

# Eficácia da atorvastatina na quimioprevenção da carcinogénese vesical num modelo experimental: Propriedades anti-oxidantes, anti-proliferativas e anti-inflamatórias

*Chemopreventive Efficacy of Atorvastatin in a Rat Model of Bladder Cancer: Antioxidant, Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Properties*

## Autores

Lilian Campos<sup>1</sup>, Belmiro Parada<sup>2,5</sup>, Flávio Reis<sup>5</sup>, José Sereno<sup>5</sup>, Pedro Nunes<sup>2</sup>, Alfredo Mota<sup>4,5</sup>, Arnaldo Figueiredo<sup>3,5</sup>, Frederico Teixeira<sup>5</sup>

## Instituições

- <sup>1</sup> Interna Complementar do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, EPE
- <sup>2</sup> Assistente Hospitalar do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, EPE
- <sup>3</sup> Assistente Hospitalar Graduado do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, EPE
- <sup>4</sup> Chefe de Serviço do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, EPE
- <sup>5</sup> Investigadores do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## Correspondência

Lilian Campos  
Serviço de Urologia e Transplantação Renal; Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, EPE  
Avenida Bissaya Barreto, 3000-075 COIMBRA, Portugal  
E-mail: lilianencampos@gmail.com

Data de Submissão: 10 de dezembro de 2013 | Data de Aceitação: 17 de abril de 2013

## Resumo

**Objetivos:** Avaliar os efeitos anti-carcinogénicos da atorvastatina (Atorva) num modelo experimental de rato de carcinogénese vesical induzido por N-butyl-N-(4-hydroxibutyl)nitrosamina (BBN) a 0,05% e avaliar a importância da inflamação, proliferação e *stress* oxidativo no crescimento tumoral e sua prevenção.

**Métodos:** Quarenta e quatro ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: (1) Controlo: veículo; (2) Atorva: atorvastatina 3 mg/kg/dia; (3) Carcinogénio: BBN (0,05%); (4) Prevenção: atorvastatina 3 mg/kg/dia + BBN. Utilizou-se um protocolo em duas fases, no qual o fármaco e o carcinogénio foram administrados entre as semanas 1 e 8 e o desenvolvimento tumoral ou quimioprevenção aconteceram entre as semanas 9 e 20. Nesta fase, as bexigas foram extraídas para avaliação macroscópica, histológica e imunohistoquímica (p53, ki67, CD31). Estudaram-se os marcadores inflamatórios, de proliferação e estado oxidativo séricos.

**Resultados:** A incidência de carcinoma vesical foi: Controlo - 0% (0/8); Atorva - 0% (0/8); Carcinogénio - 65% (13/20) e Prevenção - 12,5% (1/8). O número e o volume médio tumoral foram significativamente inferiores no grupo Prevenção, com uma redução marcada das lesões de hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ*. Um perfil anti-proliferativo, anti-inflamatório e anti-oxidante foi observado no grupo Prevenção. A marcação imunohistoquímica p53 e ki67 estava claramente aumentada no grupo Carcinogénio e diminuída no grupo Prevenção. Sem diferenças na expressão de CD31.

**Conclusões:** A atorvastatina 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 na atorvastatina.

**Palavras-chave:** Tumor vesical; quimioprevenção; atorvastatina; anti-oxidante; anti-inflamatório.

### Abstract

**Purpose:** To evaluate the anticarcinogenic effects of Atorvastatin (Atorva) on a rat model with urinary bladder carcinogenesis induced by 0.05% of N-butyl-N-(4-hydroxibutyl)nitrosamine (BBN), and assess the relevance of inflammation, proliferation and oxidative stress in tumor growth and its prevention.

