

Efeito Preventivo do Celecoxib na Carcinogénese Vesical num Modelo Experimental de Rato

Preventive effect of celecoxib on bladder carcinogenesis in a rat model

Autores:

Pedro Eufrásio¹, Belmiro Parada^{1,2}, Pedro Nunes¹, Flávio Reis², Lilian Campos¹,
Fernanda Xavier da Cunha³, Arnaldo Figueiredo^{1,2}, Alfredo Mota¹

Instituições:

¹ Serviço de Urologia e Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de Coimbra
(*Director*: Prof. Doutor Alfredo Mota);

² Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

³ Serviço de Anatomia Patológica dos Hospitais da Universidade de Coimbra
(*Directora*: Dra. Fernanda Xavier da Cunha).

Correspondência:

Pedro Eufrásio
Hospitais da Universidade de Coimbra
Avenida Bissaya Barreto – Praceta Prof. Mota Pinto; 3000-075 Coimbra
e-mail: pedrocotovio26@hotmail.com

Data de Submissão: 19 de Abril de 2011 | Data de Aceitação: 13 de Agosto de 2011

Resumo

Objectivos: Avaliar o efeito de um inibidor selectivo da ciclooxigenase-2 (COX-2) na prevenção da carcinogénese vesical, num modelo experimental de rato, assim como avaliar a importância da inflamação, proliferação e stress oxidativo no crescimento tumoral e na sua prevenção.

Material e Métodos: Estudo investigacional com 44 ratos Wistar divididos em 4 grupos: controlo – veículo; carcinogénio – 0.05% de *N*-butil-*N*-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN); celecoxib (CEL) – 10 mg/kg/dia; prevenção – CEL + BBN. O estudo decorreu durante 20 semanas, sendo as primeiras 8 de tratamento farmacológico e as seguintes de expressão ou prevenção tumorais. Foram analisados o número e volume de tumores e a natureza das lesões uroteliais. Estudaram-se os marcadores inflamatórios e de proliferação séricos, assim como o estado oxidativo.

Resultados: A incidência de carcinoma vesical foi: controlo - 0% (0/8); BBN - 65% (13/20); CEL - 0% (0/8); CEL + BBN - 12,5% (1/8). O volume médio tumoral por rato com neoplasia e por tumor foram significativamente inferiores no grupo prevenção (21,2 e 5,3 ± 0,4 mm³), quando comparado com o grupo carcinogénio (138,5 ± 7,5 e 112,5 ± 6,4 mm³) (p=0,001). A incidência de lesões pré-neoplásicas

(hiperplasia e displasia) e neoplásicas (tumores papilares e carcinoma *in situ* – CIS) foram claramente reduzidas no grupo prevenção. Um perfil anti-inflamatório e anti-oxidante foi encontrado apenas nos grupos CEL e CEL + BBN.

Conclusões: O celecoxib demonstrou um efeito inibitório na carcinogénese vesical, que poderá resultar das suas propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-oxidantes. Este estudo apoia uma estratégia de quimioprevenção tumoral baseada nos inibidores da COX-2.

Palavras-chave: Tumor vesical, quimioprevenção, inibidor da ciclooxigenase-2, inflamação, modelo experimental de rato.

Abstract

Objectives: To evaluate the efficacy of a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor in rat bladder cancer chemoprevention, and to analyze the importance of inflammation, proliferation and oxidative stress in tumor growth and in its prevention.

Patients and Methods: Investigational study including 44 Wistar male rats, divided in 4 groups: control – vehicle; carcinogen – 0.05% of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN); celecoxib (CEL) – 10 mg/kg/day; preventive (CEL + BBN).

The study occurred during 20 weeks, the first 8 performing drug treatments and the remaining for tumor expression or prevention. The bladders were analyzed for number and volume of tumor and nature of urothelium lesions. Serum was assessed for markers of inflammation, proliferation and redox status.

Results: The incidence of vesical carcinoma was: control - 0% (0/8); BBN - 65% (13/20); CEL - 0% (0/8); CEL + BBN - 12.5% (1/8). The mean tumor volume per rat with neoplasia and per tumor were significantly lower in the preventive group (21.2 and 5.3 ± 0.4 mm³) when comparing to carcinogen one (138.5 \pm 7.5 and 112.5 \pm 6.4 mm³) ($p=0.001$). The incidence of pre-neoplastic (hyperplasia and dysplasia) and neoplastic (papillary tumors and carcinoma in situ - CIS) lesions were notoriously reduced in the preventive treatment. An anti-inflammatory and antioxidant profile was encountered only in the celecoxib and preventive groups.

Conclusions: Celecoxib demonstrated an inhibitory effect on bladder carcinogenesis, which might be due to its expected anti-inflammatory, anti-proliferatory and antioxidant actions. This data supports a role of cancer chemoprevention strategies based on COX-2 inhibition.

Keywords: Bladder cancer, chemoprevention, cyclooxygenase-2 inhibition, inflammation, rat model.

