram utilizadas diferentes metodologias de modo a alcançar os seguintes objetivos específicos:

- Identificar as linhas celulares e tipos de cancro mais sensíveis aos LAs;
- Avaliar a especificidade dos LAs através da comparação do efeito dos LAs em linhas celulares tumorais e linhas celulares não tumorais de mama, bexiga e próstata;
- Avaliar o efeito dos LAs quando em associação com Doc na proliferação de células de CaP;
- Avaliar o efeito das melhores associações de LAs a Doc na viabilidade e migração de células de CaP;

Materiais e Métodos

Os LAs atuam através do bloqueio da produção e condução de impulsos nervosos e estão associados a diversos efeitos anti-tumorais, quando utilizados em monoterapia e em associação com outros agentes terapêuticos. No entanto, a sua especificidade e sensibilidade bem como o seu efeito em associação com agentes quimioterapêuticos ainda não se encontra completamente esclarecida. O conhecimento destes efeitos e da especificidade e sensibilidade podem dar origem a novas abordagens terapêuticas ou permitir melhorar a eficácia das opções terapêuticas atuais.

Os estudos *in vitro* possibilitaram avaliar a especificidade dos LAs e a sensibilidade de células tumorais de CaM, de CaB e de CaP a estes fármacos. Adicionalmente, estes estudos permitiram avaliar o efeito da associação dos LAs a Doc a nível da proliferação, da migração, da viabilidade e do perfil de morte de células de CaP.

Neste capítulo, é feita uma descrição de todos os materiais químicos e biológicos utilizados neste estudo, juntamente com as explicações necessárias para a sua preparação. Este capítulo está subdividido em quatro secções, que se referem às quatro etapas deste estudo. A primeira secção apresenta os fármacos e as linhas celulares utilizados e a forma como foram manipulados. As secções seguintes descrevem os métodos utilizados para avaliar os efeitos dos fármacos em monoterapia em linhas celulares de CaM, de CaB e de CaP, e em associação terapêutica em vários processos biológicos, nomeadamente na proliferação celular, na viabilidade e morte celulares e na migração celular de linhas celulares de CaP. Finalmente, a última secção descreve os métodos estatísticos utilizados para processar os resultados obtidos.

3.1. Cultura Celular e Fármacos

A cultura celular consiste no cultivo das células, em suspensão ou aderentes em monocamada, originárias de uma linha celular, cultura primária ou tecido. O conhecimento da morfologia celular e dos procedimentos e das técnicas básicas de cultura celular são essenciais para a manutenção das culturas celulares *in vitro*.

Durante a realização deste projeto utilizaram-se oito linhas celulares. Duas linhas celulares humanas de CaP (PC3, ATCC® CRL-1435™; e LNCaP, ATCC® CRL-1740™), uma linha celular humana de epitélio normal da próstata (RWPE-1, ATCC® CRL-11609™), duas linhas celulares humanas de CaB (TCCSUP, ATCC® HTB-5™; e HT1376, ATCC® CRL-1472™), uma linha celular humana de CaM (MCF-7, ATCC® HTB-22™), uma linha celular humana de mama normal (MCF-12A, ATCC® CRL-10782™) e uma linha celular de

queratinócitos (HaCaT, ATCC® PCS-200-011™). Todas as linhas celulares utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Rockville, U.A).

As linhas celulares de CaP diferem na sensibilidade a androgénios e a estrogénios, sendo estes elementos fulcrais na carcinogénese do CaP (Tan *et al.*, 2015). A linha celular LNCaP expressa recetores hormonais, pelo que é hormono-dependente, contrariamente à linha celular PC3 que não expressa recetores hormonais. Por outro lado, diferem ainda na localização de origem, sendo a linha celular LNCaP obtida de uma metástase linfática e a linha celular PC3 de uma metástase óssea (Horoszewicz *et al.*, 1983; Kaighn *et al.*, 1979). A linha celular humana RWPE-I expressa o recetor de androgénios e foi obtida através da transfeção de células epiteliais derivadas da zona periférica de uma próstata adulta histologicamente normal com uma única cópia do vírus do papiloma humano 18 (HPV- 18).

As linhas celulares da mama utilizadas neste projeto são ambas originárias de células epiteliais de glândula mamária, sendo que a linha celular MCF-7 é uma linha de CaM do tipo luminal A (expressa RE e RP expresso e é negativo para o HER2).

Foram utilizadas linhas celulares de CaB com diferentes características moleculares e pertencentes a diferentes fases da doença, sendo a linha celular HT-1376 representativa do carcinoma da bexiga no estágio III e a linha celular TCCSUP representativa do carcinoma urotelial de estágio IV.

As linhas celulares normais RWPE-I e MCF12A foram utilizadas nesta investigação para avaliação da seletividade dos LAs.

As linhas celulares foram descongeladas e propagadas em culturas aderentes, de acordo com as instruções do fornecedor, e mantidas numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂) e a 37 °C numa incubadora Binder® (Binder, Alemanha). As linhas celulares de PC3 e LNCaP foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Sigma R4130) suplementado com 1 mM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *fetal bovine serum*, Sigma F7524) e 1% de antibiótico (Sigma A5955). As linhas celulares TCCSUP, HT1376, MCF-7 e HaCaT foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D5648) suplementado com 1% de antibiótico, 0,25 mM de piruvato de sódio, e 10 ou 5% FBS para a linha celular HT1376 e a linha celular HaCaT ou a linha celular TCCSUP e a linha celular MCF-7, respetivamente. A linha celular MCF12A foi cultivada em meio RPMI suplementado com 1 mM de piruvato de sódio, 5% de FBS, 1% de antibiótico, 500 ng/mL de hidrocortisona (Sigma, H0888) e 20 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *epidermal growth factor*, Sigma 11376454001). A linha celular

RWPE-I foi cultivada em *Keratinocyte Serum Free Medium*, (K-SFM, Gibco 17005042) suplementado com 0,05 mg/mL de *bovine pituitary extract* (BPE) e 5ng/mL de EGF.

Para a realização dos estudos foi necessário preparar suspensões celulares. Assim, o meio de cultura foi removido e procedeu-se à lavagem das células com uma solução salina de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) constituída por 137 mM de cloreto de sódio (Sigma S7653), 2,7 mM de cloreto de potássio (Sigma P9333), 10 mM de fosfato monossódico (Sigma S5011) e 1,8 mM de fosfato monopotássico (Sigma P0662), a pH 7,4. Seguidamente, descartou-se o PBS e as células foram incubadas com 2 mL de solução tripsina-EDTA a 0,25% (Sigma T4049), durante 3 a 5 minutos, para o destacamento celular. Decorrido este tempo, inibiu-se a ação da tripsina adicionando 5 mL do respetivo meio de cultura e procedeu-se à determinação da concentração celular. Para tal, a uma amostra da suspensão celular adicionou-se igual volume de uma solução de 0,02% de azul de tripano (Sigma T0776) em PBS e contaram-se as células, com recurso a uma câmara de *neubauer* e a um microscópico ótico invertido (Motic AE31) com ampliação 100x. Após a contagem, retirou-se o volume necessário, centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rpm durante 5 min (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm), com o intuito de remover as células mortas, e adicionou-se o meio de cultura de modo a obter a concentração pretendida para os ensaios realizados.

Todos os fármacos utilizados neste estudo, a lidocaína (Lid), a ropivacaína (Rop), a levobupivacaína (Lev) e o docetaxel (Doc) foram cedidos pelos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

A descrição do tratamento com os LAs em monoterapia e em associação com o Doc para cada experiência é detalhada abaixo. A restante descrição detalhada de cada metodologia será feita na respetiva secção.

Previamente à administração, e de forma que o volume em cada poço ou frasco se mantivesse constante, foi retirado o mesmo volume de meio de cultura que posteriormente se vai adicionar de LA, em monoterapia ou em associação com Doc, às culturas. Este procedimento foi aplicado em todos os métodos descritos. Foi ainda realizado um controlo de solvente nomeadamente com cloreto de sódio.

3.2. Tratamento com os fármacos

3.2.1. Anestésicos locais e docetaxel em monoterapia

Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 48 poços (Sarstedt) a uma densidade de 80 000 células/mL (MCF12A e LNCaP), de 100 000 células/mL (MCF7, HT1376 e PC3), de 120 000 células/mL (TCCSUP), num volume de 500 μ L por poço. Após incubação durante a noite, as células foram tratadas com os anestésicos locais Lid, Rop e Lev, em diferentes concentrações, que vão de 0,01 a 10 mM ou com o agente quimioterapêutico Doc em concentrações crescentes, durante 48 horas. Na Tabela 9 apresentam-se as gamas de concentrações de Lid, de Rop, de Lev e de Doc testadas no primeiro ensaio experimental de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazolyl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*), descrito posteriormente para cálculo dos valores de IC_{50} (concentração inibitória média) após 48 horas de incubação. As células controlo não foram sujeitas a qualquer tratamento.

Tabela 9: Concentrações de LAs (mM) testadas nas linhas celulares para avaliação da proliferação celular através do ensaio MTT.

Fármaco	Concentração inicial (mg/mL)	Gama de concentrações testada
Lidocaína	20	0,3 – 10 mM
Ropivacaína	7,5	0,01 - 1 mM
Levobupivacaína	5	0,01 - 1 mM
Docetaxel	20	0,01-100 nM

3.2.2. Associação de anestésicos locais e docetaxel

As combinações de LAs com Doc foram feitas através do tratamento concomitante das células tumorais com concentrações crescentes de Doc e uma concentração fixa de LA. No caso do Doc, usou-se a mesma gama de concentrações testadas em monoterapia. No caso dos LA, a concentração fixa correspondeu ao valor de IC_{50} obtido para cada LA em monoterapia.

Para verificar o tipo de resposta induzida pelas diferentes associações, este estudo teve por base o desenho experimental proposto por Chou e Talalay que visa quantificar o tipo de interações entre os dois fármacos no que diz respeito ao seu efeito aditivo, antagonista ou sinérgico (Chou, 2006; Chou e Talalay, 1984).

Este método requer os valores de IC_{50} e as curvas dose-resposta obtidas pelo ensaio de MTT de cada um dos compostos, testados individualmente e em associação. Segundo Chou *et al.* (2010), a equação base deste método deriva da teoria unificada das equações de *Michaelis-Menten*, *Hill*, *Henderson-Hasselbalch*, e *Scatchard* e denomina-se de equação dos efeitos medianos (Chou e Talalay, 1984; Chou, 2010). Esta equação pode ser simplificada para uma versão linearizada (Equação 1):

$$\log\left(\frac{f_a}{f_u}\right) = m \times \log(D) - m \times \log(D_m) \quad (1)$$

onde f_a é a fração de células afetadas (ou seja, mortas), f_u é a fração de células não afetadas (ou seja, vivas), D é a dose de fármaco usada, D_m é a dose de efeito mediano e m é a sigmoidicidade da curva dose-efeito. A partir desta equação simplificada, os valores para D_m e para m podem ser estimados e, então, ser usados para calcular as estimativas de variáveis na equação 2, dando o índice de combinação:

$$IC = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2} = \frac{(D)_1}{(Dm)_1[f_a/(1-f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(Dm)_2[f_a/(1-f_a)]^{1/m_2}} \quad (2)$$

em que IC representa o índice de combinação, $(D)_1$ representa o valor da concentração do fármaco 1 utilizada na associação, $(D)_2$ representa o valor da concentração do fármaco 2 utilizada na associação, e $(Dx)_1$ e $(Dx)_2$ representam os valores de concentração, dos respectivos fármacos, que seriam necessários para alcançar a resposta em monoterapia. $(Dx)_1$ e $(Dx)_2$ podem ser calculados utilizando os valores de D_m e de m previamente calculados. Quando os valores de IC são inferiores a 1 significa que se obteve sinergia, quando os valores são iguais a 1 significa que o efeito é de adição, e quando os valores são superiores a 1 significa que ocorreu antagonismo (Chou e Talalay, 1984; Chou, 2010). Foi adotado um valor de nível de efeito (F_a) de 0,5 para o cálculo de IC . Ainda que este possa ser calculado para qualquer F_a , a determinação mais rigorosa ocorre para $F_a = 0,5$ uma vez que o *plot* do efeito médio se apresenta pouco fidedigno nos extremos, pois trata-se da representação linear de uma função não linear (Kreis, Budman e Calabro, 2001).

Este modelo permitiu-nos ainda calcular o índice de redução da dose (DRI, do inglês *dose reduction index*) segundo a equação 3 para $F_a = 0,5$. O valor de DRI traduz quantas vezes a dose de um fármaco, no nosso caso o Doc, pode ser reduzida quando em associação para um dado nível de efeito anti-tumoral, comparativamente com o mesmo fármaco em monoterapia. Valores de DRI superiores a 1, ou inferiores a 1, indicam redução de dose favorável e não favorável, respetivamente. Para $DRI = 1$ não há indicação de redução da dose (Chou, 2010).

$$(DRI)_{Doc} = \frac{(Dx)_{Doc}}{(D)_{Doc}} = \frac{IC_{50} \text{ do Doc em monoterapia}}{IC_{50} \text{ do Doc na associação}} \quad (3)$$

Através do cálculo de IC, foram eleitas como as associações mais promissoras aquelas com o menor valor de IC, abaixo de 1. As melhores associações prosseguiram para os estudos subsequentes.

3.3. Avaliação da proliferação celular pelo ensaio MTT

Para compreender o efeito que os LAs e o Doc têm, em monoterapia e em associação, na proliferação de células de CaM, de CaB e de CaP, recorreu-se ao ensaio MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) que avalia a atividade metabólica celular.

O MTT, um sal de tetrazólio amarelo solúvel em água, é reduzido pelas células metabolicamente ativas formando sais de cor violeta, insolúveis em soluções aquosas, os cristais de formazano. Este processo de redução está associado à função de desidrogenases localizadas principalmente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas. Contudo, também pode ser devida à ação de moléculas como o NADH e o NADPH (equivalentes redutores) (Mosmann, 1983). Após a solubilização dos cristais de formazano, através da adição de solventes orgânicos, pode-se quantificar, por espectrofotometria, a quantidade de cristais formados (Buch *et al.*, 2012).

Para a realização deste estudo, as células foram preparadas e tratadas com os fármacos em monoterapia ou em associação. Após um tempo de incubação de 24, 48 e 72 horas, o meio dos poços foi removido, e as células foram lavadas com PBS. Depois, 200 µL de uma solução de MTT (Sigma M2128) na concentração de 0,5 mg/mL (em PBS) e pH=7,4 foi adicionado a cada poço e as células foram incubadas durante cerca de 2 horas no escuro a 37°C e 5% de CO₂. As linhas celulares MCF12A e RWPE-I foram incubadas *overnight*. Posteriormente, 200 µL de isopropanol ácido (Sigma I9516) a 0,04 M foram adicionados aos poços e as placas foram agitadas para dissolver os cristais de formazano. Os valores de absorvância foram medidos a 570 e a 620 nm num espectrofotómetro ELISA (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®). Os resultados estão expressos em percentagem de inibição da proliferação das células tratadas em relação às células controlo (não tratadas), normalizadas para 100%, utilizando a equação 4:

$$\text{Proliferação (\%)} = \frac{(A_{570nm} - A_{620nm})(\text{Células tratadas})}{(A_{570nm} - A_{620nm})(\text{Células controlo})} \times 100 \quad (4)$$

Os dados percentuais obtidos permitiram estabelecer curvas de dose-resposta e determinar o valor de IC_{50} utilizando o *software* GraphPad 8.0 (GraphPad Software).

Para cada LA, a seletividade das células tumorais em relação às normais foi avaliada, através do cálculo do índice de seletividade (SI, do inglês *selectivity index*), ou seja, a relação entre os valores de IC_{50} das linhas de células normais e tumorais, como descrito na equação 5 (Indrayanto, Putra e Suhud, 2021). Quanto maior for o valor SI, maior será a seletividade do LA em relação às células tumorais. De facto, um composto com $SI > 2$ é altamente seletivo para células tumorais (Awang *et al.*, 2014; Badisa *et al.*, 2009).

$$SI = \frac{IC_{50}^{célula\ não\ tumoral}}{IC_{50}^{célula\ tumoral}} \quad (5)$$

3.4. Avaliação de efeitos celulares das melhores associações

Com o intuito de compreender o papel dos LAs na resposta terapêutica à QT de diversos tipos de cancro, nomeadamente do CaM, do CaB e do CaP, realizaram-se estudos de citotoxicidade celular com as melhores associações obtidas na secção 3.2.2..

Para cada tipo de estudo houve uma condição controlo e várias condições experimentais que corresponderam à utilização de diferentes concentrações de Doc (Tabela 10). As células controlo (condição 1) não foram sujeitas a qualquer tratamento. Nas restantes condições, as células foram tratadas, em concomitância, com a concentração de IC_{50} dos LAs e com a concentração de Doc na qual se obteve o menor valor de IC inferior a 1 (condições 2-8 e 10-14).

Tabela 10. Concentrações de anestésicos locais Lid, Rop e Lev e de Doc em cada associação para avaliar a proliferação celular das células das linhas prostáticas PC3 e LNCaP.

Linha celular		PC3		LNCaP	
Condição	Legenda	[LA] (mM)	[Doc] (nM)	[LA] (mM)	[Doc] (nM)
1	Controlo	0	0	0	0
2	Lid	3,17	0	1,74	0
3	Rop	0,99	0	(¹)	(¹)
4	Lev	0,40	0	0,56	0
5	Doc	0	50	0	10
6	Doc + Lid	3,17	50	1,74	10
7	Doc + Rop	0,99	50	(¹)	(¹)
8	Doc + Lev	0,40	50	0,56	10

(¹) Condição não testada

3.4.1. Análise da viabilidade celular e perfil de morte celular por citometria de fluxo

A viabilidade celular foi determinada com recurso à citometria de fluxo, utilizando a dupla marcação com Anexina V (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo (IP). Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas e dentro destas, distinguir qual o mecanismo que desencadeou a morte celular (apoptose ou necrose).

A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos de carga negativa, nomeadamente a fosfatidilserina. Em células viáveis há uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada lipídica, sendo que no folheto interno existe fosfatidilserina, enquanto no folheto externo se encontram a fosfatidilcolina e esfingomiéline. Durante a apoptose ocorre a translocação da fosfatidilserina do folheto interno para o folheto externo da membrana celular, podendo ser identificada através da incubação das células com AnV-FITC. Este mecanismo ocorre enquanto ainda existe integridade da membrana celular, sendo um evento característico de células em apoptose inicial (Chen *et al.*, 2008; Vermes, Haanen e Reutelingsperger, 2000). Por outro lado, a perda da integridade da membrana celular, característica de células em necrose ou em fases mais avançadas da apoptose, permite a entrada de IP para o interior da célula. O IP é um composto capaz de intercalar no DNA, emitindo fluorescência (Abrantes *et al.*, 2010).