**Methods:** Forty-four male Wistar rats were divided into four groups: (1) Control: vehicle; (2) Atorva: atorvastatin 3 mg/kg bw/day; (3) Carcinogen: BBN (0.05%); (4) Preventive: atorvastatin 3 mg/kg bw/day + BBN. A two phase protocol was used, in which the drug and the carcinogen were given between week 1 and 8 and tumor development or chemoprevention were expressed between week 9 and 20. At this phase, the urinary bladders were collected for macroscopic, histological and immunohistochemical (p53, ki67, CD31) evaluation. Serum was assessed for markers of inflammation, proliferation and redox status.

**Results:** The incidence of vesical carcinoma was: Control 0/8 (0%); Atorva 0/8 (0%); Carcinogen 13/20 (65%) and Preventive 1/8 (12.5%). The number and volume of tumors were significantly lower in the Preventive group, with a marked reduction in hyperplasia, dysplasia and carcinoma in situ lesions. An anti-proliferative, anti-inflammatory and antioxidant profile was also observed in the Preventive group. p53 and ki67 immunostaining were significantly increased in the BBN-treated rats, which was prevented in the Preventive group. No differences were found for CD31 expression.

**Conclusions:** Atorvastatin demonstrated an inhibitory effect on urinary bladder cancer development, probably due to its antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory properties. This data supports a role of cancer chemoprevention strategies based on Atorvastatin.

**Keywords:** Bladder cancer; chemoprevention; atorvastatin; antioxidant; anti-inflammatory

### Introdução

Nos países desenvolvidos, o carcinoma da bexiga é a quarta causa mais comum de neoplasia nos homens e a oitava nas mulheres, correspondendo a 5-10% de todas as neoplasias do sexo masculino.<sup>1</sup> O carcinoma da bexiga constitui um importante problema médico, não só pela elevada incidência e prevalência, mas também pelos custos sócio-económicos associados à sua morbilidade.<sup>2,3</sup> Apesar de um adequado tratamento e seguimento, esta neo-

plasia tem uma alta taxa de recidiva e o prognóstico, à exceção das formas superficiais, é desfavorável.<sup>1,3,4</sup> Apesar dos esforços investidos no diagnóstico precoce e das melhorias nos cuidados de saúde, as taxas de mortalidade nos casos de tumor vesical músculo-invasivo são muito elevadas.<sup>5</sup> Neste contexto, as estratégias preventivas adquirem uma importância crescente na abordagem do carcinoma da bexiga. Para a identificação de fármacos úteis em quimioprevenção é fundamental um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e crescimento tumorais.

Os principais fatores de risco conhecidos associados ao tumor vesical incluem o fumo de tabaco, presente em mais de 50% dos casos diagnosticados no sexo masculino<sup>3,6</sup>, e a exposição a carcinógenos ocupacionais, em particular as aminas aromáticas e os hidrocarbonetos policíclicos.<sup>6,7</sup> Além destes fatores exógenos e alguns fatores genéticos já caracterizados<sup>8,9</sup>, o envolvimento de vias da inflamação, proliferação e stress oxidativo, já estudados e propostos noutros tipos de neoplasias, necessita de investigações adicionais nos carcinomas uroteliais. O modelo experimental de carcinogénese vesical induzido pelo N-butil-N-(4-hidroxi-butil) nitrosamina (BBN) em ratos é um modelo já validado no estudo do desenvolvimento desta neoplasia no homem.<sup>10</sup> Devido às semelhanças histológicas com o carcinoma urotelial humano, tem sido usado como modelo, não só para estudo da fisiopatologia tumoral, como também para avaliação da eficácia terapêutica.<sup>10-12</sup> A carcinogénese urotelial é um processo lento e contínuo, que compreende modificações moleculares e morfológicas, com várias fases que vão de lesões benignas a lesões malignas agressivas. Se fosse possível o tratamento precoce, dirigido a estas fases iniciais da carcinogénese, seria possível a prevenção do desenvolvimento e crescimento do tumor da bexiga. Estudos anteriores mostraram os efeitos benéficos de estratégias preventivas nestes tumores, incluindo estudos em que foram usados fármacos anti-inflamatórios e anti-proliferativos.<sup>14,15</sup>