Introdução

Os tumores vesicais constituem um importante problema médico, não só pela sua taxa de incidência e de prevalência, mas também pela elevada morbidade e mortalidade¹. Correspondem ao 4º tumor mais frequente no homem e ao 8º na mulher, correspondendo a cerca de 5-10% de todas as neoplasias na Europa e EUA². Têm uma alta taxa de recidiva e o prognóstico, à excepção das formas superficiais, é mau, particularmente quando diagnosticado tardiamente ou quando é tratado de um modo inadequado. Por estes motivos, os tumores vesicais estão associados a altos custos sócio-económicos³. Apesar dos avanços e melhorias nos cuidados de saúde a que temos assistido nos últimos anos, os métodos convencionais de tratamento destas neoplasias, especialmente a cirurgia mas também a quimioterapia e a radioterapia, não tiveram impacto substancial na morbidade e mortalidade^{4,5}. Por isso, as estratégias de prevenção são fundamentais na orientação e tratamento dos tumores vesicais. A possibilidade de identificação de fármacos úteis nesta patologia necessita de uma melhor compreensão dos mecanismos mo-

leculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão tumorais⁶. Como exemplos de factores de risco bem estabelecidos na carcinogénese vesical encontram-se o fumo de tabaco e carcinogénios ocupacionais, tais como as aminas aromáticas e os hidrocarbonetos policíclicos⁷. Outros englobam alterações genéticas já caracterizadas⁸, enquanto mecanismos celulares e moleculares que envolvam fenómenos inflamatórios, proliferativos ou oxidativos já estudados e propostos noutros tipos de neoplasias⁹ deverão ser submetidos a investigações adicionais nos carcinomas uroteliais.

A utilização do carcinogénio BBN 0.05% em ratos é de particular importância no estudo experimental da carcinogénese vesical, dadas as semelhanças histológicas com o carcinoma de células de transição humano, sendo esta a lesão patológica predominante, que tem início numa transformação maligna e que se constitui como um processo contínuo que passa por várias fases, desde as anomalias epiteliais proliferativas e displásicas, até às lesões pré-neoplásicas e, por fim, a transformação maligna¹⁰.

Os fenómenos inflamatórios através da via da ciclooxigenase (COX) têm sido implicados no desenvolvimento tumoral. Esta via sintetiza prostaglandinas a partir do ácido araquidónico e as isoformas COX-1 e COX-2 são enzimas fundamentais neste processo. Enquanto a primeira se encontra expressa numa enorme variedade de tecidos, a COX-2 não se expressa na maioria deles em condições normais, no entanto, os seus níveis aumentam drasticamente com estímulos que causem irritação ou inflamação¹¹, tais como factores de crescimento. Especificamente na carcinogénese, o papel da COX-2 pode incluir proliferação pré-maligna, transformação, manutenção de tumor viável, crescimento, invasão e metastização⁹, a partir de fenómenos inflamatórios agudos. Como a sobre-expressão de COX-2 tem sido relatada nos tumores vesicais¹², os inibidores desta enzima poderão ser vistos como agentes eventualmente úteis na prevenção desta neoplasia.

O objectivo do nosso trabalho foi avaliar a potencial eficácia preventiva do inibidor da COX-2, o Celecoxib, na carcinogénese vesical, utilizando um modelo experimental de rato. Pretendemos, também, avaliar a importância da inflamação, proliferação e stress oxidativo no crescimento tumoral e na sua potencial prevenção.

Material e Métodos

Animais e grupos

44 ratos Wistar (Charles River Lab. Inc., Barcelona, Espanha), com 250-285 gramas, foram mantidos numa sala climatizada, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, ração padrão de laboratório (IPM-R20, Leticia, Barcelona, Espanha) e acesso

livre a água. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controlo (n=8) – veículo (sumo de laranja); grupo carcinogénio (BBN) (n=20) – 0,05% de N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Toquio, Japão); grupo Celecoxib (CEL) (n=8) – 10 mg/kg/dia de inibidor selectivo da COX-2 Celebrex® (Laboratórios Pfizer, S.a., Lisboa, Portugal); grupo prevenção (CEL+BBN) (n=8). O grupo controlo foi usado como placebo, sem acção de nenhum fármaco e o grupo CEL foi utilizado para observação do seu efeito em monoterapia, nos parâmetros analisados e numa população normal e, sobretudo, para comparação com os resultados do grupo prevenção. O grupo carcinogénio pretendeu induzir a presença de tumores vesicais, recorrendo a um fármaco indutor da oncogénese urotelial e o grupo prevenção pretendeu demonstrar os efeitos do fármaco em estudo, Celecoxib, em animais submetidos a um indutor da carcinogénese vesical.

Os tratamentos foram efectuados em duas etapas: um primeiro período de oito semanas para indução tumoral e tratamento farmacológico (sumo de laranja, BBN e CEL) e um segundo período de doze semanas para expressão ou prevenção tumorais. O BBN foi administrado por diluição em sumo de laranja ou água (fornecidos a todos os grupos) e o CEL foi introduzido por cânula esofágica. Todos os animais completaram o protocolo de 20 semanas. O peso corporal e a quantidade de bebida ingerida foram monitorizados ao longo da investigação.

Colheita e preparação de amostras.

Sangue. No final dos tratamentos, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 2 mg/Kg de uma solução contendo uma proporção de 2:1 de 50 mg/ml de Ketamina (Ketalar®, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Lda, Seixal, Portugal) e 2,5% de clorpromazina (Largatil®, Rhône-Poulenc Rorer, laboratórios Vitória, Amadora, Portugal). As amostras sanguíneas foram imediatamente colhidas por punção venosa na veia jugular.

Tecidos. Os ratos foram sacrificados por luxação cervical, e os pulmões, estômago, fígado, rins e intestinos foram imediatamente removidos, pesados e colocados numa solução de Krebs gelada ou em formaldeído. Antes da remoção, injectou-se solução de formaldeído dentro da bexiga como pré-fixação para análise histológica.

Análise de prevenção tumoral.

Análise quantitativa (número e volume dos tumores). Cada bexiga foi cuidadosamente aberta e o lúmen foi inspeccionado para visualização de qualquer lesão visível. O número de tumores por rato e o volume de cada lesão foram anotados para análise posterior.