Assim, a dupla marcação AnV-FITC e iodeto de propídeo permite agrupar e classificar as populações celulares em 4 grupos distintos: grupo I, caracterizado por células viáveis; grupo II, caracterizado por células em apoptose inicial; grupo III, composto por células em apoptose tardia/necrose; e, por último, o grupo IV, caracterizado por células em necrose. Deste modo, cada um destes grupos possui um perfil de marcação característico. Assim, as células vivas apresentam-se negativas para a marcação dupla, enquanto as células em apoptose inicial se apresentam positivas para a marcação com AV-FITC e negativas para a marcação com o IP. As células que se apresentam positivas para a dupla marcação significa que se encontram em apoptose tardia/necrose e as células que se encontram em necrose apresentam-se negativas para a marcação com AV-FITC e positivas para a marcação com o IP (Tabela II) (Vermes, Haanen e Reutelingsperger, 2000).

Tabela 11: Padrões de marcação com anexina-V e iodeto de propídeo para os diferentes grupos de células.

Grupos	Anexina V	Iodeto de propídeo
Células vivas	-	-
Células em apoptose inicial	+	-
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Células em necrose	-	+

Para a realização desta técnica, foram utilizados 1×10^6 de células por tubo, obtidas após centrifugação, de uma suspensão celular, a 2500 rpm (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm), durante 5 min. As células foram previamente tratadas com diferentes concentrações de LA/Doc como descrito na Tabela 10. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 mL de PBS e lavado, por centrifugação, nas condições referidas anteriormente. O *pellet* resultante da centrifugação foi colocado em gelo e ressuspenso em 100 μ L de tampão de ligação frio, constituído por 0,01 M de Hapes (Sigma H7523), 0,14 M de NaCl e 0,25 mM de CaCl_2 (Sigma C4901), e incubou-se com 2,5 μ L de AnV-FITC e 1 μ L de iodeto de propídeo, durante 15 minutos na ausência de luz e à temperatura ambiente. Por último, adicionaram-se 400 μ L de tampão de ligação frio. A deteção foi feita num citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson), usando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e os comprimentos de onda de emissão de 530 nm para a AV-FITC e de 640 nm para o IP. Os resultados desta dupla marcação são apresentados na forma de percentagem de células presentes em cada grupo e baseiam-se na positividade e/ou negatividade de marcação para a AV-FITC/IP.

3.4.2. Análise da migração celular pelo *wound healing assay*

A capacidade de migração é uma das características fenotípicas principais das células tumorais. Assim, a migração celular foi avaliada pelo *wound healing assay*, o qual se baseia na criação de uma lesão (*wound*) na monocamada celular confluenta. As células na borda da fenda mover-se-ão em direção à abertura para fechar o "arranhão" até que novas interações célula-célula sejam novamente estabelecidas. As imagens são capturadas no início e durante a migração celular, e depois comparadas para determinar a taxa de migração celular (Liang, Park e Guan, 2007).

Assim, para este ensaio as células PC3 e LNCaP foram semeadas em placas de 24 poços com a uma densidade de 1×10^5 células por poço, e incubadas a 37°C, 5% CO_2 em meio completo. O crescimento celular foi permitido até à formação de uma monocamada

confluentes. Com a ponta de uma micropipeta estéril de 200 μ L fez-se um sulco na base de cada poço, de forma a se obter uma lesão uniforme linear sem qualquer célula aderente tal como mostrado na Figura 15. Os detritos foram removidos por lavagem das células duas vezes com PBS. De seguida, meio de cultura novo foi adicionado com diferentes concentrações de LA/Doc, correspondentes às condições 2-8 descritas na Tabela 10. As células foram posteriormente incubadas a 37°C e 5% de CO₂. O fecho das feridas (imagens das áreas arranhadas em cada condição) foi fotografado imediatamente após a criação do risco (tempo 0 horas), 4, 24 e 48 horas. As fotos digitais foram obtidas a partir de um microscópio invertido Motic AE31 e de câmara Moticom 5000 cooled (Jed Pella, Inc.) e analisadas através do programa *Motic Images Advanced 3.2* (Jed Pella, Inc.). A migração celular para a zona de deteção foi medida com o auxílio da ferramenta de contagem de células do programa de análise *ImageJ* (versão 1.45s). Os resultados foram expressos em percentagem de zona fechada e normalizada para controlo. Para cada condição testada efetuaram-se 3 réplicas e para cada réplica tiraram-se 3 fotografias.

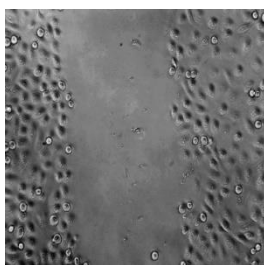


Figura 15: Imagem representativa de células PC3 imediatamente após a criação do risco.

3.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao *software* GraphPad 8.0.

Na análise de proliferação celular segundo o ensaio do MTT, os valores experimentais obtidos foram ajustados a um modelo de dose-resposta sigmoidal, descrito na Equação 6.

$$\text{Proliferação (\%)} = A1 + \frac{A2-A1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (6)$$

onde A1 e A2 correspondem às assíntotas da curva, x_0 à concentração inibitória média (IC₅₀) e p corresponde ao fator de inclinação. Após o ajuste matemático, foram obtidos os seguintes parâmetros estatísticos: coeficiente de ajuste da curva (r^2) e intervalo de confiança com nível de confiança de 95% (IC95%) do valor de IC₅₀. Foi considerada a existência de diferenças estatisticamente significativas nos casos em que não houve sobreposição de IC95% dos IC₅₀ dos fármacos.

O índice de combinação (IC) foi calculado através software *CompuSyn*, que define efeito sinérgico ($IC < 1$), efeito aditivo ($IC = 1$) e efeito antagônico ($IC > 1$).

A distribuição normal foi avaliada utilizando o teste *Shapiro-Wilk* para todas as outras experiências. A detecção de *outliers* foi realizada utilizando o método ROUT com $Q=10\%$. Por defeito, foram utilizados testes paramétricos em caso de distribuição normal e testes não paramétricos, caso contrário.

A comparação dos valores obtidos entre diferentes condições terapêuticas, dentro da mesma linha celular e entre linhas celulares para a mesma condição terapêutica, foi realizada segundo o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator, com comparações múltiplas segundo o teste de *Tukey*.

As comparações entre as várias condições terapêuticas (para cada linha celular) foram realizadas segundo o teste ANOVA de um fator (no caso de distribuição normal e homogeneidade de variâncias) ou segundo o teste *Kruskal-Wallis* (caso contrário). As comparações múltiplas em caso de variâncias não presumidas foram realizadas segundo o teste de *Dunn* ou com a correção de *Sidak* em caso contrário.

Considerou-se uma significância de 0,05 para todas as comparações.

Resultados

A potencial sinergia proveniente da associação de LAs com os fármacos anticancerígenos convencionalmente utilizados no tratamento de CaM, de CaB e de CaP poderá diminuir a toxicidade associada à QT. Adicionalmente, poderá permitir o aumento ou a manutenção da eficácia destes fármacos através do aumento da tolerância aos fármacos utilizados nos regimes de QT. Consequentemente, poderá melhorar a QdV dos doentes.

Numa primeira fase pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico de LAs em células tumorais e não tumorais de mama, de bexiga e de próstata. Posteriormente, avaliou-se o efeito da associação de LAs com Doc, o qual está incluído nos principais regimes de QT usados no tratamento de CaP. Os efeitos da associação de LAs ao fármaco quimioterapêutico Doc, foram determinados a nível da atividade metabólica, da viabilidade e do perfil de morte celulares e da migração, recorrendo-se, para tal, a diferentes técnicas de biologia celular e molecular. Para obter estes resultados foram utilizadas as metodologias descritas no capítulo anterior.

4.1. Avaliação da atividade metabólica

De modo a avaliar o efeito do tratamento dos LAs em monoterapia nas cinco linhas celulares tumorais anteriormente descritas, bem como para avaliar o efeito da associação de LAs a Doc nas linhas celulares de CaP, realizou-se o ensaio de MTT que avalia a proliferação celular de forma indireta através de reações metabólicas. Para avaliar a seletividade dos LAs, a atividade metabólica de três linhas celulares normais, previamente descritas (MCF-12A, HaCaT e RWPE-1), também foi avaliada.

4.1.1. Atividade metabólica em resposta aos anestésicos locais em monoterapia

Como referido anteriormente, recorreu-se ao ensaio de MTT para avaliar os efeitos dos LAs estudados na proliferação celular. Nas Figuras 16, 17 e 18 encontram-se representadas as curvas de dose-resposta obtidas 48h após o tratamento com os três LAs considerados neste projeto, a Lid, a Rop e a Lev. A partir das curvas dose-resposta obtidas foi possível determinar as concentrações inibitórias médias (IC_{50}), ou seja, as concentrações necessárias para inibir a proliferação celular em 50%, cujos valores estão apresentados na Tabela 12.

De acordo com as Figuras 16, 17 e 18, verifica-se que a resposta após o tratamento com os três LAs é dependente da concentração à qual as células foram submetidas. Em geral, verifica-se que a linha celular tumoral de mama, MCF-7 demonstra ser a mais sensível a todos

os fármacos enquanto as linhas celulares tumorais de próstata, LNCaP e PC3 se apresentam como as menos sensíveis. Além disso, é de salientar que, a Lev é o LA que apresenta maior atividade anti-proliferativa, visto que o IC_{50} assume concentrações mais baixas (Tabela 12).

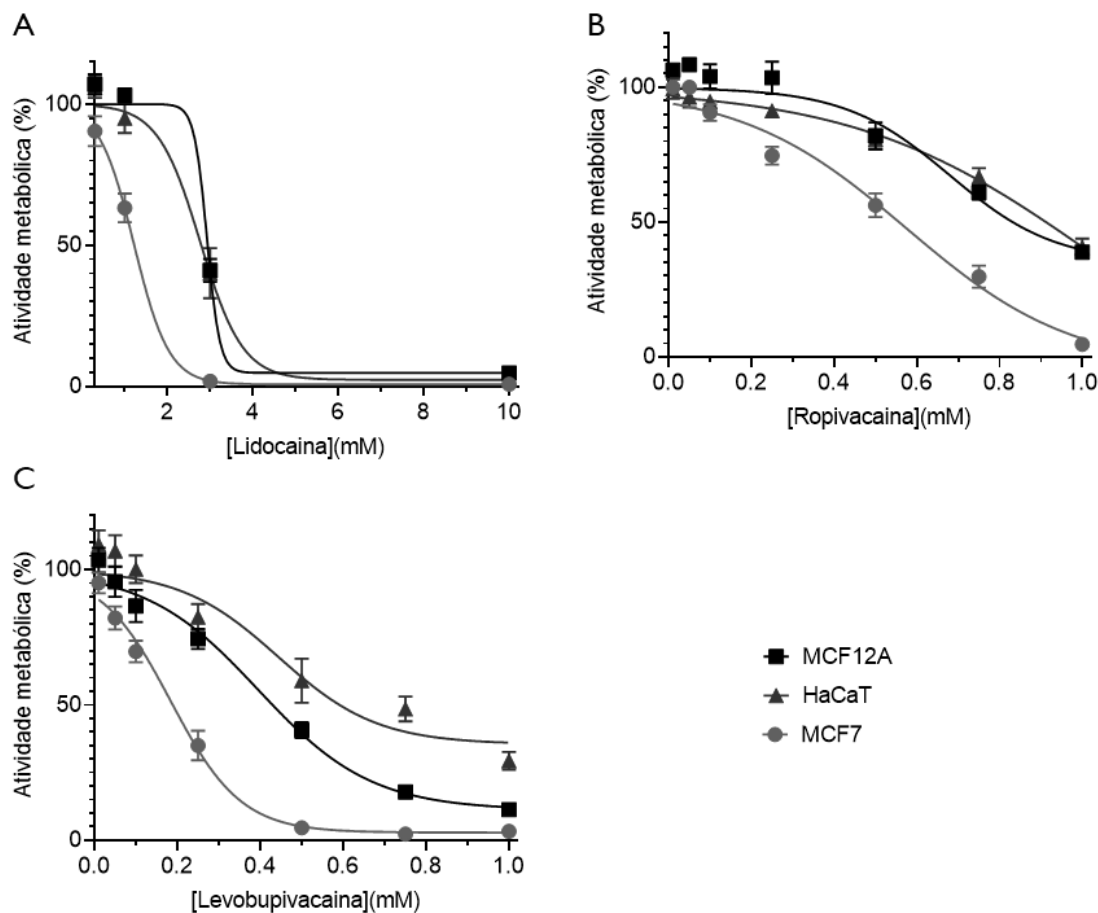


Figura 16: Curvas de dose-resposta das células de mama (MCF-7 e MCF-12A) e queratinócitos (HaCaT) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

No que concerne às células tumorais de mama, MCF-7, verifica-se que a resposta após o tratamento com os três LAs é dependente do tempo de incubação (Anexo I). Em particular, para a Lid, após 24h de incubação, o valor de IC_{50} obtido foi de 1,87 mM. Este valor foi significativamente superior ($p < 0,005$) ao obtido após 48 e 72h de incubação ($IC_{50} = 1,16$ mM e $IC_{50} = 0,91$ mM, respetivamente) (Figura 16-A). Resultados semelhantes foram obtidos com os LAs de longa duração, para os mesmos tempos experimentais. Particularmente, após 24h de incubação com Rop, o valor de IC_{50} obtido foi de 0,90 mM, o qual foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao obtido após 48 e 72h de tratamento ($IC_{50} = 0,55$ mM e $IC_{50} = 0,42$ mM, respetivamente) (Figura 16-B). Após 24h de incubação com Lev, o valor de IC_{50} obtido foi de

0,35 mM, o qual foi significativamente superior ($p < 0,001$) ao obtido após 48 e 72h de incubação ($IC_{50} = 0,16$ mM e $IC_{50} = 0,11$ mM, respetivamente) (Tabela 12 e Figura 16-C).

Considerando a Figura 16 e a Tabela 12, observou-se que após 48h de tratamento com os LAs, os valores de IC_{50} determinados para a linha celular tumoral de mama, MCF-7 foram de 1,16 mM, 0,55 mM e 0,16 mM para a Lid, a Rop e a Lev, respetivamente. Estes valores são significativamente inferiores ($p < 0,001$) aos valores de IC_{50} obtidos para a linha celular de mama normal, MCF-12A, para os mesmos LAs ($IC_{50} = 2,69$ mM, $IC_{50} = 0,86$ mM e $IC_{50} = 0,42$ mM para a Lid, a Rop e a Lev, respetivamente), resultando num índice de seletividade (SI) de 2,3, de 1,6 e de 2,6, respetivamente. Em relação à linha celular de queratinócitos de pele, a linha HaCaT, os valores de IC_{50} obtidos foram significativamente superiores ($p = 0,002$) aos obtidos na linha tumoral ($IC_{50} = 2,55$ mM, $IC_{50} = 0,90$ mM e $IC_{50} = 0,64$ mM para a Lid, a Rop e a Lev, respetivamente), associados a um SI de 2,2, de 1,6 e de 4, respetivamente. Estes valores de SI sugerem uma alta seletividade dos LAs em relação às células tumorais, onde um LA com um valor de $SI > 1$ é seletivo e com $SI > 2$ é altamente seletivo para células tumorais.

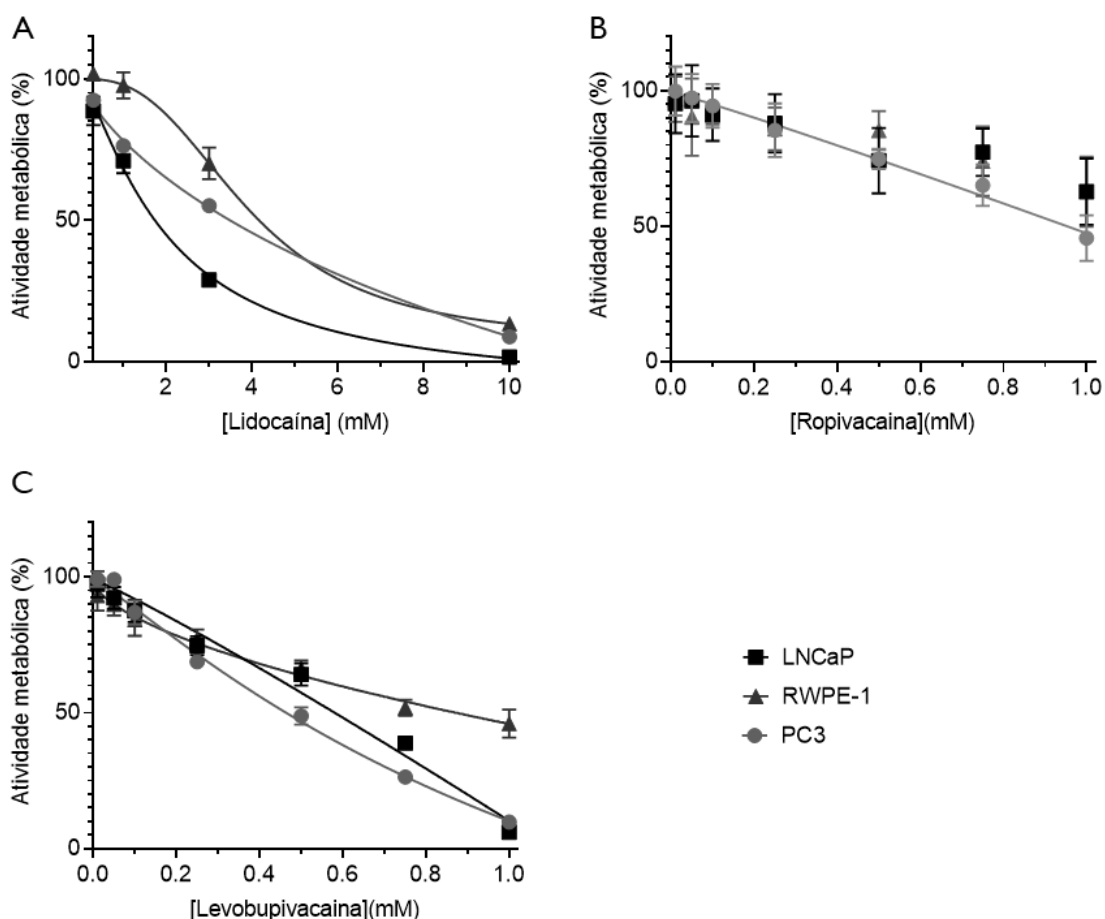


Figura 17: Curvas de dose-resposta das células de próstata (PC3, LNCaP e RWPE-1) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto

experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

No que concerne às linhas celulares de próstata, a linha celular não tumoral RWPE-I, que expressa apenas o recetor de androgénio, após 48h de incubação com os LAs, apresentou valores de IC_{50} de 4,25 mM e de 0,86 mM para a Lid e para a Lev, respetivamente (Tabela 12). Estes valores são significativamente superiores ($p < 0,001$) aos obtidos para a linha tumoral hormono-dependente LNCaP ($IC_{50}=1,74$ mM e $IC_{50}=0,56$ mM para a Lid e para a Lev, respetivamente), associados a valores de SI de 2,4 e de 1,5. As células que não expressam recetores hormonais, as PC3, apresentaram valores de IC_{50} significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos obtidos para a linha celular RWPE-I ($IC_{50}=3,17$ mM, $IC_{50}=0,99$ mM e $IC_{50}=0,40$ mM para a Lid, a Rop e a Lev, respetivamente) com valores de SI associados de 1,3 para a Lid e de 2,2 para a Lev. Além disso, a concentração máxima testada não permitiu obter um valor de IC_{50} para as linhas celulares LNCaP e RWPE-I, sendo necessário mais de 1 mM para inibir a proliferação celular em 50% (Figura 17-B).