Nos últimos anos, os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) reductase (estatinas) foram apontados como potenciais agentes anti-neoplásicos.<sup>16-18</sup> Além das suas propriedades anti-dislipidémicas, existem evidências de efeitos pleiotróficos destes fármacos, tais como anti-inflamatórios, anti-proliferativos, anti-oxidantes e anti-apoptóticos.<sup>19</sup> Estas propriedades podem ter um papel importante na prevenção do tumor da bexiga<sup>23</sup>, particularmente se considerarmos que estas vias estão sobre-reguladas neste tipo de neoplasia.<sup>14,15</sup> A eficácia da quimioprevenção das estatinas já foi demonstrada noutros tipos de tumor, no-

meadamente carcinomas prostático e pancreático, resultando numa diminuição do crescimento tumoral e/ou inibição do desenvolvimento de metástases.<sup>24, 25</sup> Contudo, a sua ação no cancro da bexiga continua por provar e investigações adicionais têm de ser realizadas.

Considerando o efeito benéfico das estatinas na redução do risco cardiovascular devido ao efeito anti-colesterolémico, o possível impacto positivo na prevenção do cancro da bexiga seria mais uma vantagem, que se poderá traduzir em melhorias médica e sócio-económica significativas, principalmente em pacientes que partilhem múltiplos fatores de risco. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a potencial eficácia preventiva da atorvastatina na carcinogénese vesical, utilizando um modelo experimental de rato.

## Material e Métodos

### 1. Animais e grupos

Quarenta e quatro ratos Wistar (Charles River Lab. Inc., Barcelona, Espanha), de 10 semanas de idade, com 250 gramas, foram mantidos numa sala climatizada, sujeitos a ciclos de 12 horas de luz diárias, ração de manutenção (IPM-R20, Leticia, Barcelona, Espanha) e acesso à água *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) grupo Controlo (n=8) – veículo; (2) grupo Atorva (Atorvastatina) (n=8) – 3 mg/kg/dia de atorvastatina (Zarator®, Laboratórios Pfizer, S.a., Lisboa, Portugal); (3) grupo Carcinogénio (BBN) (n=20) – 0,05% de N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Toquio, Japão); (4) grupo Prevenção (Atorva + BBN) (n=8). Os tratamentos foram efetuados em duas etapas: um primeiro período de oito semanas para indução tumoral e tratamento farmacológico (grupos Carcinogénio e Prevenção receberam BBN a 0,05% e acesso livre a água, enquanto os grupos Atorva e Prevenção receberam atorvastatina) e um segundo período de doze semanas para expressão ou prevenção tumorais. O BBN foi administrado por diluição na água e a atorvastatina foi introduzida 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.

### 2. Colheita e preparação de amostras

**2.1 Sangue.** Antes de serem sacrificados, 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 cetamina (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.

**2.2 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, injetou-se solução de formaldeído dentro da bexiga como pré-fixação para análise histológica.

### 3. Análise de prevenção tumoral

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

**3.2 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 secções de 3µm foram coradas em hematoxilina-eosina (H&E) e examinadas histologicamente pela mesma patologista. As lesões tumorais foram fixadas e analisadas individualmente.

### 4. Marcadores de proliferação, inflamação e estado redox

Os níveis séricos de fator de transformação de crescimento beta-1 (TGFβ1) e de fator de necrose tumoral alfa (TNFβα) foram medidos recorrendo a kits ultrasensíveis de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A proteína C reativa sérica (PCR) foi medida usando um kit de ELISA da Helica Biosystems, Inc., (Fullerton, CA, EUA). Foram usados os comprimentos de onda de leitura e de correção de 450 e 540 nm, respectivamente, e os valores medidos num leitor de microplacas de Elisa Anthos Labtec LP 400, Sanofi - Diagnostics Pasteur Lda., Amadora, Portugal. As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBAR) foram utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica sérica, nomeadamente malondialdeído (MDA). O estado antioxidante sérico total (TAS) foi avaliado através de ensaio antioxidante redutor de ferro (FRAP).