Análise qualitativa (histologia vesical). As bexigas foram fixadas em formaldeído a 4% e processadas para secção em parafina. Três fragmentos de cada bexiga foram embebidos e três secções espessadas foram coradas em hematoxilina-eosina (H&E) e examinadas histologicamente pela mesma patologista (MF Cunha).

Marcadores de proliferação, inflamação e estado redox.

Os níveis de factor de transformação de crescimento beta-1 (TGFβ1), de factor de necrose tumoral alfa (TNFα) e interleucina-1β (IL-1β) foram medidos recorrendo a kits ultrasensíveis de ELISA (R&D Systems, Mineapolis, EUA). A proteína C reactiva (PCR) foi medida usando um kit de LISA da Helica Biosystems, Inc., (Fullerton, CA, EUA). As espécies reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBAR) foram utilizadas para avaliação da peroxidação lípida sérica, renal e hepática, nomeadamente malondialdeído (MDA). O estado antioxidante sérico total (TAS) foi avaliado através de ensaio antioxidante redutor de ferro (FRAP).

Análise bioquímica e hematológica.

Função renal e hepática. A creatinina sérica, ureia e concentração de ácido úrico foram usadas como índices de função renal e os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram medidos para avaliação da função hepática, por métodos e equipamentos validados (Hitachi 717 analyser, Roche Diagnostics Inc., MA, EUA).

Análise hematológica. A contagem de glóbulos vermelhos (GV), o hematócrito (Ht), a concentração de hemoglobina (Hb), a contagem de reticulócitos (RET), os leucócitos, as plaquetas e o plaquetócrito foram avaliados por EDTA utilizando Coulter Counter® automático (Beckman Coulter Inc., CA, EUA).

Análise estatística.

Utilizámos o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA), versão 16.0. Aplicou-se o teste t de Student para variáveis quantitativas e o teste Qui-quadrado para variáveis qualitativas. Considerámos a presença de significado estatístico quando o valor de p era inferior ou igual a 0,05.

Resultados

Análise da quimioprevenção tumoral.

Consumo de bebida e peso corporal. Durante o estudo, não houve alterações relevantes entre os grupos relativamente ao consumo de bebida e o peso corporal.

Avaliação macroscópica. Todas as bexigas do grupo controlo revelaram um padrão normal, sem sinais

de malignidade. Foram encontradas características idênticas no grupo CEL, com a presença de órgãos finos, translúcidos e sem alterações da vascularização ou lesões anómalas no seu interior. Contudo, no grupo BBN, 65% (13 em 20) dos ratos tiveram tumores vesicais, praticamente todos observáveis durante a análise macroscópica ($p=0,001$). As paredes encontravam-se espessadas, com neovascularização e com formações claramente tumorais, algumas das quais com volume importante. No grupo CEL + BBN, à excepção de um caso, as bexigas apresentaram um padrão semelhante às do grupo controlo e CEL, ou seja, sem sinais de anomalias (figura 1).

Avaliação quantitativa. Não houve desenvolvimento de neoplasia vesical em nenhum rato do grupo controlo. O mesmo aconteceu com os animais do grupo CEL. No grupo BBN ($n=20$), a percentagem de ratos com tumor atingiu os 65% ($p<0,001$), com uma média de $1,2 \pm 0,1$ tumores por rato com neoplasia ($p=0,006$). O volume tumoral médio por rato com neoplasia ($n=13$) foi de $138,5 \pm 7,5 \text{ mm}^3$ ($p=0,009$) e o volume tumoral médio por tumor (16 tumores) foi de $112,5 \pm 6,4 \text{ mm}^3$ (tabela 1) ($p=0,009$). No grupo CEL + BBN, houve uma clara prevenção da carcinogénese vesical, com uma prevalência de 12,5% (1 em 8), que corresponde

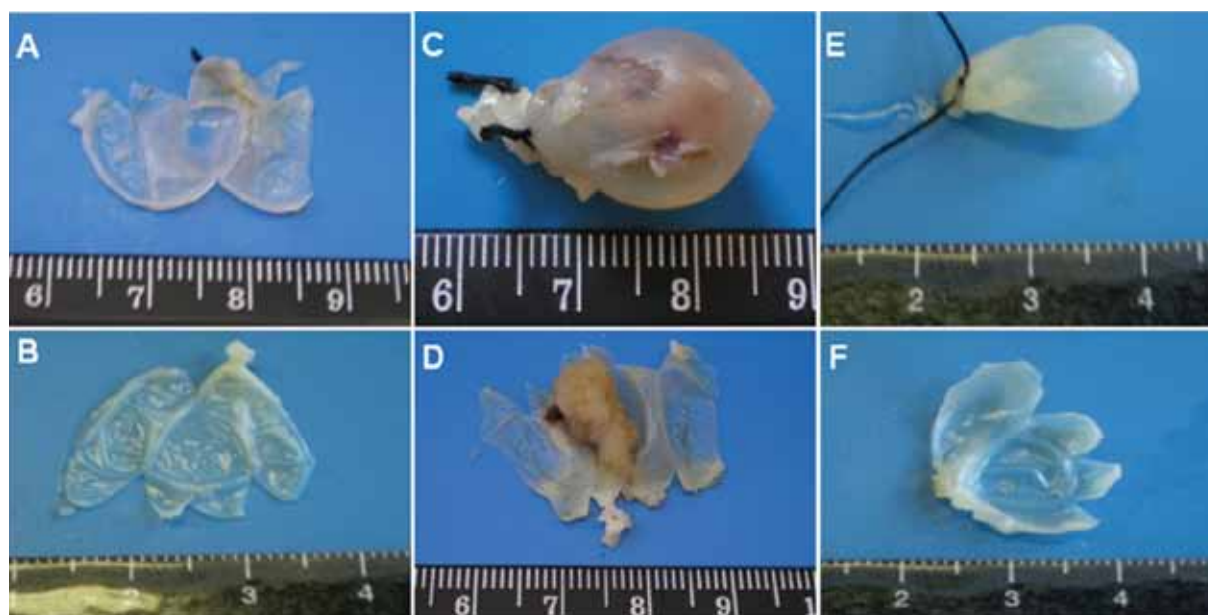


Figura 1) Avaliação macroscópica. Todas as bexigas dos grupos controlo (A) e CEL (B) revelaram um padrão normal. No grupo BBN (C e D), 65% dos ratos tiveram tumores vesicais. No grupo CEL + BBN (E e F), todas as bexigas, à excepção de um caso, mostraram um padrão normal.