Considerando a Tabela 12 e as Figura 17, verifica-se que a linha celular de CaP hormono-dependente LNCaP demonstrou ser significativamente mais sensível ($p < 0,001$) à Lid ($IC_{50}=1,74$ mM) que a linha PC3 ($IC_{50}=3,17$ mM). Alternativamente, a linha celular hormono-independente PC3 foi significativamente mais sensível ($p < 0,05$) à Rop ($IC_{50}=0,99$ mM) e à Lev ($IC_{50}=0,40$ mM) que a linha celular LNCaP ($IC_{50} > 1$ mM e $IC_{50}=0,56$ mM para a Rop e para a Lev, respetivamente).

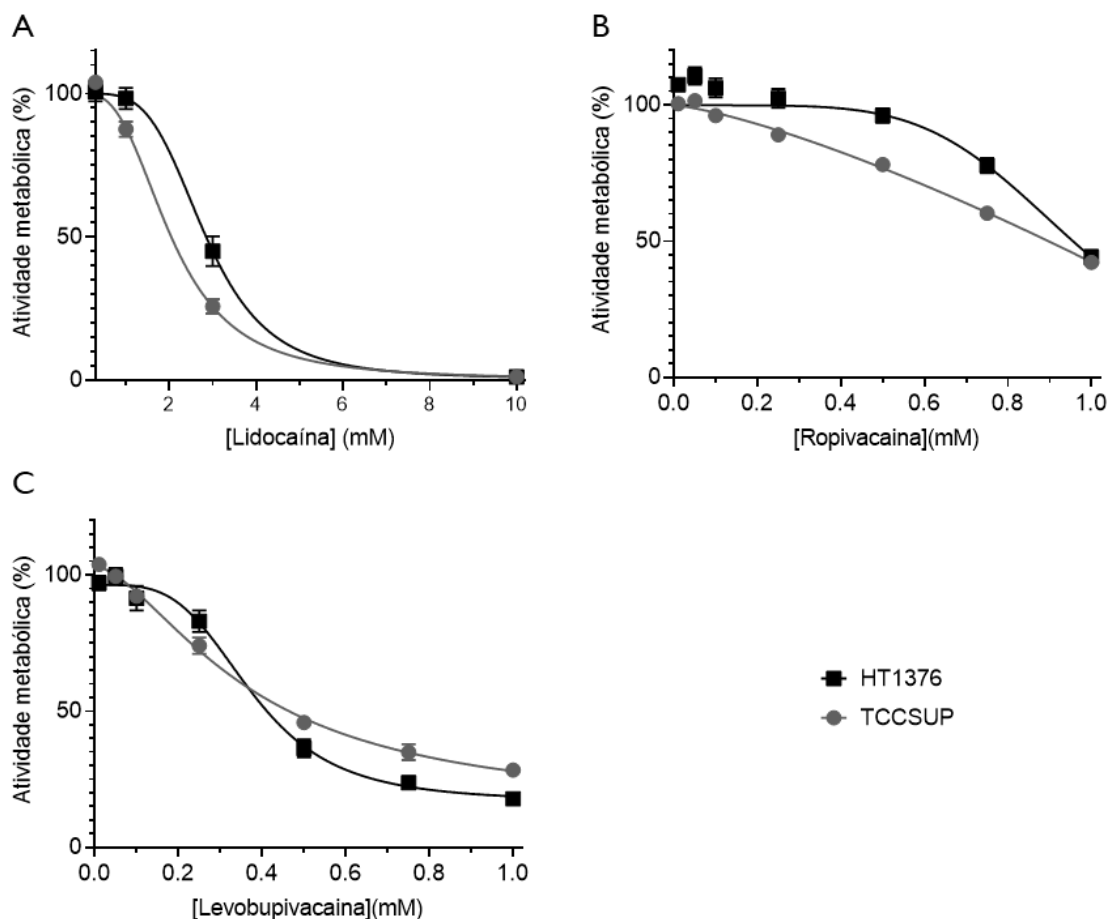


Figura 18: Curvas de dose-resposta das células de bexiga (TCCSUP e HT1376) após tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

Observando a Figura 18 e a Tabela 12, relativamente às linhas celulares de bexiga, verificou-se que após 48h de incubação com os LAs, a linha tumoral TCCSUP apresentou valores de IC_{50} de 1,99 mM e de 0,86 mM para a Lid e para a Rop, respetivamente. Estes valores são significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos obtidos para a linha tumoral HT1376 ($IC_{50} = 2,84$ mM e $IC_{50} = 0,99$ mM para a Lid e para a Rop, respetivamente), sugerindo que as células TCCSUP são mais sensíveis ao tratamento com Lid e com Rop. Alternativamente, a linha celular HT1376 mostrou ser mais sensível para a Lev, apresentando um valor de IC_{50} de 0,39 mM, significativamente inferior ($p < 0,05$) ao obtido para as células TCCSUP após 48h de incubação com Lev ($IC_{50} = 0,47$ mM). Estes dados, em concordância com os obtidos para as linhas celulares de CaP sugerem que a resposta aos LAs é específica para o tipo de células.

Tabela 12: Valores de IC_{50} , obtidos pelo ensaio de MTT, dos anestésicos Lid, Rop e Lev nas linhas celulares de mama (MCF-7 e MCF-12A), próstata (PC3, LNCaP e RWPE – I), bexiga (TCCSUP e HT1376) e queratinócitos (HaCaT). Os resultados dos IC_{50} e respectivos $IC_{95\%}$ estão expressos em mM. Para o cálculo do IC_{50} foram utilizadas 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

Linha celular	Tempo (h)	Lidocaína			Ropivacaína			Levobupivacaína		
		IC_{50} (mM)	R^2	$IC_{95\%}$ (mM)	IC_{50} (mM)	R^2	$IC_{95\%}$ (mM)	IC_{50} (mM)	R^2	$IC_{95\%}$ (mM)
MCF-7	24	1,87	0,94	[1,67 ; 2,11]	0,90	0,96	[0,84 ; 0,96]	0,35	0,88	[0,31 ; 0,39]
	48	1,16	0,99	[0,99 ; 1,34]	0,55	0,97	[0,47 ; 0,60]	0,16	0,91	[0,14 ; 0,19]
	72	0,91	0,97	[0,84 ; 0,98]	0,42	0,84	[0,37 ; 0,46]	0,11	0,88	[0,10 ; 0,13]
MCF12A	48	2,69	0,99	[2,60 ; 2,99]	0,86	0,99	[0,82 ; 0,90]	0,42	0,98	[0,36 ; 0,45]
HaCaT	48	2,55	0,99	[2,21 ; 3,08]	0,90	0,98	[0,84 ; 0,98]	0,64	0,99	[0,54 ; 0,73]
PC3	48	3,17	0,98	[2,90 ; 3,50]	0,99	0,98	[0,89 ; 1,15]	0,40	0,97	[0,37 ; 0,44]
LNCaP	48	1,74	0,99	[1,48 ; 2,06]	>1	-	-	0,56	0,95	[0,51 ; 0,61]
RWPE-I	48	4,25	0,99	[4,02 ; 4,72]	>1	-	-	0,86	0,99	[0,76 ; 1,06]
TCCSUP	48	1,99	0,98	[1,81 ; 2,18]	0,86	0,99	[0,81 ; 0,92]	0,47	0,99	[0,46 ; 0,54]
HT1376	48	2,84	0,99	[2,82 ; 2,85]	0,99	0,99	[0,94 ; 1,06]	0,39	0,97	[0,36 ; 0,42]

Pela análise dos resultados mostrados nas Figuras 16, 17 e 18 e da Tabela 12, verificou-se que os LAs diminuíram a proliferação das linhas celulares tumorais de um modo significativamente mais evidente e específica em comparação às linhas celulares normais, na medida em que todos os valores de SI são superiores a 1. De uma forma geral, a Lev demonstrou ser o LA mais seletivo para linhas celulares tumorais uma vez que assume os maiores valores de SI obtidos (SI=1,5- 4).

4.1.2. Atividade metabólica em resposta ao docetaxel em monoterapia e em associação com os anestésicos locais

Uma vez efetuada a avaliação do efeito da Lid, da Rop e da Lev em monoterapia na proliferação celular, procedeu-se à avaliação em monoterapia do Doc por forma a obter as respetivas curvas dose-resposta e os valores de IC_{50} para as linhas LNCaP e PC3 (Figura 19 e Tabela 13). Nos estudos apresentados subsequentemente, as concentrações de Lid, de Rop e de Lev utilizadas corresponderam aos valores de IC_{50} conforme descrito na Tabela 12.

Após o tratamento das células com a associação de cada LA com o Doc, segundo o desenho experimental descrito na secção dos Materiais e Métodos, a proliferação celular foi avaliada com recurso ao ensaio de MTT.

O modelo de combinação permitiu a determinação dos valores de IC_{50} do Doc quando presente em terapia combinada com cada LA. Os valores de IC_{50} para as linhas celulares de próstata PC3 e LNCaP estão descritos na Tabela 13 e as respectivas curvas dose-resposta representadas na Figura 19. Estes são comparados com os valores de IC_{50} do Doc obtidos em monoterapia, isto é, na ausência de LAs.

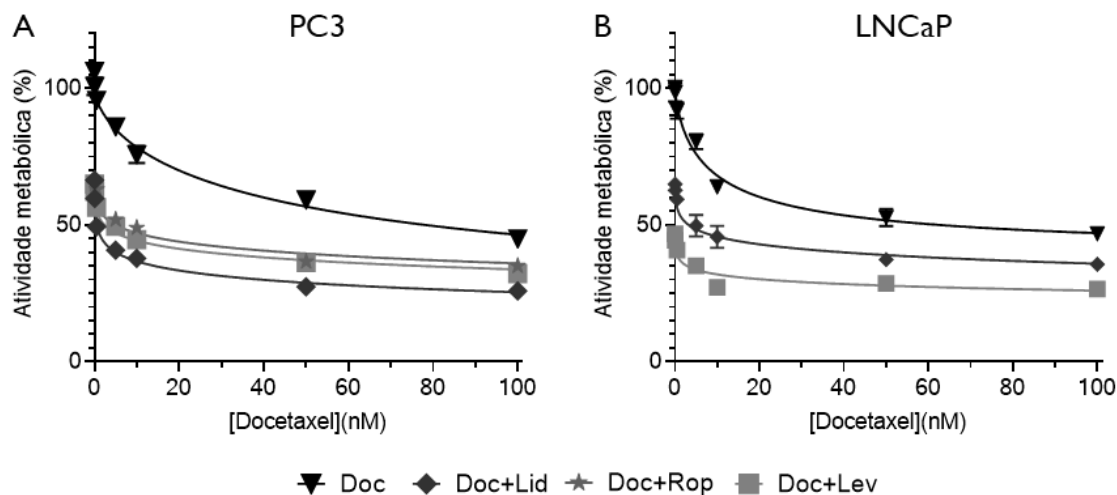


Figura 19: Curvas de dose-resposta das células tumorais de próstata (A) PC3 e (B) LNCaP após tratamento com Doc em monoterapia e em associação com os LAs. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 48h do tratamento com Doc, com Doc+Lid, com Doc+Rop e com Doc+Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

De acordo com Figura 19 e com a Tabela 13, verificou-se que a linha celular LNCaP aparentou ser mais sensível ao Doc, apresentando um valor de IC_{50} de 68,40 nM enquanto para a linha celular PC3 o valor de IC_{50} foi de 82,79 nM. Contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de IC_{50} obtidos.

Tabela 13: Valores de índice de redução de dose (DRI) e de IC_{50} do Doc em monoterapia e em associação com Lid, com Rop e com Lev nas linhas celulares de próstata PC3 e LNCaP após 48h do tratamento. Os resultados dos IC_{50} estão expressos em nM. Para o cálculo do IC_{50} foram utilizadas 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

Fármaco/ Associação	PC3				LNCaP			
	IC_{50} (nM)	R^2	$IC_{95\%}$ (nM)	DRI	IC_{50} (nM)	R^2	$IC_{95\%}$ (nM)	DRI
Doc	82,79	0,96	[66,84 ; 104,7]	-	68,40	0,93	[43,60 ; 95,43]	-
Doc+Lid	0,54	0,93	[0,36 ; 0,73]	153,31	3,59	0,93	[1,52 ; 7,87]	19,05
Doc+Rop	8,50	0,86	[5,64 ; 12,30]	9,74	-	-	-	-
Doc+Lev	4,61	0,88	[2,89 ; 7,01]	17,96	0,003	0,94	[0,0005 ; 0,01]	22800

As interações com o fármaco foram avaliadas por intermédio do *software* CompuSyn com base no modelo matemático descrito na secção 3.2.2. e que permite estudar o efeito da associação dos fármacos em comparação com o seu efeito isolado, através do cálculo do índice de combinação (IC), cujo valor indica a presença de efeito sinérgico ($IC < 1$), de efeito aditivo ($IC = 1$) ou de efeito antagónico ($IC > 1$) e do índice de redução de dose, cujo valor indica uma redução de dose favorável ($DRI > 1$), desfavorável ($DRI < 1$) ou sem indicação para redução de dose ($DRI = 1$).

A análise da Tabela 13 e da Figura 19 respeitantes às linhas celulares PC3 e LNCaP será feita de seguida tendo por base os valores de IC descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Valores dos índices de combinação (IC) obtidos nas linhas celulares de cancro da próstata PC3 e LNCaP após 48h de tratamento.

[Doc] (nM)	Índice de Combinação (IC)				
	PC3			LNCaP	
	Lid 3,19 mM	Rop 0,99 mM	Lev 0,40 mM	Lid 1,74 mM	Lev 0,56 mM
0,01	1,86	1,61	1,73	0,95	0,96
0,05	1,43	1,58	1,57	0,88	0,87
0,5	0,98	1,51	1,30	0,80	0,75
5	0,75	1,17	1,19	0,62	0,60
10	0,62	1,12	0,98	0,60*	0,42*
50	0,55*	0,93*	0,86*	0,64	0,55
100	0,66	1,08	0,87	0,82	0,59

As condições na qual um efeito sinérgico foi observado ($IC < 1$) encontram-se destacados a negrito; *Dizem respeito às associações eleitas como as mais promissoras.

Numa primeira análise da Tabela 13, verifica-se de uma forma geral que a presença de LAs induziu uma diminuição estatisticamente significativa do IC_{50} do Doc, comparativamente com o IC_{50} do mesmo em monoterapia para ambas as linhas celulares.

Todas as associações nas células PC3 ao fim de 48h de tratamento mostraram resultados promissores com redução da ordem de grandeza do IC_{50} de Doc (Figura 19-A). Observou-se a maior diminuição do valor de IC_{50} na associação de Doc e Lid ($IC_{50}=0,54$ nM) em relação ao valor obtido para o Doc em monoterapia ($IC_{50}=82,79$ nM) associado a um valor de DRI de 153,31, isto é, é necessário cerca de 153,31 vezes menos concentração de Doc quando em associação com a Lid para se obter a mesma inibição da proliferação celular com Doc em monoterapia. Por outro lado, a diminuição observada com a associação de Lid com Doc traduziu-se em efeito sinérgico para todas as concentrações de Doc a partir de 0,5 nM,

observando-se valores de IC entre 0,55 (Lid 3,17 mM + Doc 50 nM) e 0,98 (Lid 3,17 mM + Doc 0,5 nM), como descrito na Tabela 14. Quanto à associação de Doc com Rop observou-se igualmente a diminuição do IC₅₀ do Doc, no entanto apenas se verificou a existência de sinergia no regime terapêutico em que o Doc apresenta uma concentração de 50 nM (IC=0,93). Neste caso, o IC₅₀ do Doc na ausência de Rop foi de 82,79 nM, reduzindo para 8,51 nM na presença de Rop, associada a um DRI=9,74. Analisando a Tabela 13 verifica-se igualmente que a Lev conduz à redução significativa do IC₅₀ do Doc quando em associação (IC₅₀=4,61) em relação ao seu valor em monoterapia (IC₅₀=82,79 nM), observando-se um valor de DRI de 17,96. No entanto, um efeito sinérgico entre estes fármacos apenas foi observado para concentrações de Doc de 10 nM (IC=0,98), de 50 nM (IC=0,86) e de 100 nM (IC=0,87).

Nas células LNCaP, após 48h de incubação com o Doc em monoterapia e em associação com Lid ou com Lev, verificou-se que ambas as associações testadas culminaram na redução do valor de IC₅₀ do Doc obtido em monoterapia (IC₅₀=68,40 nM), particularmente para 3,59 nM quando associado a Lid e para 0,003 mM em associação com Lev, permitindo obter valores de DRI de 19,05 e de 22800, respetivamente (Tabela 13 e Figura 19-A). Como observado na Tabela 14, a associação de Doc e de Lev traduziu-se em efeito sinérgico para todas as concentrações de Doc, observando-se valores de IC entre 0,42 (Lev 0,56 mM + Doc 10 nM) e 0,96 (Lev 0,56 mM + Doc 0,01 nM), sendo esta considerada a associação mais eficaz nas células LNCaP. No que concerne a associação de Lid e de Doc, verificou-se a existência de sinergia para quase todas as concentrações de Doc, com valores de IC entre 0,60 (Lid 1,74 mM + Doc 10 nM) e 0,95 (Lid 1,74 mM + Doc 0,01 nM).

Pela análise simultânea da Tabela 13 e Tabela 14 verifica-se que em ambas as linhas celulares, todas as associações com Doc na concentração de 50 nM demonstraram ser sinérgicas (IC=0,55-0,93). Além disso, a associação de Lev com o Doc aparenta ser a mais sinérgica, permitindo a redução da dose de Doc em cerca de 17,96-22800 vezes de modo a obter o mesmo efeito na proliferação celular que quando Doc está em monoterapia.

4.2. Avaliação dos efeitos celulares das melhores associações

Após a avaliação do efeito da associação dos fármacos na proliferação celular, elegeram-se as condições que aparentavam ser mais promissoras, após 48 horas de incubação nas linhas celulares PC3 e LNCaP, para avaliar as alterações na capacidade de migração celular. Na linha celular PC3, as melhores condições foram ainda avaliadas a nível da viabilidade e do perfil de morte celular. Os resultados são descritos abaixo.