### 5. Imunohistoquímica p53, ki67 e CD31

O estudo imunohistoquímico foi realizado em fragmentos de tecido tumoral vesical embebidos em parafina, com secções de 4mm de espessura. Para cada caso, foi selecionado um fragmento representativo para fixação e avaliação histológica.

Os fragmentos foram deparafinados e hidratados com água. A fixação do antigénio foi realizada através de um pré-tratamento com aquecimento em micro-ondas com um tampão citrato, pH 6,00 (durante 3 pulsos de 5 minutos, a 250W cada). Os fragmentos foram lavados três vezes, 2 minutos cada, e posteriormente incubados com soro de bloqueio durante 10 minutos para bloquear as ligações inespecíficas, e o excesso de soro de bloqueio foi removido. Na marcação imunohistoquímica, pela técnica estreptavidina-biotina-peroxidase, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: M 7248 (DakoCystomation), MS-04-PO (Neomarkers-Labvision) e WM 59 (Abcam), para avaliar a imunexpressão dos antigénios Ki-67, p53 e CD31, respetivamente. Um controlo positivo apropriado foi usado em cada coloração e cada fragmento foi corado com um controlo negativo obtido pela omissão do anticorpo primário. Na visualização dos fragmentos utilizou-se uma escala semi-quantitativa (1-3) para avaliação da intensidade e percentagem de fixação imunohistoquímica das células no padrão dominante no tumor. Todos os fragmentos foram avaliados por dois investigadores, de forma independente e cega. Para a observação das lâminas recorreu-se a um microscópico Nikon<sup>TM</sup> Optiphot, com cabeça múltipla, permitindo a observação simultânea de dois ou mais observadores, com ocular 10X e objetivas 4X, 10X, 20X e 40X.

## 6. Análise bioquímica / Perfil de segurança

Os doseamentos séricos de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinino-quinase (CK) foram avaliados por métodos e equipamentos validados (Hitachi 717 analyser, Roche Diagnostics Inc., MA, EUA).

## 7. Análise estatística

Utilizámos o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA), versão 16.0.

As variáveis contínuas foram apresentadas sob a forma de média  $\pm$  desvio-padrão e as variáveis categóricas como percentagens. A comparação entre grupos foi realizada utilizando o teste de ANOVA com Bonferroni ou o teste de Fisher *post-hoc*. A significância estatística foi definida por  $p < 0,05$ .

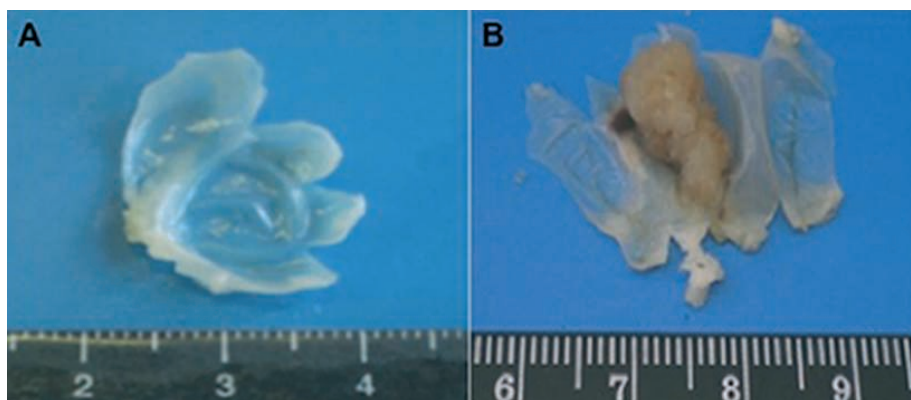
## Resultados

### 1. Desenvolvimento e crescimento tumoral

Os grupos avaliados não evidenciavam alterações relevantes relativamente ao peso corporal e consumo de bebida. Pulmões, estômago, fígado, rins e intestinos apresentavam-se macroscópica e histologicamente normais, confirmando a especificidade deste modelo para a carcinogénese vesical.