Macroscopia	Controlo (n=8)	BBN (n=20)	CEL (n=8)	CEL+BBN (n=8)		
<i>Número de tumores</i>						
% ratos com tumor	0	65,0% (13 em 20)	0	12,5% (1 em 8)		
Nr tumores/rato (Média)	0	$1,2 \pm 0,1$ (16 em 13)	0	4,0 (4 em 1)		
<i>Volume tumoral (mm³)</i>						
Média/rato	0	$138,5 \pm 7,5$ (em 13)	0	21,2 (em 1)		
Média/tumor	0	$112,5 \pm 6,4$ (em 16)	0	$5,3 \pm 0,4$ (em 4)		
Microscopia	Controlo	BBN		CEL	CEL+BBN	
		Grupo Tumoral	Grupo total		Grupo Tumoral	Grupo total
<i>Lesões pré-neoplásicas</i>						
Hiperplasia	0	100 (13/13)	100 (20/20)	0	100 (1/1)	37,5 (3/8)
Displasia alto grau	0	100 (13/13)	75 (15/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)
Displasia baixo grau	0	0 (0/13)	25 (5/20)	0	100 (1/1)	12,5 (1/8)
<i>Lesões malignas</i>						
Tumores papilares	0	100 (13/13)	65 (13/20)	0	100 (1/1)	12,5 (1/8)
Tumores infiltrativos	0	15 (2/13)	10 (2/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)
Carcinoma <i>In Situ</i>	0	31 (4/13)	20 (4/20)	0	0 (0/1)	0 (0/8)

Tabela 1) Efeitos de um inibidor selectivo da COX-2 na quimioprevenção de tumores vesicais: Avaliação macroscópica (quantitativa) e microscópica (qualitativa) das lesões uroteliais.

a apenas um rato com tumor, num universo de 8 animais. No mesmo seguimento, o volume tumoral médio por tumor (4 tumores num único rato) foi $5,3 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ ($p < 0,001$).

Avaliação qualitativa. Relativamente à análise microscópica do urotélio e dos carcinomas uroteliais, o grupo controlo e CEL mostraram padrões normais, sem sinais de lesões pré-neoplásicas (hiperplasia e displasia). No grupo carcinogénio (BBN), houve uma transformação maligna evidente, incluindo hiperplasia e displasia em todos os animais, mesmo nos que não tiveram tumores. Além disso, estavam presentes lesões malignas, papilares, infiltrativas e CIS (figura 2). A utilização de celecoxib no grupo prevenção (CEL + BBN) preveniu notoriamente o aparecimento e desenvolvimento tumorais. Apenas 1 rato no grupo de 8 desenvolveu tumor, cujo urotélio demonstrou hiperplasia e displasia, sem lesões infiltrativas ou CIS. Os restantes 7 animais apresentaram um urotélio normal. Os pulmões, estômago, fígado, rins e intestino foram normais ao exame macroscópico e histológico.

Perfil proliferativo, inflamatório e estado redox.

No grupo BBN houve um aumento significativo no TGF β 1 ($p < 0,01$) e da PCR séricos ($p < 0,001$), comparativamente ao grupo controlo (Fig. 3). Os valores séricos de TNF α e IL-1 β não variaram entre os grupos BBN e controlo. No grupo CEL, os valores de TGF β 1 não se alteraram e os de TNF α e IL-1 β estavam aumentados ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), enquanto que os da PCR se mostraram significativamente diminuídos ($p < 0,001$) (figura 3). Quando se adicionou celecoxib para prevenir a carcinogénese vesical, o aumento de TNF α e IL-1 β induzido pelo BBN foi prevenido ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Relativamente ao MDA hepático e renal, um marcador de peroxidação lipídica, verificamos que não

se alterou nos grupos controlo e BBN (figura 4). No entanto, no grupo CEL houve uma diminuição significativa no MDA hepático ($p < 0,05$) e renal ($p < 0,001$). Perfil semelhante foi encontrado no grupo CEL + BBN. A concentração de MDA sérico mostrou tendência para valores elevados no grupo BBN quando comparado com o controlo. Este valor foi acompanhado por um aumento significativo ($p < 0,05$) no estado antioxidante total (TAS). A relação MDA/TAS, um marcador de balanço oxidativo, foi inferior que no controlo. Nos animais CEL, o MDA sérico foi reduzido ($p < 0,001$) quando comparado com o controlo. O TAS esteve inalterado e a relação MDA/TAS foi significativamente reduzida ($p < 0,005$). Semelhante protecção antioxidante sérica foi demonstrada no grupo CEL + BBN vs BBN ($p < 0,001$).