4.2.1. Viabilidade Celular e Perfil de Morte Celular

A avaliação da viabilidade e da morte celular foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com anexina-V-FITC e com iodeto de propídeo (IP).

Como referido anteriormente, esta técnica permite-nos distinguir as diferentes populações celulares: células viáveis (V), células em apoptose inicial (AI), células em apoptose tardia e necrose (AT/N) e células em necrose (N). A Figura 20 representa os efeitos na viabilidade e no perfil de morte celular, em células das linhas PC3 de CaP, incubadas durante 48h, com o valor de IC₅₀ dos LAs e de Doc na concentração de 50 nM em monoterapia e, com os mesmos LAs em associação com Doc.

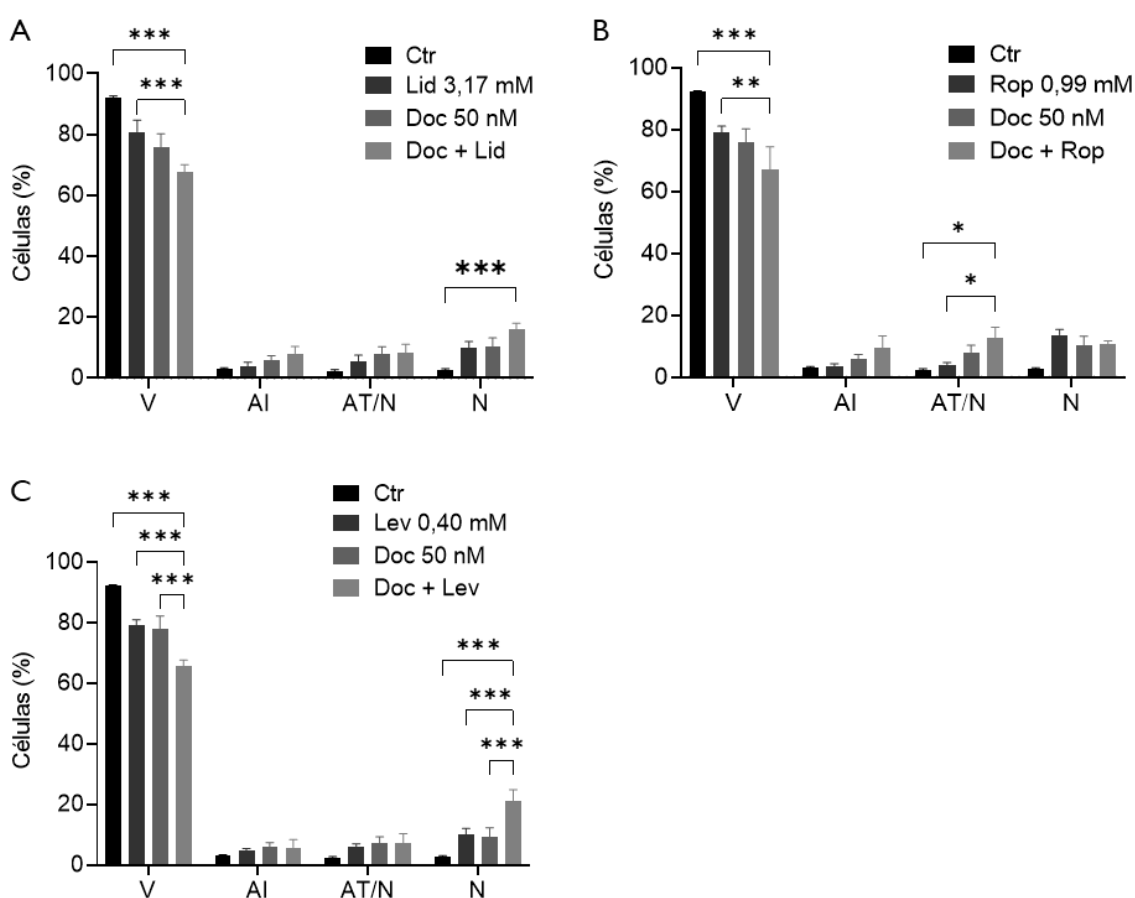


Figura 20: Viabilidade e vias de morte celular. Os resultados foram obtidos para as células PC3 por citometria de fluxo através da dupla marcação com AnV/IP 48h horas após o tratamento com os LAs e Doc em monoterapia e em associação: (A) Doc+Lid; (B) Doc+Rop e (C) Doc+Lev. Os resultados encontram-se expressos como a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo e após os tratamentos com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$. Os resultados apresentam a média \pm SEM de 3 experiências independentes em duplicado para cada ponto experimental.

Analisando a Figura 20, verificamos que a associação de Doc com Lid diminuiu significativamente a viabilidade das células PC3 ($p < 0,001$) de $92,1 \pm 1,2\%$ no controlo para $67,5 \pm 5,3\%$ nas células tratadas com a terapia combinada, com consequente aumento significativo de morte celular, de $7,9 \pm 1,2\%$ no controlo para $32,5 \pm 5,3\%$ no tratamento combinado. A percentagem de células vivas obtida após a terapia combinada ($67,5 \pm 5,3\%$) foi ainda estatisticamente inferior ($p < 0,001$) à obtida após tratamento com Lid em monoterapia ($80,9 \pm 3,8\%$). Das diversas vias de morte, salienta-se que morte celular após terapia combinada ocorreu essencialmente por necrose ($16,0 \pm 2,0\%$), apenas com diferenças em relação ao controlo ($2,5 \pm 0,6\%$). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a associação de Lid e Doc e o tratamento com Doc em monoterapia.

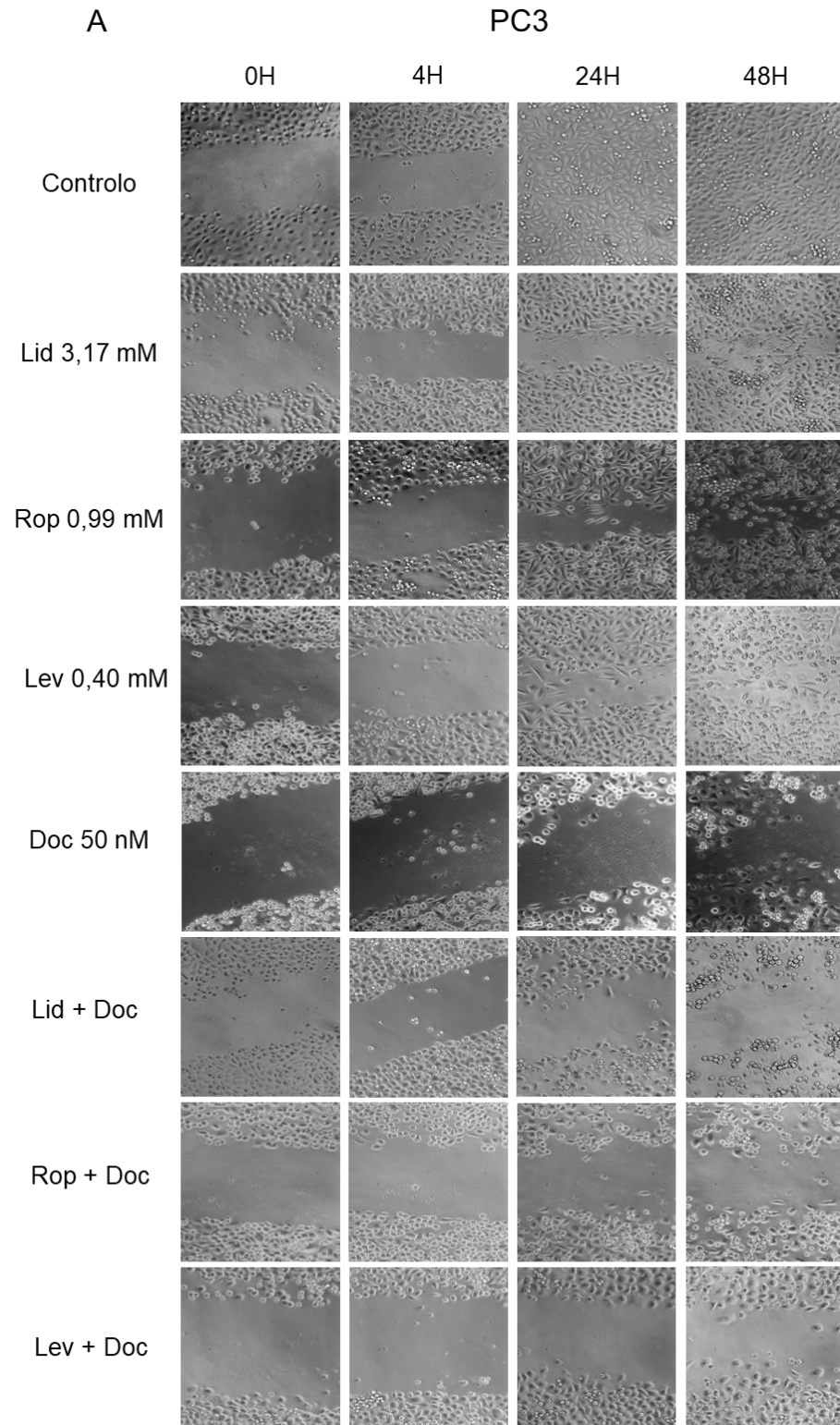
Paralelamente, com a associação de Doc com Rop, a viabilidade celular decresceu significativamente ($p < 0,001$) de $92,1 \pm 1,2\%$ no controlo para $67,2 \pm 7,3\%$ nas células PC3 após tratamento com a associação e com consequente aumento da morte celular de $7,9 \pm 1,2\%$ para $32,8 \pm 7,3\%$. A percentagem de células vivas, obtida com a associação de fármacos, foi também estatisticamente inferior ($p < 0,01$) à obtida com os tratamentos apenas com Rop ($78,8 \pm 2,2\%$). Em relação ao perfil de morte celular, verificou-se o aumento significativo da morte celular por apoptose tardia/necrose ($p < 0,05$) após o tratamento com a associação ($12,5 \pm 3,5\%$) em relação ao obtido nas células controlo ($2,2 \pm 0,5\%$) e nas células tratadas apenas com Rop ($4,0 \pm 0,7\%$). Não se verificaram diferenças estatísticas entre a associação de Rop e Doc e o tratamento com Doc em monoterapia.

Na associação de Lev e de Doc, verificou-se que a viabilidade celular diminuiu significativamente ($p < 0,001$), passando de $92,1 \pm 1,2\%$ no controlo para $65,6 \pm 1,5\%$ nas células tratadas com a terapia combinada, com consequente aumento significativo da morte celular, de $7,9 \pm 1,2\%$ para $34,4 \pm 1,5\%$. A percentagem de células vivas, obtida com a associação de fármacos, foi também estatisticamente inferior ($p < 0,001$) à obtida com os tratamentos apenas com Lev ($79,2 \pm 1,7\%$) ou apenas com Doc ($75,8 \pm 4,4\%$). Assim, esta foi considerada a associação mais promissora nesta linha celular. A morte celular após o tratamento combinado foi predominantemente por necrose, tendo-se obtido o valor percentual de $21,2 \pm 3,6\%$, estatisticamente superior ($p < 0,001$) ao obtido nas células controlo ($2,5 \pm 0,6\%$) e nas células tratadas em monoterapia com Lev ($13,0 \pm 2,1\%$) ou com Doc ($10,4 \pm 2,8\%$).

4.2.2. Migração Celular

De acordo com os resultados acima descritos na secção 4.1.2, procurámos estudar em maior detalhe o efeito dos LAs (em monoterapia na concentração correspondente ao IC_{50} e em associação com Doc) na capacidade de migração das linhas celulares de CaP utilizando o ensaio de cicatrização de feridas, tal como descrito na secção 3.4.2. Nesta experiência observámos a capacidade de migração celular antes da incubação com os fármacos acima referidos (0 horas), e 4, 24 e 48 horas após a sua administração, para as linhas celulares PC3 e LNCaP (Figuras 22 e 23). Os resultados representam a percentagem de área fechada, foram normalizados ao tempo 0 h e são expressos como média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.

Ambas as linhas celulares PC3 e LNCaP de CaP, demonstraram capacidade de migração, verificando-se o fecho completo da ferida às 48 horas na condição controlo (Figura 21).



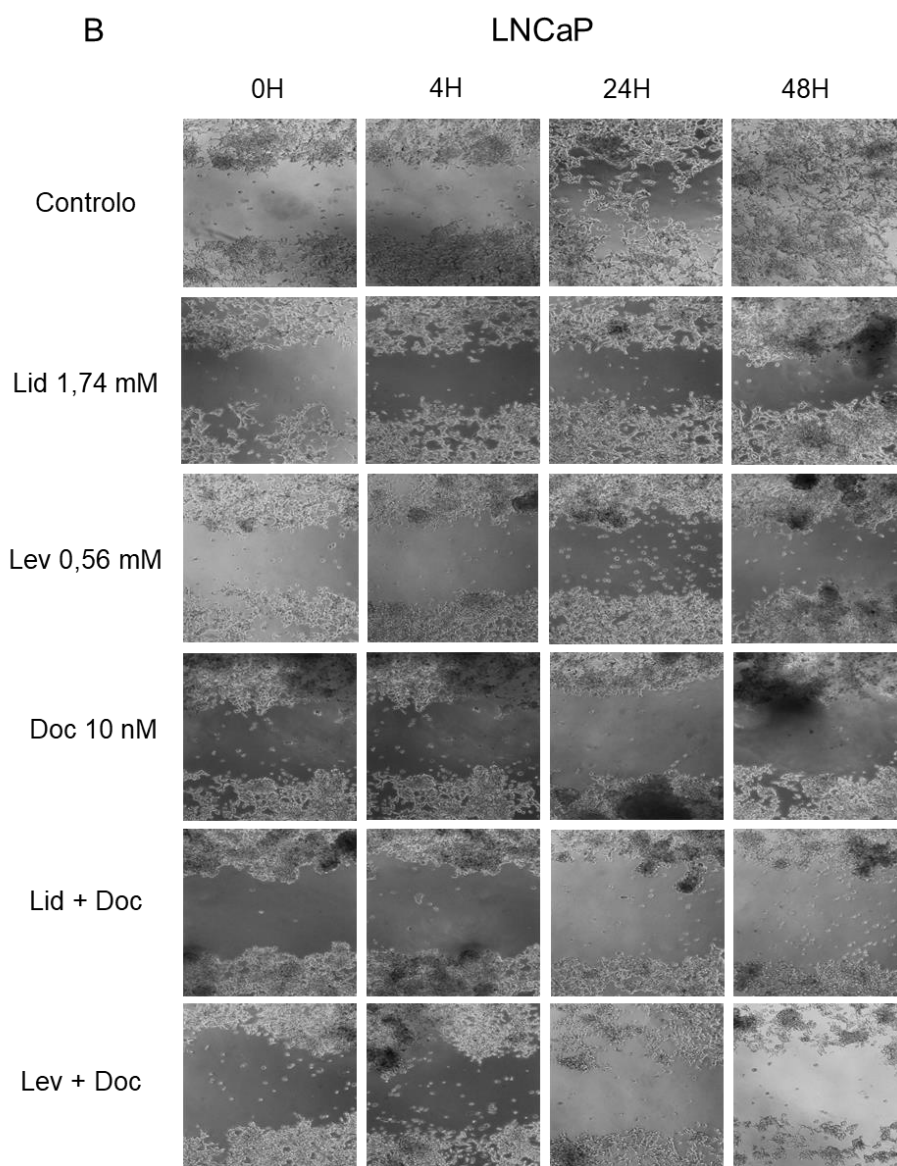


Figura 21: Imagens representativas do ensaio de cicatrização de feridas nas linhas celulares (A) PC3 e (B) LNCaP incubadas com os LAs e Doc em monoterapia e em associação, às 0, 4, 24 e 48 horas. Os resultados são representativos das imagens de microscopia ótica da zona do risco (ampliação de 20x).

No que concerne a linha celular PC3, através da Figura 22, verificou-se que todas as associações testadas resultaram na diminuição acentuada da migração celular. Além disso, após 4h de incubação, não se verificaram diferenças estatísticas entre a percentagem de área fechada obtida na terapêutica combinada e as restantes condições, para todas as associações testadas.

Após 24 e 48h, a associação de Doc e de Lid diminuiu significativamente a migração celular ($p < 0,001$) de $150,23 \pm 8,10\%$ e $195,24 \pm 3,48\%$ no controlo para $59,59 \pm 9,12\%$ e $29,22 \pm 3,86\%$ nas células tratadas com a terapia combinada, respetivamente. Além disso, após 48h de incubação, a percentagem de área fechada obtida nas células sob a terapia combinada foi estatisticamente inferior ($p < 0,01$) às obtidas após o tratamento com Lid ($66,17 \pm 6,48\%$) ou Doc em monoterapia ($67,69 \pm 4,17\%$) (Figura 22-B).

A associação de Rop e de Doc, apenas após 24 e 48h de incubação, apresentou valores em percentagem de área fechada ($59,59 \pm 9,12\%$ e $29,22 \pm 3,86\%$, para 24 e 48h, respetivamente) estatisticamente inferiores ($p < 0,001$) ao obtido no controlo ($150,23 \pm 8,10\%$ e $195,24 \pm 3,48\%$, para 24h e 48h, respetivamente). Como observado na Figura 22-C, apenas após 48h de incubação, a percentagem de área fechada obtida nas células sob a terapia combinada foi estatisticamente inferior ($p < 0,01$) às obtidas após o tratamento com Rop ($74,71 \pm 4,79\%$) ou com Doc em monoterapia ($67,69 \pm 4,17\%$).

A associação de Lev e de Doc (Figura 22-D), nas células PC3 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a migração celular das células tratadas com a terapia combinada em relação às células no controlo ou tratadas com Lev ou com Doc em monoterapia após 24 e 48h de incubação. De facto, após 24 e 48h de incubação com a terapia combinada obtiveram-se valores de percentagem de área fechada de $52,15 \pm 3,75\%$ e $35,75 \pm 4,47\%$, respetivamente. Estes valores foram estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) aos obtidos no controlo ($150,23 \pm 8,10\%$ e $195,24 \pm 3,48\%$), após o tratamento com Lev ($85,05 \pm 9,60\%$ e $67,90 \pm 5,65\%$), ou com Doc ($75,41 \pm 3,63\%$ e $67,69 \pm 4,17\%$), respetivamente.