**1.1 Avaliação macroscópica.** Todas as bexigas do grupo Controlo revelaram um padrão normal, sem sinais de malignidade (Figura 1A). Foram encontradas características idênticas no grupo Atorva, com a presença de órgãos finos, translúcidos e sem alterações da vascularização ou lesões anómalas no seu interior. Por outro lado, no grupo Carcinogénio, 65% (n=13) dos ratos tiveram tumores vesicais macroscópicos, alguns de volume importante (Figura 1B). As paredes vesicais encontravam-se muito mais espessadas no grupo Carcinogénio que no grupo Controlo, com neovascularização. No grupo Prevenção, à exceção de um caso, as bexigas apresentaram um padrão semelhante às do grupo Controlo, ou seja, sem sinais de anomalias. A bexiga alterada apresentava duas pequenas lesões tumorais.

**1.2 Avaliação quantitativa.** Não houve desenvolvimento de neoplasia vesical em nenhum rato do grupo Controlo. No grupo Carcinogénio foram detetados 16 tumores em 13 ratos (média de  $1,2 \pm 0,1$  tumores por rato com tumor). O volume tumoral médio por rato com neoplasia foi de  $138,5 \pm 7,5 \text{ mm}^3$  e o volume tumoral médio por tumor foi de  $112,5 \pm 6,4 \text{ mm}^3$ . No grupo Prevenção, um (12,5%) dos 8 ratos tinha 2 tumores com um volume global



**Figura 1** Avaliação macroscópica das bexigas: (A) Controlo; (B) Carcinogénio (BBN).

MACROSCOPIA	Controlo (n=8)	Atorva (n=8)	Carcinogénio (n=20)	Prevenção (n=8)		
Nº de tumores	0	0	65,0% (13/20)	12,5% (1/8)		
% ratos com tumor	0	0	1,2 ± 0,1 (16/13)	2,0 (2/1)		
Nº tumores/rato						
Volume tumor (mm <sup>3</sup> )						
Média/rato	0	0	138,5 ± 7,5 (em 13)	4,7 (em 1)		
Média/tumor	0	0	112,5 ± 6,4 (em 16)	2,3 ± 0,2 (em 2)		
MICROSCOPIA	Controlo	Atorva	Carcinogénio	Prevenção	Grupo	Grupo
			Grupo	Grupo	Grupo	Grupo
			Tumores	Total	Tumores	Total
Lesões pré-neoplásicas						
Hiperplasia	0	0	100 (13/13)	100 (20/20)	100 (1/1)	38 (3/8)
Displasia alto grau	0	0	100 (13/13)	75 (15/20)	100 (1/1)	13 (1/8)
Displasia baixo grau	0	0	0 (0/13)	25 (5/20)	0 (0/1)	25 (2/8)
Lesões neoplásicas						
Tumor papilar	0	0	100 (13/13)	65 (13/20)	100 (1/1)	13 (2/8)
Tumor infiltrativo	0	0	15 (2/3)	10 (2/20)	0 (0/1)	0 (0/8)
CIS	0	0	31 (4/13)	20 (4/20)	0 (0/1)	0 (0/8)

Tabela I) Avaliação macroscópica e microscópica das lesões uroteliais.

de 4,7mm<sup>3</sup> e um volume médio por tumor de 2,3 ± 0,2. (Tabela I)