Análise bioquímica e hematológica. No grupo CEL + BBN, todos os parâmetros da função renal (creatinina, ureia e ácido úrico) foram significativamente superiores ($p < 0,01$) aos do grupo BBN. Relativamente à função hepática, a AST e ALT no grupo BBN foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que nos animais controlo, contrastando com o grupo CEL que foi idêntico ao controlo. Nos ratos CEL + BBN, todos os parâmetros foram substancialmente inferiores aos do grupo BBN. Quanto aos valores hematológicos, os ratos do grupo BBN tiveram valores mais elevados de GV do que os do grupo controlo ($p < 0,05$), níveis de hematócrito superiores e valores significativamente inferiores de leucócitos ($p < 0,05$). No grupo CEL houve uma tendência para valores baixos em todos os parâmetros hematológicos, sem atingir significância estatística. Os valores no grupo CEL + BBN foram idênticos aos do grupo controlo, ou seja, a administração de celecoxib no grupo BBN reduziu as alterações hematológicas induzidas pelo carcinogénio (tabela 2).

	Controlo (n=8)	BBN (n=20)	CEL (n=8)	CEL+BBN (n=8)
Função renal				
Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	51.27 \pm 1.77	54.81 \pm 1,77	53.04 \pm 1.77	64.53 \pm 2.65
Ureia (mmol/L)	13.70 \pm 0,67	13.50 \pm 0.47	14.71 \pm 1.36	18.55 \pm 0.71
Ácido úrico ($\mu\text{mol/L}$)	36.88 \pm 4,16	57.10 \pm 7.14	27.96 \pm 1.78	109.44 \pm 14.87
Função hepática				
AST (UI/L)	51.57 \pm 1.09	78.15 \pm 6.04	55.00 \pm 2.71	64.57 \pm 4.30
ALT (UI/L)	30.86 \pm 1.75	38.15 \pm 2.92	28.25 \pm 2.02	30.14 \pm 2.58
Parâmetros hematológicos				
Hb (g/L)	141.50 \pm 5.20	146.00 \pm 1.50	132.80 \pm 1.40	140.50 \pm 2.00
Leucócitos ($10^9/\text{L}$)	4.60 \pm 0.56	3.52 \pm 0.26	2.85 \pm 0.85	4.50 \pm 0.44
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$)	990.67 \pm 46.21	1008.13 \pm 46.96	884.75 \pm 42.58	942.38 \pm 36.89

Tabela II) Análise da função renal, hepática e hematológica.

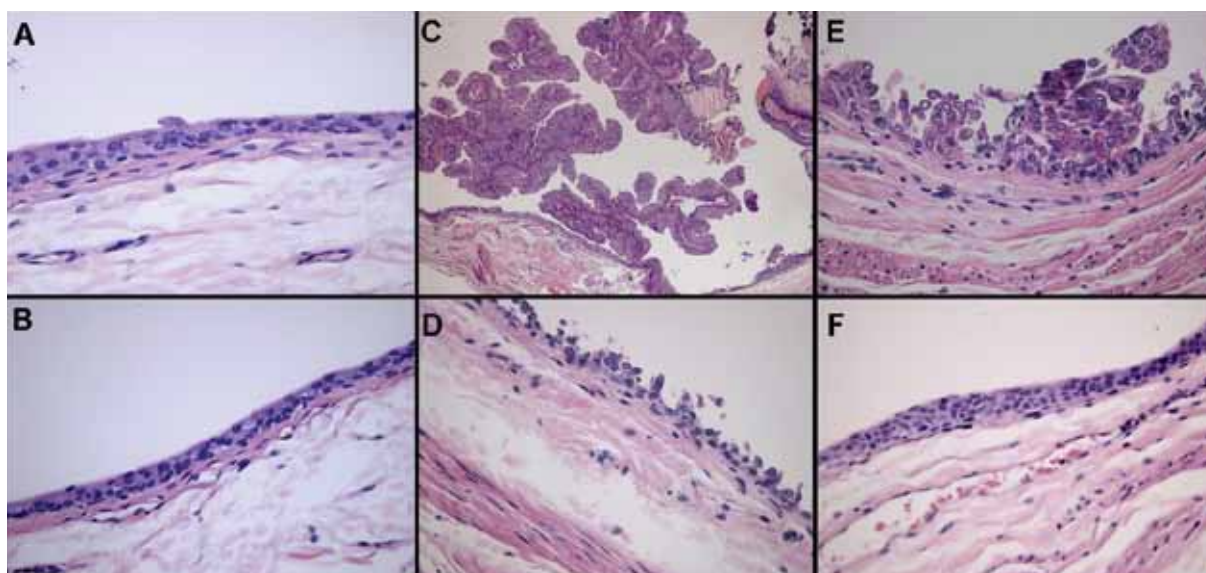


Figura 2) Avaliação microscópica. As bexigas dos grupos controle (A) e CEL (B) não mostraram sinais de lesões pré-malignas ou tumorais. No grupo carcinogénico (C e D), todas as bexigas apresentaram hiperplasia e displasia de alto grau, incluindo aquelas sem formações neoplásicas, como tumores papilares (C) e CIS (D). No grupo CEL + BBN (E e F), apenas uma bexiga dos 8 ratos tinha tumor com displasia €, enquanto todos os outros ratos apresentaram urotélio normal.