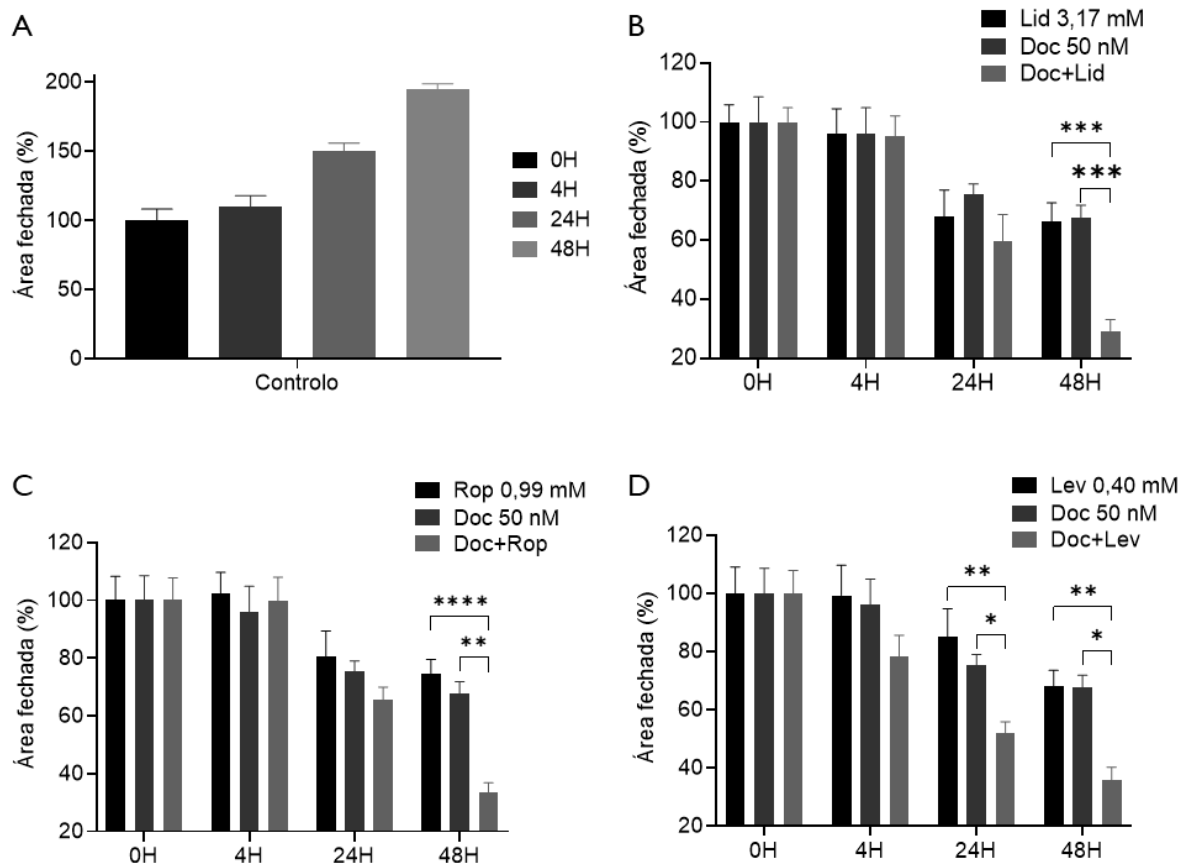


Figura 22: Migração celular de células PC3 a 0, 4, 24 e 48 horas em (A) Controlo; e quando incubadas com (B) Lid, Doc e Doc+ Lid, (C) Rop, Doc e Doc + Rop, (D) Lev, Doc e Doc+Lev. Os resultados estão expressos como média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental. As diferenças

estatisticamente significativas em relação ao tratamento com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

No que concerne à linha celular LNCaP, verificou-se que a migração celular diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após incubação com a associação de Lid e de Doc para todos os tempos experimentais em relação ao controlo e em relação ao tratamento com Lid ou com Doc em monoterapia. Tal como observado na Figura 23-B, após 4, 24 e 48h de incubação com a terapia combinada a percentagem de área fechada foi de $81,68 \pm 2,16\%$, $58,52 \pm 1,87\%$ e $44,25 \pm 1,65\%$, respetivamente. Estes valores foram estatisticamente inferiores aos obtidos no controlo ($129,55 \pm 5,97\%$, $155,77 \pm 6,27\%$ e $190,35 \pm 12,22\%$) e após o tratamento com Lid ($98,26 \pm 2,58\%$, $85,21 \pm 2,59\%$ e $73,30 \pm 1,30\%$) ou com Doc ($91,03 \pm 1,36\%$, $77,15 \pm 2,42\%$ e $66,41 \pm 2,25\%$), para os mesmos tempos.

Também a associação de Lev e de Doc, nas células LNCaP diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a migração celular das células tratadas com a terapia combinada em relação às células no controlo ou tratadas com Lev ou com Doc em monoterapia em todos os tempos experimentais (Figura 23-C). Nas células tratadas com a terapia combinada, obtiveram-se valores de percentagem de área fechada de $81,54 \pm 1,95\%$, $52,23 \pm 3,83\%$ e $34,77 \pm 0,93\%$ após 4, 24 e 48h de incubação. Estes valores foram estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) aos obtidos no controlo ($129,55 \pm 5,97\%$, $155,77 \pm 6,27\%$ e $190,35 \pm 12,22\%$), após o tratamento com Lev ($91,96 \pm 2,45\%$, $81,14 \pm 0,65\%$ e $70,20 \pm 1,07\%$), ou com Doc ($91,03 \pm 1,36\%$, $77,15 \pm 2,42\%$ e $66,41 \pm 2,25\%$), para os mesmos tempos. Assim, em concordância com os resultados obtidos na linha celular PC3, a associação de Lev e Doc foi a associação mais promissora.

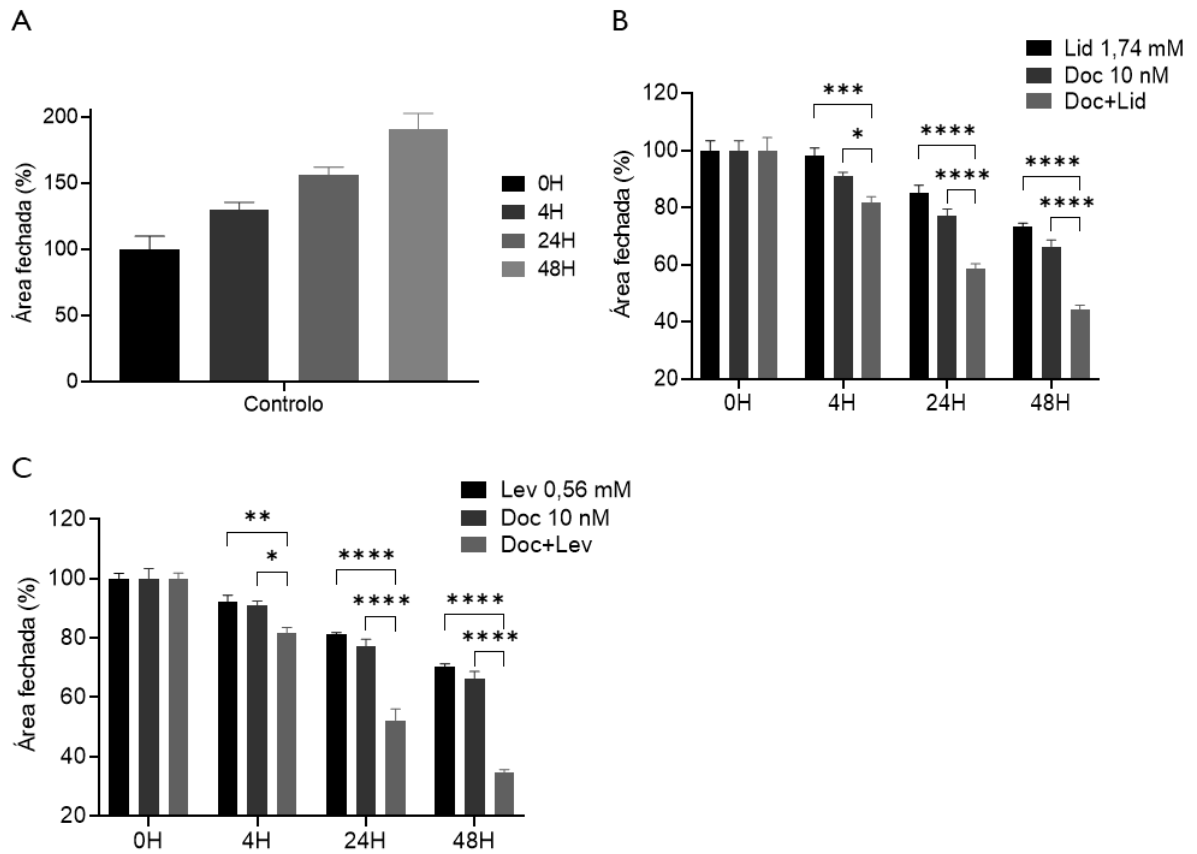


Figura 23; Migração celular de células LNCaP a 0, 4, 24 e 48 horas em (A) Controlo; e quando incubadas com (B) Lid, Doc e Doc+ Lid ou (C) Lev, Doc e Doc+Lev. Os resultados estão expressos como média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao tratamento com os fármacos em monoterapia encontram-se assinaladas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Discussão

O CaM, o CaB e o CaP constituíram cerca de 22 % dos casos de neoplasias sólidas malignas diagnosticadas no mundo em 2020. No mesmo período, foram responsáveis por cerca de 12 % das mortes por cancro (Sung *et al.*, 2021).

Os doentes portadores destas patologias, maioritariamente na fase intermédia e avançada da doença podem ser afetados pela dor promovida pelo crescimento do tumor ou metástases ou pelas técnicas de diagnóstico ou terapêutica, a qual interfere significativamente na QdV dos doentes, apresentando efeitos psicológicos, sociais e biológicos (Associação de Enfermagem Oncológica Portuguesa, 2015). Além disso, a dor oncológica pode levar a uma resposta de stress exacerbada e prolongada, resultando em imunossupressão e promovendo a propagação das células tumorais (Afsharimani, Cabot e Parat, 2011). Estes dados salientam a necessidade de um controlo eficaz da dor oncológica.

Considerando as várias opções terapêuticas disponíveis no mercado para controlo de dor oncológica, a WHO desenvolveu a “escada analgésica” de três degraus para diferenciar o uso de analgésicos de acordo com a intensidade da dor (World Health Organization, 2018). A cada degrau da escada analgésica, pode ainda ser complementado com fármacos adjuvantes que, ainda que não sejam analgésicos, contribuem para o alívio da dor, potenciando os analgésicos e interferindo nos vários fatores que podem agravar o quadro álgico. Destacam-se os LAs (Lisboa, 2015; World Health Organization, 1986).

Os LAs bloqueiam a produção e a condução de impulsos nervosos e atualmente, são utilizados como co-adjuvantes no controlo de dor e em técnicas de diagnóstico e de terapêutica. Contudo, apesar da sua aplicabilidade terapêutica, o seu potencial efeito anti-tumoral e possível sinergia com terapêuticas convencionais têm sido recentemente estudados. No entanto, os resultados são escassos e limitados no que concerne à sensibilidade e à especificidade dos LAs, assim como ao seu efeito na proliferação, na viabilidade, na migração e na invasão celulares quando em monoterapia ou em associação com outras terapêuticas convencionais, tais como a QT (Zhang *et al.*, 2021).

Perante as limitações e a escassez de informação que impedem a extrapolação de uma conclusão mais definitiva sobre o efeito dos LAs em células tumorais, este estudo incluiu duas fases: estudos de monoterapia e estudos de associação. Numa fase inicial avaliou-se o efeito anti-tumoral que os LAs, nomeadamente, a Lid, a Rop e a Lev, em monoterapia em linhas celulares tumorais e não tumorais de mama, de bexiga e de próstata. Com o objetivo de melhorar os resultados ou reduzir a dose dos quimioterapêuticos convencionais, e assim diminuir os potenciais efeitos secundários ou adversos, também foi estudada a associação de

LAs na concentração de IC_{50} com quimioterapêuticos convencionais, particularmente o Doc. O efeito da associação dos LAs com o Doc foi avaliado a nível da proliferação, da migração, da viabilidade e do perfil de morte de células de CaP.

Desta forma, com este estudo pretende-se contribuir para um melhor conhecimento dos efeitos dos LAs em monoterapia e em associação contra células de CaM, de CaB e de CaP, de modo a possibilitar a melhoria da eficácia das opções terapêuticas atuais e o surgimento de novas abordagens terapêuticas.

Os estudos *in vitro* incluíram inicialmente a avaliação do efeito dos LAs na proliferação celular, através do ensaio de MTT. Este ensaio permitiu avaliar a resposta das diversas linhas celulares a concentrações de Lid, de Rop e de Lev da ordem dos milimolar e, conseqüentemente, a obtenção de curvas de dose-resposta e o cálculo da concentração inibitória média, designada por IC_{50} .

Evidências anteriores mostram que elevadas concentrações de Lid, de Rop e de Lev induzem um efeito citotóxico em vários tipos de células tumorais (Jiang *et al.*, 2016; Jose *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018, 2019; Liu, Dilger e Lin, 2020; Sun, Li e Zhang, 2021; Wang e Li, 2020). De um modo geral, os nossos resultados mostraram também que os LAs inibem a proliferação celular, de um modo dependente da linha celular e do aumento da concentração de LA. No caso da linha celular MCF-7 de CaM, os nossos resultados indicaram que a inibição da proliferação é ainda dependente do tempo de incubação com os LAs.

Os valores de IC_{50} por nós obtidos e exibidos na Tabela 12, após 48h de incubação com os LAs, indicam que a linha celular MCF-7 é a mais sensível a todos os LAs, com valores de IC_{50} que variam entre 0,16 mM e 1,16 mM. Em contraste, as linhas celulares de CaP são as mais resistentes a concentrações elevadas de LAs, com valores de IC_{50} que variam entre 0,56 mM e 1,74 mM nas células LNCaP e entre 0,40 mM e 3,17 mM nas células PC3. Liu e seus coautores analisaram a resposta de 20 linhas celulares tumorais humanas após 48h de incubação com Lid e verificaram que, ainda que diferentes linhas celulares tenham sensibilidades diferentes, a proliferação celular da maioria das células diminuiu significativamente após incubação com 1-3 mM de Lid. Além disso, os autores obtiveram valores de IC_{50} superiores a 10 mM em oito delas, valores de IC_{50} que variaram entre os 5 mM e os 10 mM em outras sete e valores de IC_{50} inferiores a 5 mM em cinco delas (Liu, Dilger e Lin, 2020). Os mesmos autores analisaram a resposta de 15 linhas celulares tumorais humanas após 48h de incubação com Rop e observaram uma diminuição significativa na maioria das linhas celulares para concentrações de 0,5 a 1 mM de Rop, no entanto, obtiveram-se

valores de IC_{50} superiores a 1 mM em onze delas, valores de IC_{50} que variaram entre os 0,5 mM e os 1 mM em outras duas e valores de IC_{50} inferiores a 0,5 mM em duas delas (Liu, Dilger e Lin, 2020). A Lev na concentração de 1 mM diminuiu a proliferação de células de cancro do cólon, de CaP, de CaM, de cancro do colo do útero, de cancro dos ossos e de cancro do fígado (Castelli *et al.*, 2019; Jose *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). No presente estudo, a proliferação, da maioria das linhas celulares de CaM, de CaB e de CaP diminuiu significativamente após 48h incubação com 1-3 mM de Lid, sendo que apenas se obteve um valor de IC_{50} superior a 3 mM nas células PC3. Resultados semelhantes foram obtidos após incubação com 0,5-1 mM de Rop ou com 0,1-0,5 mM de Lev, com exceção para as células LNCaP na qual foi obtido um valor de IC_{50} superior a 1 e 0,5 mM, respetivamente. Estes dados evidenciam o potencial anti-proliferativo dos LAs nestes tipos de cancro.

Em duas linhas celulares tumorais, nomeadamente de CaM triplo-negativo (MDA-MB-231) e de melanoma (A375), foi demonstrado que a Lev e a Rop em concentrações entre 5 μ M a 1 mM, reduziu significativamente a proliferação celular, contudo a Lev foi o LA considerado mais eficaz (Castelli *et al.*, 2019). Por sua vez, Li e seus coautores demonstraram que a Lev em concentrações entre 0,3 e 10 mM foi o LA mais eficaz na redução da proliferação e migração celular em comparação com a Lid, a mepivacaína, a Rop, a bupivacaína e a cloroprocaína (Li *et al.*, 2018). Os dados por nós obtidos corroboram a hipótese de que a Lev apresenta a maior atividade anti-proliferativa, uma vez que apresentou valores de IC_{50} mais baixos para todas as linhas celulares em estudo.

Li e seus coautores avaliaram o efeito de seis LAs, nomeadamente Lid, Rop, Lev, bupivacaína, mepivacaína e cloroprocaína na proliferação celular de duas linhas celulares tumorais de mama, a MCF-7 e a MDA-MB-231 e de uma linha celular normal de mama, a MCF10A. Os autores verificaram que a gama de concentrações 0,01-10 mM de todos LAs resultou na inibição da proliferação celular em cerca de 45-80% para a linha celular MCF-7 e em cerca de 65-90% para as células MDA-MB-231. Por outro lado, os LAs reduziram a proliferação celular das células normais MCF10A, mas apenas em cerca de 15%, demonstrando uma especificidade para células tumorais em detrimento de células normais humanas (Li *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram obtidos para o carcinoma espinocelular oral (Kobayashi *et al.*, 2012). No presente, comparou-se o efeito da Lid, da Rop e da Lev na proliferação de células tumorais e não tumorais e calculou-se o índice de seletividade (IS) para cada relação entre célula tumoral e não tumoral respetiva. Todos os valores de IS obtidos foram superiores a 1 e, particularmente para a Lid obtiveram-se valores entre 1,4 e 2,5, para a Rop de 1,6 e

para a Lev entre 1,5 e 4. Estes resultados evidenciam a alta seletividade dos LAs para linhas celulares tumorais, com particular ênfase para a Lev que mostrou ser o LA mais seletivo.

Li e seus coautores demonstraram que na mesma gama de concentrações de 0,3 - 10 mM, após 48h de incubação, a linha celular de CaM triplo-negativo MDA-MB-231 foi mais sensível aos LAs Lid, bupivacaína, Lev e mepivacaína enquanto a linha celular do tipo luminal com expressão de RE, MCF-7, mostrou ser mais sensível à Rop e à cloroprocaína (Li *et al.*, 2018). Considerando as diferenças entre as linhas celulares tumorais e os LAs utilizados no nosso estudo, verificámos que a linha celular de CaB TCCSUP aparenta ser mais sensível à Lid ($IC_{50}=1,99$ mM) e à Rop ($IC_{50}=0,86$ mM), enquanto a linha celular HT1376 mostrou ser mais sensível para a Lev ($IC_{50}=0,39$ mM). Relativamente às linhas celulares de CaP, os nossos resultados demonstraram que a linha celular hormonodependente, LNCaP, é a linha celular tumoral mais sensível à Lid ($IC_{50}=1,74$ mM), enquanto que a linha celular hormono-independente PC3 é mais sensível aos LAs de longa duração, Rop ($IC_{50}=0,99$ mM) e Lev ($IC_{50}=0,40$ mM). Em conjunto, estes resultados sugerem que o efeito dos LAs é específico para o tipo de células tumorais.