**1.3 Avaliação qualitativa.** A avaliação histológica do grupo Controlo e Atorva mostrou padrões normais (Figuras 2A), sem sinais de lesões pré-neoplásicas (hiperplasia e displasia). No grupo Carcinogénio ocorreu transformação maligna evidente, incluindo hiperplasia e displasia em todos os animais, mesmo nos que não apresentavam lesões tumorais macroscópicas; e lesões malignas papilares, infiltrativas e carcinoma *in situ* (CIS) (Figura 2B, 2C e 2D). A utilização de atorvastatina no grupo Prevenção preveniu notoriamente o aparecimento e desenvolvimento tumorais. Apenas a bexiga de 1 dos 8 ratos deste grupo (12,5%) desenvolveu tumor: duas lesões papilares. Este urotélio apresentava ainda hiperplasia e displasia, sem lesões infiltrativas ou CIS. Nos restantes animais é de referir ape-

nas, a presença de hiperplasia num dos casos (Tabela I).

## 2. Perfil proliferativo, inflamatório e estado redox

No grupo Carcinogénio verificou-se um aumento significativo do TGFβ1 ( $p < 0,01$ ) e da PCR séricos ( $p < 0,001$ ), comparativamente ao grupo Controlo. O valor sérico do TNFα não variou entre os grupos Carcinogénio e Controlo, apesar de se ter verificado uma tendência para valores mais elevados no grupo Carcinogénio. Comparativamente ao grupo Controlo, o grupo Atorva apresentava concentrações inferiores de TGFβ1 e PCR ( $p < 0,001$ ), sem alteração do TNFα. No grupo Prevenção, o aumento de TGFβ1 e PCR induzido pelo BBN, foi prevenido ( $p < 0,001$ ) e verificou-se uma redução do TNFα ( $p < 0,001$ ).

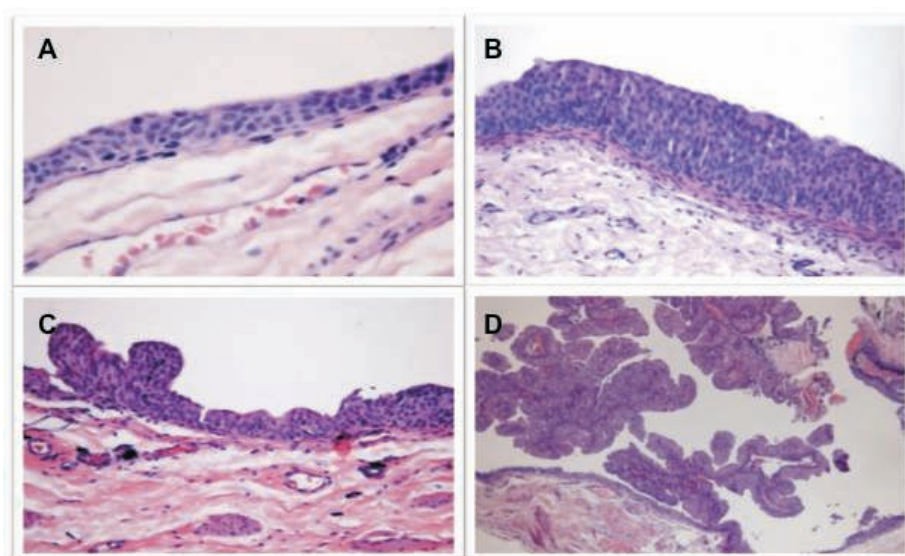
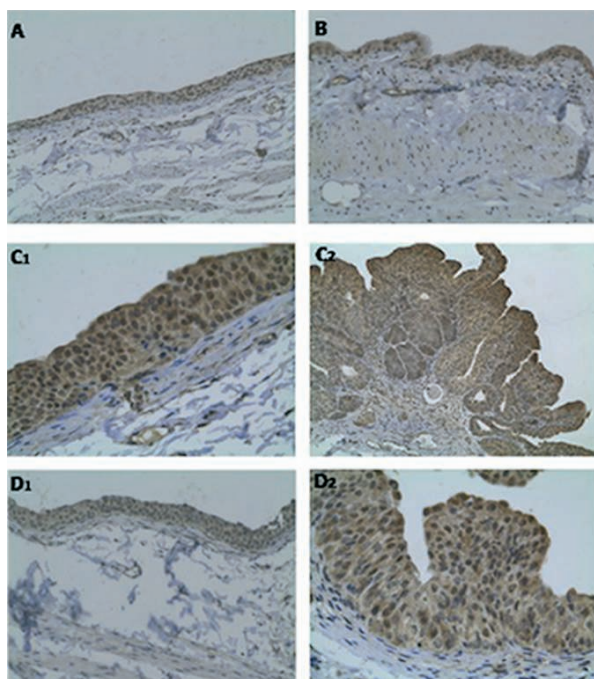
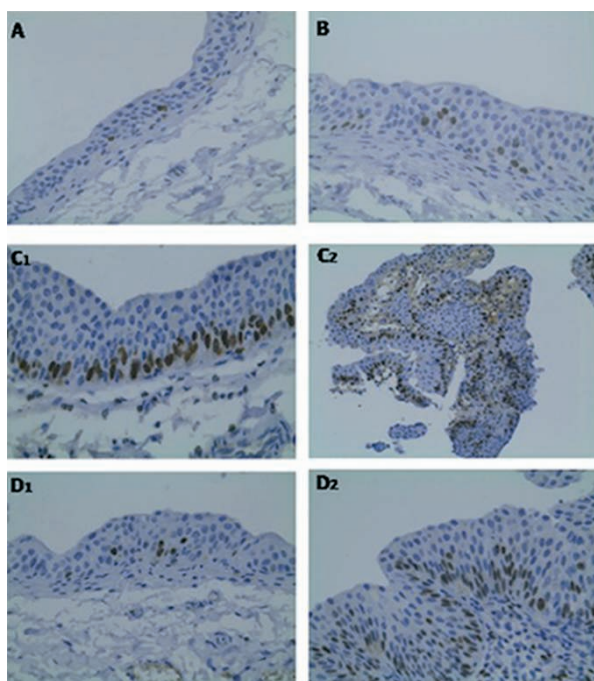