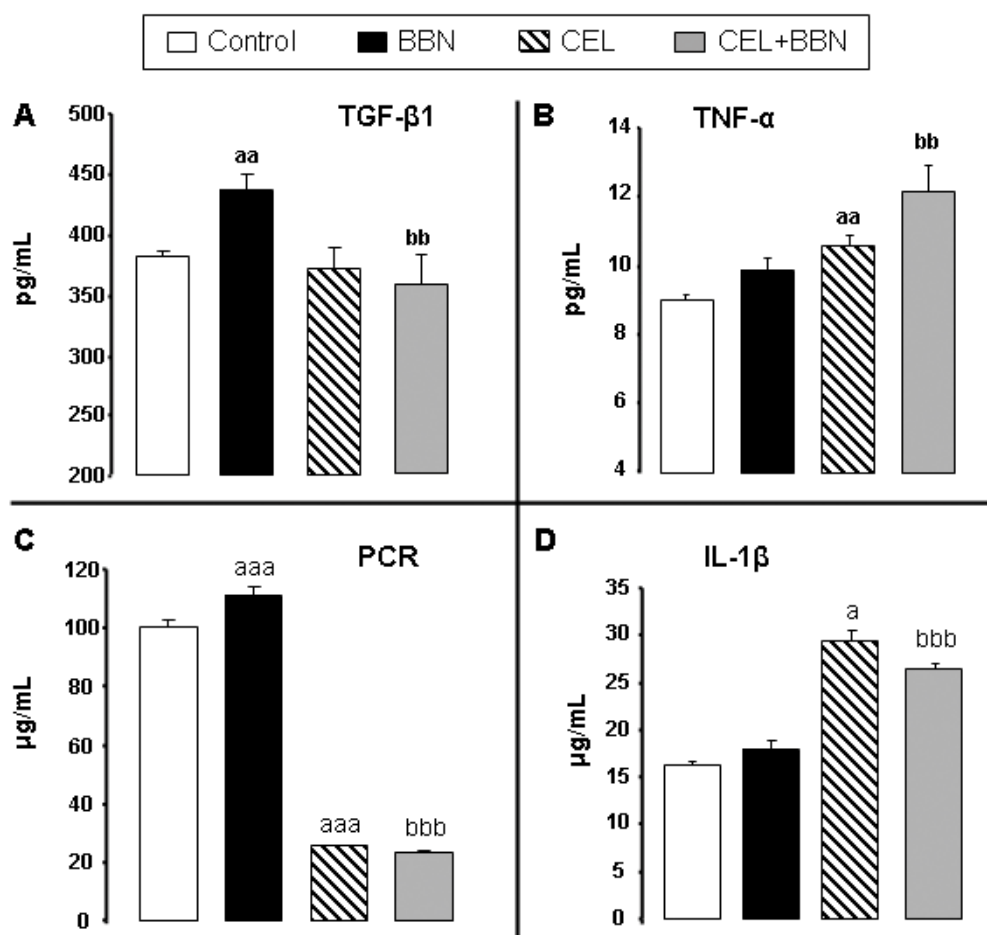


Figura 3) Marcadores séricos de proliferação e inflamação: TGFβ1 (A), TNFα (B), PCR (C) e IL-1β (D). a p<0.05 , aa p<0.01 e aaa p<0.001 vs grupo controle; b p<0.05 , bb p<0.01 e bbb p<0.001 vs grupo BBN.

Discussão

O controlo dos tumores vesicais tem-se revelado particularmente difícil, devido à eficácia limitada das técnicas cirúrgicas convencionais e das opções farmacológicas, nomeadamente no controlo das recidivas e progressões^{1,5}. É, por isso, fundamental estabelecer estratégias de prevenção para melhorar o prognóstico desta neoplasia, daí a necessidade de estudos científicos baseados na investigação em modelos animais que simulem as condições patológicas no humano.

Os tumores vesicais induzidos pelo carcinógeno *N*-butil-*N*-(4-hidroxi-butil) nitrosamina (BBN) em ratos tem sido utilizado como modelo válido no estudo da fisiopatologia e do tratamento da carcinogénese vesical, devido à semelhança histológica com os carcinomas uroteliais dos humanos^{13,14}. Neste estudo, pretendemos avaliar a eficácia de um inibidor selectivo da COX-2 na quimioprevenção do desenvolvimento e progressão tumorais, utilizando um modelo de carcinogénese em ratos induzido com BBN. Os nossos resultados estão de acordo com estudos prévios com este modelo¹⁵, confirmando a sua credibilidade na avaliação da eficácia da quimioprevenção de agentes farmacológicos.

Os mecanismos subjacentes à carcinogénese são multifactoriais. A inflamação, através dos seus mediadores, citocinas e outros factores de crescimento, parece ser um dos principais responsáveis pelo crescimento tumoral¹⁶. Um dos mecanismos intimamente ligados à inflamação é a via das enzimas COX, em particular a COX-2, cujos níveis e actividade estão aumentados em certos tumores⁹. Um papel preventivo da inibição desta isoenzima no tumor vesical foi previamente reportada em modelos animais¹⁷⁻¹⁹, mas o mecanismo exacto subjacente permanece por elucidar. Várias alterações moleculares e celulares têm sido propostas, particularmente no carcinoma da próstata, que incluem a esperada redução da inflamação como resultado da inibição da COX-2 e, ainda, outras vias dependentes e independentes tais como a indução da apoptose, a indução da paragem do ciclo celular, supressão da angiogénese, inibição do crescimento celular, ou através de outros componentes, nomeadamente o sistema imunitário²⁰⁻²⁵.