Os estudos abaixo discutidos foram realizados apenas em linhas celulares de CaP, que demonstraram ser as menos sensíveis aos LAs. A metastização está associada ao aumento da dor oncológica nos doentes oncológicos, e de todas as linhas celulares tumorais utilizadas na primeira fase do projeto, apenas as células de CaP representam células metastáticas. Além disso, na literatura não foram encontrados estudos que focassem os efeitos dos LAs em monoterapia e em associação com fármacos quimioterapêuticos em linhas celulares de CaP. Adicionalmente, existe uma estreita colaboração com o Serviço de Urologia do CHUC, pelo que este projeto será complementado por um trabalho clínico em curso em doentes com CaP. Por todas estas razões, optámos por dar continuidade ao estudo pré-clínico nas linhas celulares de CaP.

Tendo por base os valores de IC_{50} obtidos em monoterapia, aplicou-se o modelo de combinação de fármacos de Chou e Talalay que constitui um dos métodos mais usados atualmente em investigação para aferir sobre o potencial efeito sinérgico, aditivo ou antagónico de dois fármacos (Chou, 2010). A sinergia, a aditividade e o antagonismo definem-se como as interações entre dois ou mais componentes, levando a um efeito combinado superior, igual ou inferior, respetivamente, em relação à soma dos efeitos individuais esperados (Pinto, Moreira e Simões, 2010). O Doc é amplamente usado no tratamento do cancro. No entanto, tem associados diversos efeitos adversos tais como a neutropenia, a

neurotoxicidade, a cardiotoxicidade e reações de hipersensibilidade que se tornam mais frequentes com o aumento da dose cumulativa (Apolinário, 2012; Santos, 2016). Além disso, a longo prazo tendem a conferir resistência medicamentosa ao tumor e podem dar origem a neuropatia periférica que se manifesta através da dor (Carozzi, Canta e Chiorazzi, 2015).

Após 48h de exposição, o Doc assumiu valores de IC_{50} de 82,79 nM para as células PC3 e de 68,40 nM para a linha celular LNCaP. O seu efeito, em ambas as linhas, foi assim, dependente da concentração. Quando combinado com os LAs, em ambas as linhas celulares obtivemos um IC_{50} do Doc muito inferior ao obtido em monoterapia com o Doc e de forma dependente do regime de combinação. Às 48 horas o IC_{50} do Doc assumiu valores de 0,54 nM quando combinado com a Lid, de 8,50 nM em associação com a Rop e de 4,61 nM em associação com a Lev nas células PC3. Enquanto na linha celular LNCaP, às 48 horas o IC_{50} do Doc assumiu valores de 3,59 nM em associação com Lid e de 0,003 nM em associação com Lev. A determinação do IC permitiu aferir a existência ou não de sinergia entre os dois compostos. A determinação do DRI permitiu aferir quantas vezes a dose de um fármaco pode ser reduzida quando em associação para um dado nível de efeito anti-tumoral, comparativamente com o mesmo fármaco em monoterapia, respetivamente. Desta forma, verificou-se que tanto a concentração de LA, e a linha celular desempenham um papel fundamental na existência de sinergia.

Analisando os valores dos índices de combinação, observou-se a existência de sinergia em todas as associações testadas para as linhas celulares PC3 e LNCaP. Nas células PC3 após tratamento com a associação de Lid com Doc, verificou-se a existência de antagonismo para concentrações mais baixas e sinergismo para concentrações mais elevadas para a associação de Lid com Doc. A associação de Rop com Doc apenas se mostrou sinérgica para o Doc na concentração de 50 nM e a associação de Lev com Doc mostrou atuar em sinergia para concentrações de Doc entre 10 e 100 nM, enquanto para os restantes valores de concentração de Doc se verificou a existência de antagonismo. Nas células LNCaP, verificou-se a existência de sinergismo para todas as concentrações. Assim, podemos concluir que os LAs aumentam a sensibilidade das linhas celulares de CaP ao Doc na medida em que na presença do IC_{50} de Lid, a concentração de Doc necessária para inibir a proliferação celular em 50% é cerca de 19-153 vezes (DRI) inferior aquela que é necessária para a obtenção do mesmo efeito na ausência de Lid. Por sua vez, a Rop e a Lev permitiram reduzir a concentração de Doc necessária para inibir a proliferação celular em 50% em cerca de 10 e 18-22800 vezes, respetivamente.

De uma forma geral, observámos que as concentrações inibitórias médias dos LAs sensibilizaram as células de CaP ao efeito do Doc. Apesar da presença de LAs ter induzido uma diminuição do IC₅₀ do Doc, este efeito foi mais notório nas associações de Doc com Lid ou com Lev. Um estudo realizado em linhas celulares de CaM, MCF-7 e MDA-MB-231, demonstrou que o tratamento com Lid (0,01-1 mM) levou ao aumento do efeito inibitório da cisplatina na proliferação celular, em relação ao obtido pelo mesmo fármaco em monoterapia (Li, Yang e Han, 2014). Resultados semelhantes foram obtidos, *in vitro* e *in vivo*, quando a cisplatina foi associada com Lid, com Rop ou com bupivacaína em linhas celulares de cancro do pulmão e em cancro hepatocelular (Chen *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). Por outro lado, Yang e seus coautores demonstraram que a associação de Lid com mitomicina C ou com pirarrubicina inibiu de modo mais eficaz a proliferação de células tumorais de bexiga BIU-87 de modo dependente da concentração, em relação ao obtidos pelos fármacos quimioterapêuticos em monoterapia. Além disso, em modelos animais, a mitomicina C em monoterapia não foi eficaz para o tratamento. No entanto, os autores verificaram que a associação de Lid com os agentes quimioterapêuticos prolongou a sobrevivência dos animais (Yang *et al.*, 2018). Em células de melanoma, a Rop e a Lid aumentaram a eficácia *in vitro* da dacarbazina na inibição da migração, na inibição da proliferação, e no aumento da apoptose (Zheng, Peng e Zhang, 2020). Em associação com o 5-fluorouracil, a Lid, a Rop, a bupivacaína e a mepivacaína em doses de 0.01 a 5 mM, sensibilizaram as linhas celulares de coriocarcinoma, de melanoma e de cancro gástrico, do esófago e de CaM para o tratamento com o 5- fluorouracil (Dan *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). Zhu e seus coautores obtiveram resultados semelhantes na associação de Lid com paclitaxel em linhas celulares de cancro do esófago (Zhu *et al.*, 2020). Os nossos resultados corroboram assim a hipótese de que, de um modo geral, os LAs atuam de modo sinérgico com os agentes quimioterapêuticos.

Após a observação dos efeitos dos LAs e das suas associações com Doc na proliferação celular, pretendeu-se examinar até que ponto o efeito inibitório da proliferação celular se traduziu também num efeito citotóxico, isto é, no aumento da morte celular. Paralelamente, averiguaram-se as alterações induzidas na capacidade de migração das células tumorais.

A viabilidade e os tipos de morte celular induzidos foram avaliados com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. A anexina V liga-se à fosfatidilserina, um fosfolípido da membrana que se externaliza durante o processo apoptótico. A necrose é estimada pela marcação positiva de iodeto de propídeo, o qual se intercala no DNA quando a membrana celular está desintegrada. A dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo

permite a distinção de 4 populações celulares, nomeadamente, a das células viáveis, a das células em apoptose inicial, a das células em apoptose tardia/necrose e a das células em necrose. Os resultados obtidos indicam que todas as associações de LA+Doc diminuíram a percentagem de células viáveis, em relação às células em controlo e ao respetivo tratamento com o LA em monoterapia. A associação de Lev com Doc diminuiu ainda a percentagem de células viáveis de modo mais significativo que o obtido com o tratamento com Doc em monoterapia. Nas células PC3, a diminuição da viabilidade após tratamento combinado foi acompanhada predominantemente por morte celular por necrose, com exceção para a associação de Doc+Rop, onde se verificou uma predominância da morte celular por apoptose tardia/necrose. Na literatura o efeito citotóxico induzido pelos LAs difere com a dose de LA utilizada e com o tipo de linha celular tumoral estudada. Ribeiro avaliou a eficácia terapêutica dos LAs Lid e Mepivacaína e seus mecanismos, em linhas celulares de carcinoma espinho-celular da cavidade oral (CECCO) *in situ* e metastático, quer em monoterapia, quer em associação com os agentes quimioterapêuticos cisplatina e 5-fluorouracil (Ribeiro, 2016). O autor verificou que todas as associações LA com cisplatina ou com 5-fluorouracil induziram a morte celular de forma mais evidente que os respetivos tratamentos em monoterapia. A morte celular ocorreu principalmente por apoptose tardia/necrose e necrose em ambas as linhas celulares estudadas (HSC-3 e BICR-10), em comparação com o obtido nas células tratadas com os fármacos em monoterapia, sugerindo uma relação sinérgica entre os dois fármacos (Ribeiro, 2016). Em células de cancro do esófago, a Rop, a Lid, a bupivacaína e a mepivacaína em associação com 5-fluorouracil e paclitaxel conduziram a resultados semelhantes aos anteriores (Zhu *et al.*, 2020). Estes resultados indicam que os LAs induzem o aumento do efeito citotóxico dos quimioterapêuticos.

Paralelamente, o efeito das associações mais promissoras foi avaliado a nível da migração de linhas celulares de CaP PC3 e LNCaP através do ensaio “Wound healing”. Em geral, todas as associações testadas, em ambas as linhas celulares de CaP, após 48h de incubação, resultaram na diminuição acentuada da migração das células PC3 e LNCaP em relação às células em controlo ou tratadas com os fármacos em monoterapia, com exceção da associação de Doc a Rop nas células PC3. Além disso, a associação de Lev e Doc demonstrou diminuir mais eficazmente a migração das células PC3 e LNCaP em relação às células em controlo ou tratadas com os fármacos em monoterapia. O mesmo efeito foi observado por outros autores em outro tipo de células tumorais. Em duas linhas celulares de cancro do esófago, OE19 e SK-GT-4, a mepivacaína, a Rop, a Lid e a bupivacaína demonstraram atuar sinérgicamente com o paclitaxel e com o 5-fluorouracil na inibição da migração em

relação à inibição obtida em monoterapia. Além disso, verificou-se que, assim como exposto anteriormente, também o efeito exercido pelas associações pode depender do tipo de células. A linha celular OE19 demonstrou ser mais sensível à mepivacaína e à Lid enquanto as células SK-GT-4 mostraram ser mais sensíveis à Rop e à bupivacaína, resultando na inibição mais marcada da migração celular quando o 5-fluorouracil e o paclitaxel eram associados a Lid e a mepivacaína ou a Rop e a bupivacaína, respectivamente para cada tipo celular (Zhu *et al.*, 2020). Zheng e seus colaboradores concluíram que a Rop e a Lid melhoraram significativamente a eficácia *in vitro* da dacarbazina na inibição da migração de células de melanoma (Zheng, Peng e Zhang, 2020).

Conclusão e Perspetivas Futuras

A dor oncológica constituiu um dos maiores desafios da medicina centrada no doente oncológico e pode estar associada ao tumor em si e a abordagens de diagnóstico ou de terapêutica. Os LAs são atualmente utilizados como co-adjuvantes no controlo de dor e em técnicas de diagnóstico e terapêutica. Recentemente, o seu potencial efeito anti-tumoral e possível sinergia com terapêuticas convencionais têm sido estudados, mas os resultados são escassos e limitados.

Ao longo deste trabalho experimental, foi possível, numa primeira fase, avaliar o efeito anti-tumoral que os anestésicos locais Lid, Rop e Lev, em monoterapia, têm em linhas celulares tumorais e não tumorais de mama, bexiga e próstata. Numa fase posterior foi possível estudar o efeito da associação de LAs com o Doc a nível da proliferação, da migração, da viabilidade e do perfil de morte de células de CaP.

Todos os LAs estudados demonstraram atividade anti-proliferativa dependente da concentração, sendo a Lev o LA mais promissor. Além disso, todos os LAs apresentaram maior seletividade para as linhas celulares tumorais em relação às linhas celulares não tumorais. De uma forma geral, verificou-se que todos os LAs atuaram de modo sinérgico com o Doc, permitindo reduzir a sua dose quando dada em associação, facto corroborado pela redução significativa da proliferação, da migração e da viabilidade celular após o tratamento com as associações em relação à obtida com os respetivos tratamentos em monoterapia. A principal via de morte após o tratamento com as diferentes associações foi a necrose. A associação de Lev com Doc demonstrou ser a mais eficaz e seletiva, permitindo a redução da concentração de Doc em até 22800 vezes. Contudo, não foram encontrados mais estudos que foquem o possível efeito sinérgico da Lev com outros agentes quimioterapêuticos.

Em suma, os resultados apresentados ao longo desta dissertação, apontam para o uso de LAs como uma mais-valia no tratamento de doentes com CaP, podendo ainda possivelmente ser aplicável como terapêutica noutros tumores malignos.

Deste modo, considera-se que o presente estudo é relevante para o avanço de uma área que ainda não se encontra muito aprofundada e que poderá implicar muitos benefícios em termos clínicos. Assim, no contexto da investigação pré-clínica, a prossecução deste trabalho deve incluir o estudo dos mecanismos de ação associados à terapêutica de combinação, à avaliação do efeito das associações de LA com Doc na angiogénese, bem como o seguimento do estudo em modelos *in vivo*. Alguns dos mecanismos propostos para o aumento da eficácia *in vitro* dos quimioterapêuticos por parte dos LAs incluem a sobrerregulação da expressão de RASSF1A e demetilação, da subregulação do microRNA 21, da sobreexpressão do microRNA 493 e inativação das vias PI3K/AKT e TGF- β ou pela

supressão da via AKT/mTOR com consequente indução de stress oxidativo nas células tumorais, entre outros. Por conseguinte, a deteção e a quantificação destas moléculas é de extrema relevância de modo a esclarecer o potencial mecanismo pela qual os LAs atuam como quimiossensibilizantes e pela potencial criação de novos biomarcadores que avaliem a eficácia destas terapêuticas. Quanto aos modelos *in vivo*, estes permitirão mimetizar o microambiente tumoral e simular e avaliar as respostas tumorais às associações com maior rigor.

No contexto da investigação clínica, a realização de ensaios clínicos prospetivos para determinar o efeito dos LAs em monoterapia e em associação com outras terapias convencionais na recorrência e progressão tumoral a longo-prazo é crucial.

Os opioides são considerados os fármacos mais eficazes no controlo de dor oncológica, contudo, no seguimento da revisão sistemática realizada pelo nosso grupo de investigação, verificámos que a influência que os opioides exercem na progressão tumoral e, consequentemente, no prognóstico dos doentes, é controversa. Assim, propusemo-nos a realizar um estudo observacional que visa avaliar a potencial relação entre a toma de opioides e a progressão tumoral de indivíduos com CaP não localizado, bem como avaliar o impacto que a utilização destes fármacos e suas características inerentes têm na progressão da doença, na sobrevivência e na qualidade de vida do doente. Este projeto recebeu um parecer favorável da comissão de ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra a 17 de janeiro de 2022 e aguarda a aprovação pela comissão de ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Com este projeto, espera-se obter dados fiáveis em relação à informação controversa obtida na literatura e deste modo clarificar a potencial relação entre a toma desta classe de analgésicos e a progressão tumoral, sobrevivência e qualidade de vida.

Assim, com o melhor conhecimento dos efeitos e mecanismos moleculares envolvidos no modo de atuação dos LAs e dos opioides em monoterapia e em sinergia com outros fármacos, será possível otimizar as terapêuticas existentes, melhorar os outcomes, o prognóstico e a QdV do doente, de modo que este receba os melhores cuidados clínicos possíveis para o controlo da dor.

Bibliografia

- ABRANTES, Ana Margarida *et al.* - Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-HL-91 uptake in colon cancer cells. **Nuclear Medicine and Biology**. ISSN 09698051. 37:2 (2010) 125–132. doi: 10.1016/j.NUCMEDBIO.2009.11.001.
- AFSHARIMANI, Banafsheh; CABOT, Peter J.; PARAT, Marie-Odile - Morphine use in cancer surgery. **Frontiers in pharmacology**. ISSN 1663-9812 (Electronic). 2:(2011) 46. doi: 10.3389/fphar.2011.00046.
- AKRAM, Muhammad *et al.* - Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**. ISSN 07176287. 50:33 (2017). doi: 10.1186/s40659-017-0140-9.
- ALLEMANI, Claudia *et al.* - Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. **The Lancet**. ISSN 1474547X. 391:10125 (2018) 1023–1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- ALVES, Rita Isabel Lourenço - **Anestésicos Locais**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2013. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Understanding Your Pathology Report: Prostate Cancer**. 2017. [Consult. 5 mar. 2022]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/understanding-your-pathology-report/prostate-pathology/prostate-cancer-pathology.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **What Is Bladder Cancer?**. 2019. [Consult. 24 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Bladder Cancer Risk Factors**. 2019. [Consult. 24 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Tests for Bladder Cancer**. 2019. [Consult. 25 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Prostate Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging**. 2019. [Consult. 5 mar. 2022]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging.html>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Lung Metastases**. 2020. [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/advanced-cancer/lung-metastases.html>>.

- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Treating Prostate Cancer**. 2020. [Consult. 5 mar. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating.html>.
- AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - **Bladder Cancer: Introduction**. 2020. [Consult. 25 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/introduction>.
- AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - **Bladder Cancer**. 2020. [Consult. 20 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/diagnosis>.
- AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY - **Bladder Cancer: Statistics**. 2022. [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/statistics>.
- ANAMPA, Jesus; MAKOWER, Della; SPARANO, Joseph A. - Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. **BMC Medicine**. (2015). doi: 10.1186/s12916-015-0439-8.
- ANTONARAKIS, E. S.; ARMSTRONG, A. J. - Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**. ISSN 13657852. 14:3 (2011) 192. doi: 10.1038/PCAN.2011.23.
- APOLINÁRIO, Célia Luísa Dos Santos - **Farmacoterapia no cancro da mama**. Universidade do Algarve, 2012. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- ASSOCIAÇÃO DE ENFERMAGEM ONCOLÓGICA PORTUGUESA - Entender a dor oncológica. (2015) 1–24.
- AWANG, Normah *et al.* - Cytotoxicity and mode of cell death induced by triphenyltin (IV) compounds *in vitro*. **OnLine Journal of Biological Sciences**. ISSN 16084217. 14:2 (2014) 84–93. doi: 10.3844/ojbsci.2014.84.93.
- BABJUK, Marko *et al.* - European Association of Urology Guidelines on Non–muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ). **European Urology**. ISSN 18737560. 81:1 (2022) 75–94. doi: 10.1016/j.EURURO.2021.08.010.
- BADISA, Ramesh B. *et al.* - Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Anticancer Research**. 29:8 (2009) 2993–2996.
- BAHL, Amit - Metastatic castration-resistant prostate cancer. Part I: The challenges of the disease and its treatment I. **European Journal of Oncology Nursing**. ISSN 15322122. 17:SUPPL.1 (2013) S1. doi: 10.1016/S1462-3889(14)70002-X.