No nosso estudo, o inibidor da COX-2, celecoxib, promoveu um efeito preventivo assinalável no desenvolvimento dos tumores vesicais. De facto, a incidência foi de apenas 12,5% (1 rato em 8), com uma redução do volume tumoral médio por rato

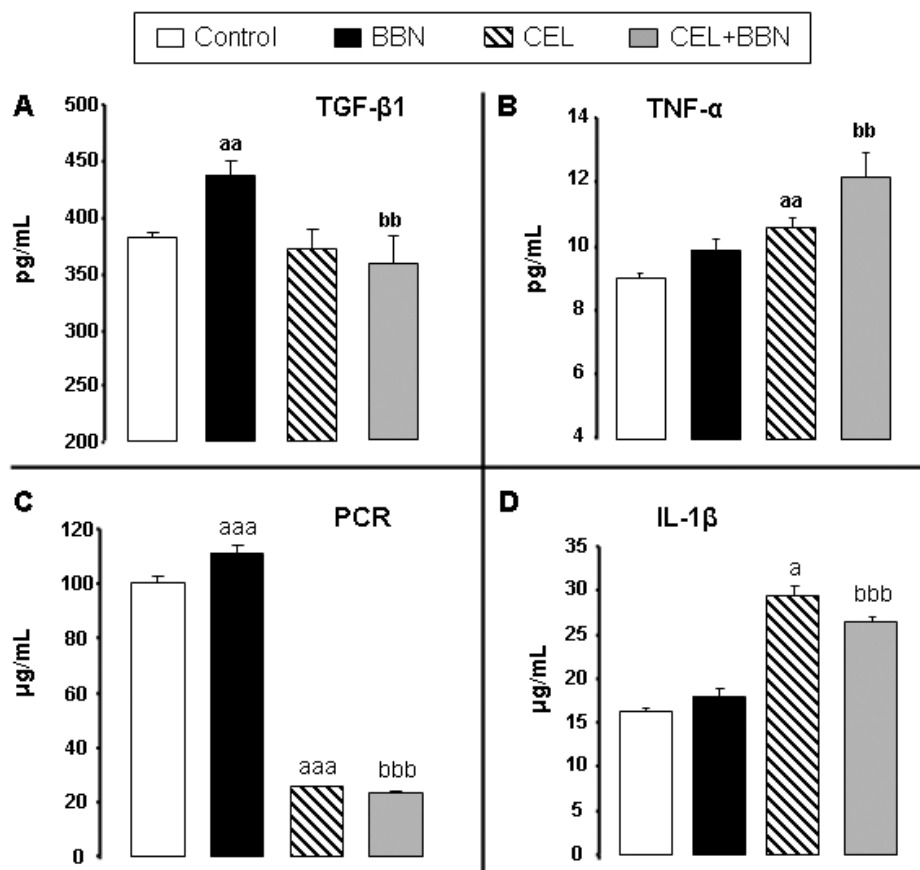


Figura 4) Marcadores de estado redox: peroxidação lipídica (MDA) hepática, renal e sanguínea (A); TAS sérico (B) e relação MDA/TAS sérico (C). a $p < 0.05$, aa $p < 0.01$ e aaa $p < 0.001$ vs grupo controlo; b $p < 0.05$, bb $p < 0.01$ e bbb $p < 0.001$ vs grupo BBN.

(21,2 mm³) e por tumor (5,3 ± 0,4 mm³), contrastando com os resultados do grupo BBN: 65% de incidência de lesões neoplásicas e 138,5 ± 7,5 e 112,5 ± 6,4 mm³ para, respectivamente, volume tumoral médio por rato e por tumor. Além disto, e mais importante, todos os outros ratos (7 em 8) apresentaram um urotélio normal, havendo apenas hipertrofia de baixo grau em 2 destes 7 ratos, representando claramente um efeito de quimioprevenção contra a carcinogénese induzida pelo BBN. Têm sido propostos vários mecanismos para explicar o desenvolvimento das células neoplásicas em diversos tipos de tumores malignos²¹⁻²³. Segundo alguns autores, o cancro da bexiga está associado à produção de factores mitogénicos e angiogénicos, tais como TGF α e VEGF²⁶. A nossa investigação suporta a hipótese de que a inflamação e proliferação são cruciais no aparecimento das neoplasias vesicais, com redução da PCR e TGF β a acompanhar a diminuição da incidência tumoral pela utilização preventiva de celecoxib. Pelo contrário, estes marcadores de inflamação e proliferação estavam significativamente aumentados no grupo carcinogénico (BBN), consistente com uma fase invasora tumoral. Relativamente aos grupos em que foi administrado celecoxib (CEL e CEL + BBN), ambos promoveram um aumento de IL-1 β e TNF α , que poderá ser interpretado como um feito contrário destes tratamentos, independentemente do processo de carcinogénese, mas relacionado com a acção anti-inflamatória. O aumento do TNF α deverá ser visto como parte do efeito anti-tumoral do celecoxib, além de outros mecanismos como a indução da apoptose²⁷, paragem do ciclo celular²⁸ ou inibição da expressão dos receptores dos peroxissomas²⁰, que controlam a expressão da COX-2. No nosso estudo, o impacto positivo da inibição selectiva da COX-2 na prevenção dos tumores vesicais está, também, relacionado com uma influência benéfica no estado redox. No grupo carcinogénico, o aparecimento tumoral e a sua progressão parecem ser independentes do defeito entre formação de espécies reactivas e conteúdo anti-oxidativo, porque os marcadores de peroxidação lipídica (MDA) séricos, hepáticos e renais se mantiveram inalterados, quando comparados com os controlos animais. Estes resultados são contrários ao aumento dos valores de MDA encontrados em humanos com carcinomas de células de transição, que está relacionado com a fase tumoral, bem como com o envolvimento renal no stress oxidativo e com a inflamação crónica, no desenvolvimento das células neoplásicas. A nossa investigação mostrou um efeito anti-oxidativo no grupo BBN, provavelmente como resposta à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que, apesar de tudo, se mantiveram em níveis normais. Apesar da menor influência da formação de ROS no processo de carcinogénese, o efeito positivo de celecoxib parece estender-se ao estado redox, dada

a marcada alteração da capacidade anti-oxidativa do fígado, rim e sangue.

A dose utilizada de celecoxib foi mais baixa que a descrita por outros autores em trabalhos semelhantes¹⁷, pelo que encontramos uma taxa reduzida de efeitos secundários, nomeadamente na função renal. Constatamos, pelo contrário, um efeito benéfico nos parâmetros hematológicos e da função hepática e o aumento dos parâmetros da função renal poderão resultar da inibição da COX-2 nos prostanóides urinários. Quando utilizámos celecoxib isoladamente, não houve alteração relevante dos parâmetros da função renal, sugerindo que o aumento verificado no grupo CEL + BBN poderá resultar da combinação de ambos os tratamentos, carcinogénico e fármaco.

A natureza faseada da carcinogénese permite uma oportunidade de intervenção com vários tipos de fármacos em mecanismos específicos envolvidos na iniciação, promoção e progressão tumorais. A inflamação, proliferação e stress oxidativo têm um papel determinante na carcinogénese vesical. De acordo com alguns autores, a formação de COX-2 depende do estadiamento tumoral, tendo uma acção pré-neoplásica e encontra-se particularmente elevado nas fases mais avançadas^{29,30}. Demonstramos neste estudo que a utilização de um inibidor selectivo da COX-2 na fase de iniciação tumoral, ou mesmo mais precocemente, como quimioprevenção, tem um efeito notável no aparecimento e progressão neoplásicos, que poderá ser de particular utilidade em doentes de alto risco ou em doentes tratados por um tumor vesical e com alto risco de recidiva.

Conclusões

O nosso estudo demonstrou que o tratamento com celecoxib tem um efeito inibitório importante nos tumores vesicais em ratos, que deverá ser resultado das suas propriedades anti-inflamatórias, bem como de mecanismos não dependentes directamente da inibição da COX-2, como o controlo da proliferação celular e melhoria do perfil antioxidativo. Estes resultados apoiam uma estratégia de quimioprevenção das neoplasias vesicais baseada na inibição da COX-2.

Conflitos de Interesse

Todos os autores declaram que participaram no corrente trabalho e se responsabilizam por ele. Declaram, ainda, que não existem, da parte de qualquer um deles, conflitos de interesse nas afirmações proferidas no presente artigo.

Bibliografia

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.

2. Grasso M. Bladder cancer: A major public health issue. *Eur Urol Suppl* 2008;7:510-5.
3. Sangar VK, Ragavan N, Matanheleia SS, et al. The economic consequences of prostate and bladder cancer in UK. *BJU Int* 2005;95:59-63.
4. Malkowics SB, van Poppel H, Soloway MS, et al. Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2007;69:3-16.
5. Evans C, Debruyne F, Payne H. Bladder cancer: management and future directions. *Eur Urol Suppl* 2007;6:365-73.
6. Shariat SF, Kim JH, Ayala GE, et al. Cyclooxygenase-2 is highly expressed in carcinoma in situ and T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Jour Urol* 2003;3:938-42.
7. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000;66:4-34.
8. Wolff DJ. The genetics of bladder cancer: a cytogeneticist's perspective. *Cytogenet Genome Res* 2007;118:177-81.
9. Harris RE. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inflammogenesis of cancer. *Sub-cellular Biochemistry* 2007;42:93-126.
10. Montironi R, Mazzucchelli R. Preneoplastic lesions and conditions of the urinary bladder. *EAU Update Series* 2003;1:53-63.
11. Kam PC, See AU. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 2000;55:442-9.
12. Kitayama W, Denda A, Okajima E, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in rat urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Carcinogenesis* 1999;12:2305-10.
13. Fukushima S, Hirose M, Tsuda H, et al. Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 1976;67:81-90.
14. Sauter G, Algaba F, Amin S, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs Lyon IARCC Press 2004:29-34.
15. Hattori K, Iida K, Joraku A, et al. Chemopreventive effects of cyclo-oxygenase-2 inhibitor and epidermal growth factor-receptor kinase inhibitor on rat urinary bladder carcinogenesis. *BJU Int* 2006;97:133-41.
16. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, et al. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007;121:2381-6.
17. Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, et al. Celecoxib inhibits N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder cancers in Male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *Cancer Res* 2000;60:5599-602.
18. DeGortari AE, Han C, Glickman LT. Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:221-6.
19. Okagima E, Denda A, Ozono S, et al. Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Res* 1998;58:3028-31.
20. Suleyman H, Demircan B, Karagoz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharm Reports* 2007;59:247-58.
21. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *Jour Biol Chem* 2000;15:11397-403.
22. Song X, Lin HP, Johnson AJ, et al. Cyclooxygenase-2, payer or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cells. *Jour Nat Canc Inst* 2002;8:585-91.
23. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *Jour Urol* 2000;3:820-25.
24. Narayan BA, Condon MS, Bosland MC, et al. Suppression of N-methyl-N-nitrosurea/testosterone-induced rat prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanism. *Clin Canc Res* 2003;9:3503-13.
25. Vital-Reyes V, Rodríguez-Burford C, Chhieng DC, et al. Celecoxib inhibits cellular growth, decreases Ki-67 expression and modifies apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Arch Med Res* 2006;6:689-95.
26. Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: impact on recurrence, survival and TGFalpha and VEGF as end-point biomarkers. *Cancer Biol Ther* 2008;7:92-100.
27. Gee J, Lee II, Jendiroba D, Fischer SM, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer. *Oncol Rep* 2006;15:471-7.
28. Mohammed SI, Dhawan D, Abraham S, et al. Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Mol Cancer Ther* 2006;5:329-36.
29. Young I, Cha, DuBois RN. NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Ann Rev Med* 2007;58:239-52.
30. Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res* 1999;59:5647-50.