- BATISTA, Rui Manuel Lessa - **Patologia Prostática - Cuidados de enfermagem a doentes submetidos a cirurgia prostática**. Universidade Fernando Pessoa, 2010. Dissertação de Licenciatura em Enfermagem.
- BIKI, Barbara *et al.* - Anesthetic technique for radical prostatectomy surgery affects cancer recurrence: A retrospective analysis. **Anesthesiology**. ISSN 15281175. 109:2 (2008) 180–187. doi: 10.1097/ALN.0b013e31817f5b73.
- BIMONTE, Sabrina *et al.* - Morphine Promotes Tumor Angiogenesis and Increases Breast Cancer Progression. **BioMed research international**. ISSN 2314-6141 (Electronic). (2015). doi: 10.1155/2015/161508.
- BOMBONATI, Alessandro; SGROI, Dennis C. - The molecular pathology of breast cancer progression. **Journal of Pathology**. ISSN 10969896. 223:2 (2011) 307–317. doi: 10.1002/path.2808.
- BÖRNER, Christine *et al.* - T-Cell Receptor/CD28-Mediated Activation of Human T Lymphocytes Induces Expression of Functional μ -Opioid Receptors. **Molecular Pharmacology**. ISSN 0026-895X. 74:2 (2008) 496–504. doi: 10.1124/MOL.108.046029.
- BÖRNER, Christine *et al.* - Mechanisms of Opioid-Mediated Inhibition of Human T Cell Receptor Signaling. **The Journal of Immunology**. ISSN 0022-1767. 183:2 (2009) 882–889. doi: 10.4049/JIMMUNOL.0802763.
- BRAWER, Michael K. - Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. **Reviews in urology**. 7:Suppl 3 (2005) S11–S18.
- BRAY, Freddie *et al.* - Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. ISSN 1542-4863. 68:6 (2018) 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
- BRUERA, Eduardo; PAICE, Judith A. - Cancer Pain Management: Safe and Effective Use of Opioids. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**. (2015) e593–e599.
- BUCH, Karl *et al.* - Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. **Radiation Oncology**. ISSN 1748717X. 7:1 (2012) 1–6. doi: 10.1186/1748-717X-7-1/FIGURES/4.
- CARDOSO, Ana Isabel - **Controlo da dor em pacientes oncológicos**. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2014. Dissertação de Mestrado em Medicina.
- CARDOSO, F. *et al.* - Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. ISSN 15698041. 30:8 (2019) 1194–1220. doi: 10.1093/annonc/mdz173.

- CARIOLI, G. *et al.* - European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer. **Annals of Oncology**. ISSN 15698041. 31:5 (2020) 650–658. doi: 10.1016/j.annonc.2020.02.009.
- CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. - Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**. ISSN 0304-3940. 596:(2015) 90–107. doi: 10.1016/J.NEULET.2014.10.014.
- CASTELLI, Vanessa *et al.* - Local anesthetics counteract cell proliferation and migration of human triple-negative breast cancer and melanoma cells. **Journal of cellular physiology**. ISSN 1097-4652 (Electronic). 235:4 (2019) 3474–3484. doi: 10.1002/jcp.29236.
- CAVALCANTE, Lucas De Sousa; MONTEIRO, Gisele - Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. **European Journal of Pharmacology**. ISSN 18790712. 741:(2014) 8–16. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.041.
- CHATTERJEE, Kanu *et al.* - Doxorubicin Cardiomyopathy. **Cardiology**. ISSN 0008-6312. 115:2 (2010) 155–162. doi: 10.1159/000265166.
- CHEN, Dongtai *et al.* - Amide-type local anesthetics may suppress tumor cell proliferation and sensitize human hepatocellular carcinoma cells to cisplatin via upregulation of RASSF1A expression and demethylation. **Journal of Cancer**. ISSN 18379664. 11:24 (2020) 7312–7319. doi: 10.7150/jca.46630.
- CHEN, Shun *et al.* - Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus *in vitro* through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. **World J Gastroenterol**. ISSN 1007-9327. 14:14 (2008) 2174–2178. doi: 10.3748/wjg.14.2174.
- CHIN, J. L.; SIDDIQUI, K. M.; TRAN, K. C. - Metastatic Bladder Cancer. **Introduction to Cancer Metastasis**. (2017) 177–198. doi: 10.1016/B978-0-12-804003-4.00010-4.
- CHOU, Ting Chao - Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**. ISSN 00316997. 58:3 (2006) 621–681. doi: 10.1124/pr.58.3.10.
- CHOU, Ting Chao; TALALAY, Paul - Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**. ISSN 00652571. 22:C (1984) 27–55. doi: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.
- CHOU, Ting-Chao - Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**. 70:2 (2010). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
- CLETO, Ana *et al.* - Recomendações Clínicas no Tratamento do Carcinoma da Próstata. 1ª Edição. **F. Calais da Silva – Grupo Português Genito Urinário**. (2013) 111-137.

- COUDERT, B. P. *et al.* - Pre-operative systemic (neo-adjuvant) therapy with trastuzumab and docetaxel for HER2-overexpressing stage II or III breast cancer: Results of a multicenter phase II trial. **Annals of Oncology**. ISSN 15698041. 17:3 (2006) 409–414. doi: 10.1093/annonc/mdj096.
- DAN, Jiapeng *et al.* - Inhibition of gastric cancer by local anesthetic bupivacaine through multiple mechanisms independent of sodium channel blockade. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. ISSN 19506007. 103:(2018) 823–828. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.106.
- DEGEORGE, Katherine C.; HOLT, Harry R.; HODGES, Stephanie C. - Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**. 96:8 (2017) 507–514. PMID: 29094888.
- DIRECÇÃO-GERAL DE SAÚDE - Plano Nacional de Luta Contra a Dor. Lisboa. (2001).
- DIRECÇÃO-GERAL DE SAÚDE - Guia de apoio à mulher com cancro da mama. Lisboa. (2003).
- DIRECÇÃO-GERAL DE SAÚDE - A Dor como 5º sinal vital. Registo sistemático da intensidade da Dor. Lisboa. (2003).
- DIRECÇÃO-GERAL DE SAÚDE - Utilização dos medicamentos opioides fortes na dor crónica não oncológica. Lisboa. (2008).
- DOORNEBAL, Chris W. *et al.* - Morphine does not facilitate breast cancer progression in two preclinical mouse models for human invasive lobular and HER2(+) breast cancer. **Pain**. United States. ISSN 1872-6623 (Electronic). 156:8 (2015) 1424–1432. doi: 10.1097/j.pain.000000000000136.
- DRUDGE-COATES, Lawrence; TURNER, Bruce - Prostate cancer overview. Part I: non-metastatic disease. **British Journal of Nursing**. 21:9 (2012) S23–S28. doi: 10.12968/bjon.2012.21.Sup9.S23.
- EL-BOGHADLY, Kariem; PAWA, Amit; CHIN, Ki Jinn - Local anesthetic systemic toxicity: current perspectives. **Local and Regional Anesthesia**. 11:(2018) 35–44. doi: 10.2147/LRA.S154512.
- EPSTEIN, Jonathan I. *et al.* - The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. **Am J Surg Pathol**. 40:2 (2016). doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
- EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY - **Bladder cancer - Patient Information**. 2021. [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://patients.uroweb.org/cancers/bladder-cancer/>.

EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY; ANTICANCER FUND - **Bladder cancer: a guide for patients**

FENG, Xiaoshuang *et al.* - The association of diabetes with risk of prostate cancer defined by clinical and molecular features. **British Journal of Cancer**. ISSN 15321827. 123:4 (2020) 657–665. doi: 10.1038/s41416-020-0910-y.

FERNANDES, Isabel; CORTES, Paulo - Manual de Oncologia SPO Abordagem e tratamento do cancro da mama. **Sociedade Portuguesa de Oncologia**. (2020) 81–92.

GASPANI, Leda *et al.* - The analgesic drug tramadol prevents the effect of surgery on natural killer cell activity and metastatic colonization in rats. **Journal of Neuroimmunology**. 129: (2002) 18–24. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00165-0.

GE, Zhi-Hua *et al.* - Morphine improved the antitumor effects on MCF-7 cells in combination with 5-Fluorouracil. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**. France. ISSN 1950-6007 (Electronic). 68:3 (2014) 299–305. doi: 10.1016/j.biopha.2013.09.006.

GINSBURG, Ophira *et al.* - Breast Cancer Early Detection: A Phased Approach to Implementation. (2020). doi: 10.1002/cncr.32887.

THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY - Portugal Source: Globocan Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site. (2021).

GONÇALVES, Ferraz - Dor óssea metastática. (2020).

GONG, Xiaodan *et al.* - Suppression of mitochondrial respiration with local anesthetic ropivacaine targets breast cancer cells. **Journal of thoracic disease**. ISSN 2072-1439 (Print). 10:5 (2018) 2804–2812. doi: 10.21037/jtd.2018.05.21.

GREENE, Kirsten L. *et al.* - Prostate Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update. **Journal of Urology**. ISSN 00225347. 182:5 (2009) 2232–2241. doi: 10.1016/j.juro.2009.07.093.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. - Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. ISSN 00928674. 144:5 (2011) 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HARBECK, Nadia *et al.* - Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. ISSN 2056676X. 5:1 (2019). doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.

HICKLING, Duane R.; SUN, Tung-Tien; WU, Xue-Ru - Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. **Microbiology Spectrum**. ISSN 2165-0497. 3:4 (2015). doi: 10.1128/microbiolspec.uti-0016-2012.

HOROSZEWICZ, Julius S. *et al.* - LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. **Cancer Research**. 43: (1983) 1809–1818. PMID: 6831420.

- HSING, Ann W.; CHOKKALINGAM, Anand P. - Prostate cancer epidemiology. **Frontiers in Bioscience**. 11: (2006) 1388–1413. doi: 10.2741/1891.
- HUSSEIN, S.; SATTURWAR, S.; KWAST, T. VAN DER - Young-age prostate cancer. **Journal of Clinical Pathology**. ISSN 14724146. 68:7 (2015) 511–515. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202993.
- HUTCHINSON, Mark R. *et al.* - Evidence that opioids may have toll like receptor 4 and MD-2 effects. **Brain, behavior, and immunity**. ISSN 08891591. 24:1 (2010) 83. doi: 10.1016/j.BBI.2009.08.004.
- INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. ISSN 1871-5125. 46: (2021) 273–307. doi: 10.1016/BS.PODRM.2020.07.005.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN - Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. Em **Classification of Chronic Pain**. Second Edition. [Consult. 27 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/#pain>. p. 209–214.
- ITTMANN, Michael - Anatomy and histology of the human and murine prostate. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. ISSN 21571422. 8:5 (2018). doi: 10.1101/cshperspect.a030346.
- JANEIRO, Inês Margarida Inácio - **Fisiologia da Dor**. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2017. Dissertação de Mestrado.
- JIANG, Yuan *et al.* - Lidocaine inhibits the invasion and migration of TRPV6-expressing cancer cells by TRPV6 downregulation. **Oncology letters**. ISSN 1792-1074. 12:2 (2016) 1164–1170. doi: 10.3892/ol.2016.4709.
- JOHNS HOPKINS PATHOLOGY - **Overview of the Breast - Breast Pathology**. 2021. [Consult. 20 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://pathology.jhu.edu/breast/overview>.
- JOHNS HOPKINS PATHOLOGY - **Anatomy & Physiology of the Breast Blood Supply & Lymph Nodes**. 2022. Disponível em WWW:<URL:https://pathology.jhu.edu/breast/overview>.
- JOHNS HOPKINS PATHOLOGY - **Staging and grade of breast cancer**. 2022. Disponível em WWW:<URL:https://pathology.jhu.edu/breast/staging-grade>.
- JOSE, Caroline *et al.* - Redox Biology Redox mechanism of levobupivacaine cytostatic effect on human prostate cancer cells. **Redox Biology**. ISSN 2213-2317. 18:April (2018) 33–42. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.014.

- KAIGHN, M. E. *et al.* - Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**. 17:1 (1979) 16–23. PMID: 447482.
- KENNY, Reece G. *et al.* - Platinum(IV) Prodrugs – A Step Closer to Ehrlich’s Vision? **European Journal of Inorganic Chemistry**. ISSN 10990682. 2017:12 (2017) 1596–1612. doi: 10.1002/EJIC.201601278.
- KHASRAW, Mustafa; BELL, Richard; DANG, Chau - Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. **Breast**. ISSN 15323080. 21:2 (2012) 142–149. doi: 10.1016/j.breast.2011.12.012.
- KIM, Ryungsa - Effects of surgery and anesthetic choice on immunosuppression and cancer recurrence. **Journal of Translational Medicine**. ISSN 14795876. 16:1 (2018). doi: 10.1186/s12967-018-1389-7.
- KOBAYASHI, Katsue *et al.* - Cytotoxicity and Type of Cell Death Induced by Local Anesthetics in Human Oral Normal and Tumor cells. **Anticancer Research**. ISSN 1791-7530. 32: (2012) 2925–2934. PMID: 22753757.
- KOH, Jieun; KIM, Min Jung - Introduction of a new staging system of breast cancer for radiologists: An emphasis on the prognostic stage. **Korean Journal of Radiology**. ISSN 12296929. 20:1 (2019) 69–82. doi: 10.3348/kjr.2018.0231.
- KREIS, Willi; BUDMAN, Daniel R.; CALABRO, Anthony - A reexamination of PSC 833 (Valspodar) as a cytotoxic agent and in combination with anticancer agents. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. 47 (2001) 78–82. doi: 10.1007/s002800000191.
- KRUŠLIN, Božo *et al.* - Inflammation in prostatic hyperplasia and carcinoma-basic scientific approach. **Frontiers in Oncology**. ISSN 2234943X. 7:APR (2017). doi: 10.3389/fonc.2017.00077.
- LAMEIRAS, Marta Patrícia - **As atitudes dos enfermeiros face avaliação da dor crónica nos doentes oncológicos**. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2010. Dissertação de mestrado.
- LEE, Christine H.; AKIN-OLUGBADE, Oluyemi; KIRSCHENBAUM, Alexander - Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. ISSN 08898529. 40:3 (2011) 565–575. doi: 10.1016/j.ecl.2011.05.012.
- LEITÃO COSTA, Eduardo - **A New Approach for Cancer Treatment from Specific Induction of Breast Cancer to Innovative Therapy**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2020. Dissertação de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, ramo de Farmacologia e Farmacoterapia.

- LENIS, Andrew T.; LEC, Patrick M.; CHAMIE, Karim - Bladder cancer a review. **Journal of the American Medical Association (JAMA)**. ISSN 15383598. 324:19 (2020) 1980–1991. doi: 10.1001/jama.2020.17598.
- LEWIS, Melba J. Moreland *et al.* - Pain control and nonpharmacologic interventions. **Nursing**. ISSN 15388689. 48:9 (2018) 65–68. doi: 10.1097/01.NURSE.0000544231.59222.AB.
- LI, Bob; WONG, Matthew; PAVLAKIS, Nick - Treatment and Prevention of Bone Metastases from Breast Cancer: A Comprehensive Review of Evidence for Clinical Practice. **Journal of Clinical Medicine**. 3:1 (2014) 1–24. doi: 10.3390/jcm3010001.
- LI, Kehan; YANG, Jianxue; HAN, Xuechang - Lidocaine Sensitizes the Cytotoxicity of Cisplatin in Breast Cancer Cells via Up-Regulation of RAR beta 2 and RASSF1A Demethylation. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067. 15:12 (2014) 23519–23536. doi: 10.3390/ijms151223519.
- LI, Ru *et al.* - Effects of local anesthetics on breast cancer cell viability and migration. **BMC cancer**. ISSN 1471-2407. 18:1 (2018) 666. doi: 10.1186/s12885-018-4576-2.
- LI, Tianci *et al.* - Both Bupivacaine and Levobupivacaine inhibit colon cancer cell growth but not melanoma cells *in vitro*. **Journal of Anesthesia**. ISSN 14388359. 33:1 (2019) 17–25. doi: 10.1007/S00540-018-2577-6.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin - *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. (2007). doi: 10.1038/nprot.2007.30.
- LIANG, Yiran *et al.* - Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**. ISSN 10963650. 60: (2020) 14–27. doi: 10.1016/j.semcan.2019.08.012.
- LISBOA, Paula - **Papel do Farmacêutico na Dor Oncológica**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2015. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- LIU, Hengrui; DILGER, James P.; LIN, Jun - Effects of local anesthetics on cancer cells. **Pharmacology and Therapeutics**. ISSN 1879016X. (2020). doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107558.
- MARTINI, Alberto *et al.* - The natural history of untreated muscle-invasive bladder cancer. **BJU International**. ISSN 1464410X. 125:2 (2020) 270–275. doi: 10.1111/bju.14872.
- MARTINS, Mónica - **Metabolismo do cancro da mama: estudos *in vivo* e *in vitro* com 18F-FDG**. Universidade de Aveiro, 2017. Dissertação de Mestrado em Materiais e Dispositivos Biomédicos.
- MARTUCCI, Cataldo; PANERAI, Alberto E.; SACERDOTE, Paola - Chronic fentanyl or buprenorphine infusion in the mouse: Similar analgesic profile but different effects on

- immune responses. **Pain**. ISSN 03043959. 110:1–2 (2004) 385–392. doi: 10.1016/j.pain.2004.04.020.
- MARVÃO, Jorge; GUIMARÃES, Maria Inês - Anestésicos locais e a medicina dentária - Parte I. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. 7: (2010) 218–223. ISSN 1646-0499.
- MATOS, Ana Catarina *et al.* - The Potential Effect of Lidocaine, Ropivacaine, Levobupivacaine and Morphine on Breast Cancer Pre-Clinical Models: A Systematic Review. **Int. J. Mol. Sci.** 23:3 (2022) 1–21. doi: 10.3390/ijms23031894.
- MCGOWAN, John V. *et al.* - Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**. ISSN 15737241. 31:1 (2017) 63–75. doi: 10.1007/s10557-016-6711-0.
- MCNEAL, John E. - Origin and development of carcinoma in the prostate. **Cancer January**. 23: (1969) 24–24. doi: 10.1002/1097-0142(196901)23:1<24::aid-cncr2820230103>3.0.co;2-I.
- MCNEAL, John E. - Normal Histology of the Prostate. **The American Journal of Surgical Pathology**. 12:8 (1988) 619–633. doi: 10.1097/00000478-198808000-00003.
- MIDDLETON, Justin D.; SIVAKUMAR, Subhakeertana; HAI, Tsonwin - Chemotherapy-induced changes in the lung microenvironment: The role of mmp-2 in facilitating intravascular arrest of breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 22:19 (2021). doi: 10.3390/IJMS221910280.
- MOORSEL, C. J. A. VAN *et al.* - Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. **British journal of cancer**. ISSN 0007-0920. 80:7 (1999) 981–990. doi: 10.1038/SJ.BJC.6690452.
- MORDENTE, A. *et al.* - New Developments in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**. 16: (2009) 1656–1672. doi: 10.2174/092986709788186228.
- MOSMANN, Tim - Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. 65: (1983) 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- MOTTET, N. *et al.* - **Guidelines on Prostate Cancer**. Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines Office, 2021. ISBN 978-94-92671-13-4.
- MULLINS, Jeffrey K.; LOEB, Stacy - Environmental exposures and prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. ISSN 10781439. 30:2 (2012) 216–219. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.11.014.
- MUSHTAQ, Jameel; THURAIRAJA, Ramesh; NAIR, Rajesh - Bladder cancer. **Surgery (United Kingdom)**. ISSN 18781764. 37:9 (2019) 529–537. doi: 10.1016/j.mpsur.2019.07.003.

- NATIONAL CANCER INSTITUTE - **Cancer Pain (PDQ®): Patient Version**. 2002. [Consult. 27 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects/pain/pain-pdq>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - **Cancer Staging**. 2015. [Consult. 30 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - **Bladder Cancer Treatment (PDQ®)**. 2016. [Consult. 24 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.gov/types/bladder/hp/bladder-treatment-pdq>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE - **Prostate Cancer Treatment (PDQ®)–Patient Version**. 2021. [Consult. 10 ago. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>.
- NIU, Dong-Ge *et al.* - Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer. **Oncotarget**. ISSN 1949-2553 (Electronic). 6:6 (2015) 3963–3976. doi: 10.18632/oncotarget.2894.
- ORR, Patty Montgomery; SHANK, Bettina Cobb; BLACK, Amy Conner - The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**. ISSN 08995885. 29:4 (2017) 407–418. doi: 10.1016/j.cnc.2017.08.002.
- PANDYA, Sonali; MOORE, Richard G. - Breast Development and Anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. 54:1 (2011) 91–95. doi: 10.1097/GRF.0b013e318207ffe9.
- PARKER, C. *et al.* - Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. ISSN 15698041. 31:9 (2020) 1119–1134. doi: 10.1016/j.annonc.2020.06.011.
- PEDRO, Ana; SILVA, Manuel P. - Manual de rotação de opióides. Lisboa. 2017.
- PIENTA, Kenneth J. - Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. **Seminars in Oncology**. ISSN 00937754. 28: (2001) 3–7. doi: 10.1016/S0093-7754(01)90148-4.
- PINTO, Ana Catarina; MOREIRA, João Nuno; SIMÕES, Sérgio - Combination Chemotherapy in Cancer: Principles, Evaluation and Drug Delivery Strategies. **Current Cancer Treatment**. (2010) 695–714. doi: 10.5772/22656.
- POWLES, T. *et al.* - Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. ISSN 15698041. 33:3 (2022) 244–258. doi: 10.1016/j.annonc.2021.11.012.

- PROVINCIALI, M. *et al.* - Evaluation of nk and lak cell activities in neoplastic patients during treatment with morphine. **International Journal of Neuroscience**. ISSN 00207454. 59:1–3 (1991) 127–133. doi: 10.3109/00207459108985455.
- PÚBLICO - Consumo de analgésicos opióides mais do que duplicou em oito anos. 2019. [Consult. 7 jan. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.publico.pt/2019/09/04/sociedade/noticia/consumo-analgésicos-opioides-duplicou-decada-1885446>.
- RAIMUNDO, Adriana Isabe - **A dor no doente oncológico**. Universidade do Algarve, 2014. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- RAWLA, Prashanth - Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**. ISSN 1920-4531. 10:2 (2019) 63–89. doi: 10.14740/wjon1191.
- REBOLA, Jorge Manuel Trindade - **Aplicação clínica da expressão de biomarcadores moleculares no carcinoma urotelial da bexiga não músculo-invasivo**. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2019. Dissertação de Doutoramento em Saúde Pública, especialidade de Epidemiologia.
- RIBEIRO, Ana Isabel De Almeida Lopes - **Local Anesthetics as a new therapeutic approach in oral squamous cell carcinoma - An *in vitro* study**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2016. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental.
- RIBEIRO, Daniela Sofia Rosa - **Avaliação da qualidade de vida em doentes com metástases ósseas submetidos a radioterapia**. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2018. Dissertação de Mestrado em Cuidados Paliativos.
- RUSSO, J.; RUSSO, Irma H. - The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 102:1–5 (2006) 89–96. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.09.004.
- SACERDOTE, Paola *et al.* - Antinociceptive and immunosuppressive effects of opiate drugs: a structure-related activity study. **British Journal of Pharmacology**. 121: (1997) 834–840. doi: 10.1038/sj.bjp.0701138.
- SANGUEDOLCE, Francesca *et al.* - Molecular markers in bladder cancer: Novel research frontiers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**. ISSN 1549781X. 52:5 (2015) 242–255. doi: 10.3109/10408363.2015.1033610.
- SANT'AGNESE, Anthony - Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: A review of morphologic aspects. **Urology**. 51: (1998) 121–124. doi: 10.1016/s0090-4295(98)00064-8.
- SANTOS, Beatriz Rosário Sousa - **Farmacogenómica do cancro da mama**. Universidade do Algarve, 2016. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

- SCIARRA, Alessandro *et al.* - Prostate growth and inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. ISSN 09600760. 108:3–5 (2008) 254–260. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.09.013.
- SILVA, Sara Pascoal - **Progressos recentes e perspectivas futuras dos compostos metálicos com atividade anti-tumoral**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2012. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- SINGH YADAV, Budhi *et al.* - Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**. 5:2 (2014) 125–133. doi: 10.5306/wjco.v5.i2.125.
- SINNOTT, Jennifer A. *et al.* - Molecular differences in transition zone and peripheral zone prostate tumors. **Carcinogenesis**. ISSN 14602180. 36:6 (2015) 632–638. doi: 10.1093/carcin/bgv051.
- STALLONE, Giovanni *et al.* - Pentraxin 3: A novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate cancer. **Cancer Research**. ISSN 15387445. 74:16 (2014) 4230–4238. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0369.
- STARKE, K.; BR, Freiburg I. - Analgesia. Em STEIN, CHRISTOPH (Ed.) - **Handbook of Experimental Pharmacology**. ISBN 103540338225v. (2007). doi: 10.1007/978-3-540-33823-9
- STELLATO, Marco *et al.* - Bone metastases from urothelial carcinoma. The dark side of the moon. **Journal of Bone Oncology**. ISSN 22121374. 31: (2021) 100405. doi: 10.1016/j.jbo.2021.100405.
- STENMAN, Ulf-Hakan *et al.* - Prostate-specific antigen. **Cancer Biology**. 9: (1999) 83–93. doi: 10.1006/scbi.1998.0086.
- SUI, Hongyang *et al.* - Lidocaine inhibits growth, migration and invasion of gastric carcinoma cells by up-regulation of miR-145. **BMC Cancer**. 19:233:(2019). doi: 10.1186/s12885-019-5431-9.
- SUN, Dan; LI, Ying-Chun; ZHANG, Xiao-Yu - Lidocaine Promoted Ferroptosis by Targeting miR-382-5p /SLC7A11 Axis in Ovarian and Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology**. ISSN 1663-9812. 12: (2021). doi: 10.3389/fphar.2021.681223.
- SUN, Yi-Sheng *et al.* - Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int. J. Biol. Sci.** 13:11 (2017) 1387–1397. doi: 10.7150/ijbs.21635.
- SUNG, Hyuna *et al.* - Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. ISSN 0007-9235. 71:3 (2021) 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.

- SWARM, Robert A. *et al.* - Adult cancer pain, version 3. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**. ISSN 15401413. 17:8 (2019) 977–1007. doi: 10.6004/jnccn.2019.0038.
- TAN, Mh Eileen *et al.* - Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**. ISSN 17457254. 36:1 (2015) 3–23. doi: 10.1038/aps.2014.18.
- TCHOUNWOU, Paul B. *et al.* - Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. **Journal of Experimental Pharmacology**. ISSN 11791454. 13: (2021) 303–328. doi: 10.2147/JEP.S267383.
- TONER, A. J. *et al.* - A pilot multicentre randomised controlled trial of lidocaine infusion in women undergoing breast cancer surgery. **Anaesthesia**. ISSN 13652044. 76:10 (2021) 1326–1341. doi: 10.1111/ANAE.15440.
- TOSCHI, L. *et al.* - Role of gemcitabine in cancer therapy. **Future Oncology**. ISSN 17448301. 1:1 (2005) 7–17. doi: 10.1517/14796694.1.1.7.
- TRESCOT, Andrea M. *et al.* - Opioid Pharmacology. **Pain Physician**. ISSN 1533-3159. 11: (2008) S133–S153.
- UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL - **TNM Classification of Malignant Tumours**. 2022. [Consult. 30 dez. 2021]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.uicc.org/resources/tnm>>.
- UROLOGY CARE FOUNDATION - **Non-muscle Invasive Bladder Cancer: Symptoms, Diagnosis & Treatment**. 2020. [Consult. 9 ago. 2022]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.urologyhealth.org/urology-a-z/n/non-muscle-invasive-bladder-cancer>>.
- USTUN, F. *et al.* - Evaluation of morphine effect on tumour angiogenesis in mouse breast tumour model, EATC. **Medical Oncology**. 28:4 (2011) 1264–1272. doi: 10.1007/s12032-010-9573-5.
- VARGAS-SCHAFFER, Grisell - Is the WHO analgesic ladder still valid? Twenty-four years of experience. **Canadian Family Physician**. ISSN 15308561. 56: (2010) 514–517. doi: 10.1373/clinchem.2014.221408.
- VENKATESWARAN, Vasundara; KLOTZ, Laurence H. - Diet and prostate cancer: Mechanisms of action and implications for chemoprevention. **Nature Reviews Urology**. ISSN 17594812. 7:8 (2010) 442–453. doi: 10.1038/nrurol.2010.102.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. - Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**. 243: (2000) 167–190. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00233-7.

- VIETRI, Maria Teresa *et al.* - Hereditary prostate cancer: Genes related, target therapy and prevention. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 22:7 (2021). doi: 10.3390/ijms22073753.
- VIJAYAKUMAR, Srinivasan *et al.* - Prostate-specific antigen levels are higher in african-american than in white patients in a multicenter registration study: results of RTOG 94-12. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 40: (1998) 17–25. doi: 10.1016/s0360-3016(97)00834-1.
- WANG, Xiao; LI, Tianzuo - Ropivacaine inhibits the proliferation and migration of colorectal cancer cells through ITGB1. (2020). doi: 10.1080/21655979.2020.1857120.
- WANG, Yingbin *et al.* - Lidocaine sensitizes the cytotoxicity of 5-fluorouacil in melanoma cells via upregulation of microRNA-493. **Pharmazie**. ISSN 00317144. 72:11 (2017) 663–669. doi: 10.1691/ph.2017.7616.
- WATTS, Eleanor L. *et al.* - Low Free Testosterone and Prostate Cancer Risk: A Collaborative Analysis of 20 Prospective Studies. **European Urology**. ISSN 18737560. 74:5 (2018) 585–594. doi: 10.1016/j.eururo.2018.07.024.
- WESTBROOK, Kelly; STEARNS, Vered - Pharmacogenomics of breast cancer therapy: An update. **Pharmacology and Therapeutics**. ISSN 01637258. 139:1 (2013) 1–11. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.03.001.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Cancer pain relief**. Geneva. ISBN 9241560009. (1986)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - **WHO guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents**. ISBN 9789241550390. (2018)
- WUETHRICH, Patrick Y. *et al.* - Potential Influence of the Anesthetic Technique Used during Open Radical Prostatectomy on Prostate Cancer-related Outcome: A Retrospective Study. **Anesthesiology**. 113: (2010) 570–576. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181e4f6ec.
- XING, Wei *et al.* - Lidocaine Induces Apoptosis and Suppresses Tumor Growth in Human Hepatocellular Carcinoma Cells *in Vitro* and in a Xenograft Model *in Vivo*. **Anesthesiology**. ISSN 15281175. 126:5 (2017) 868–881. doi: 10.1097/ALN.0000000000001528.
- YANG, Qing *et al.* - Lidocaine alleviates cytotoxicity-resistance in lung cancer A549/DDP cells via down-regulation of miR-21. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 456: (2019) 63–72. doi: 10.1007/s11010-018-3490-x.
- YANG, Xihua *et al.* - Lidocaine enhances the effects of chemotherapeutic drugs against bladder cancer. **Scientific reports**. (2018). doi: 10.1038/s41598-017-19026-x.

- YU TIAN, Xiao *et al.* - Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity and complementary and alternative medicines: progress and perspective. (2015) 23. doi: 10.3389/fphar.2015.00234.
- ZAJACZKOWSKA, Renata *et al.* - Perioperative Immunosuppression and Risk of Cancer Progression: The Impact of Opioids on Pain Management. **Pain Research and Management**. ISSN 12036765. (2018). doi: 10.1155/2018/9293704.
- ZEIGLER-JOHNSON, Charnita M. *et al.* - Genetic susceptibility to prostate cancer in men of African descent: implications for global disparities in incidence and outcomes. **The Canadian Journal of Urology**. 15:1 (2008) 3872–3882.
- ZHANG, Lei *et al.* - Lidocaine inhibits the proliferation of lung cancer by regulating the expression of GOLT1A. **Cell Proliferation**. ISSN 13652184. 50:5 (2017). doi: 10.1111/CPR.12364.
- ZHANG, Xue *et al.* - Lidocine potentiates the cytotoxicity of 5-fluorouracil to choriocarcinoma cells by downregulating ABC transport proteins expression. **Journal of Cellular Biochemistry**. ISSN 10974644. 120:10 (2019) 16533–16542. doi: 10.1002/JCB.28913.
- ZHANG, Yiguo *et al.* - Mechanisms of Cancer Inhibition by Local Anesthetics. **Frontiers in Pharmacology**. 12: (2021). doi: 10.3389/fphar.2021.770694.
- ZHENG, Qinghong; PENG, Xiaohong; ZHANG, Yaqin - Cytotoxicity of amide-linked local anesthetics on melanoma cells via inhibition of Ras and RhoA signaling independent of sodium channel blockade. **BMC Anesthesiology**. ISSN 14712253. 20:1 (2020). doi: 10.1186/s12871-020-00957-4.
- ZHU, Guanhua *et al.* - Differential effects and mechanisms of local anesthetics on esophageal carcinoma cell migration, growth, survival and chemosensitivity. **BMC Anesthesiology**. ISSN 14712253. 20:1 (2020). doi: 10.1186/s12871-020-01039-1.

Anexos

Anexo I

A linha celular de mama MCF-7 foi incubada durante 24, 48 e 72h com os anestésicos locais em monoterapia e observou-se que a resposta após o tratamento é dependente do tempo de incubação como ilustrado na Figura 24.

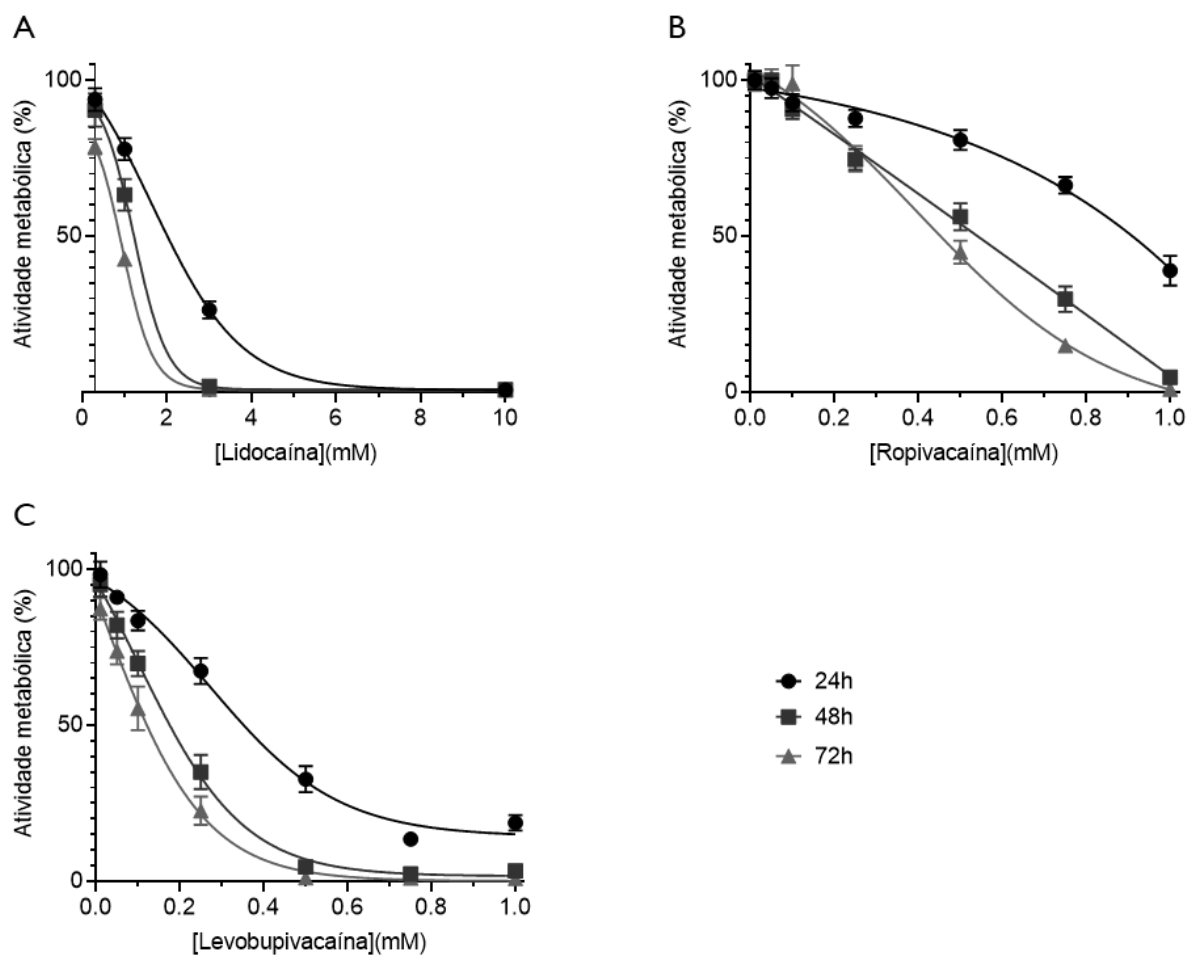


Figura 24: Curvas de dose-resposta das células MCF-7 ao tratamento com os anestésicos locais. Os resultados foram obtidos pelo ensaio de MTT após 24, 48 e 72h do tratamento com (A) Lid, (B) Rop, (C) Lev. As curvas representam o ajuste dos resultados ao modelo sigmoide de dose-resposta e cada ponto experimental corresponde à média \pm SEM de 3 experiências independentes em triplicado para cada ponto experimental.