Figura 2) Avaliação microscópica das bexigas: (A) Urotélio normal; (B) Hiperplasia; (C) Tumor papilar; (D) Carcinoma de alto grau. H & E (100x).



**Figura 3** Imunohistoquímica p53 dos tumores da bexiga: (A) Controlo; (B) Atorva; (C1 e C2) BBN; (D1 e D2) Prevenção (Atorva + BBN). 100× (A, B e D1) e 200× (C1, C2 e D2).



**Figura 4** Imunohistoquímica ki67 dos tumores da bexiga: (A) Controlo; (B) Atorva; (C1 e C2) BBN; (D1 e D2) Prevenção (Atorva + BBN); 100× (A, C2 e D1) e 200× (B, C1 e D2).

Apesar de não ser estatisticamente significativo, a concentração sérica do MDA mostrou uma tendência para valores mais elevados no grupo Carcinogénio quando comparado com o grupo Controlo, o que foi acompanhado por um aumento ( $p < 0,05$ ) no estado antioxidante total (TAS). A relação MDA/TAS, um marcador de balanço oxidativo, permaneceu inalterada. No grupo Atorva, enquanto o

MDA sérico mostrou uma tendência para concentrações elevadas, verificou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na relação MDA/TAS quando comparado com o grupo Controlo. Semelhante proteção antioxidante sérica foi demonstrada no grupo Prevenção, no qual se verificaram valores de TSA mais elevados ( $p < 0,01$ ) e valores inalterados de MDA, resultando numa relação MDA/TAS significativamente reduzida ( $p < 0,05$ ), elucidativo de um perfil antioxidante.

### 3. Imunohistoquímica p53, ki67 e CD31

As bexigas dos grupos Controlo e Atorva não apresentavam imunofixação para p53 (Figura 3A e 3B, respetivamente). Contudo, no grupo Carcinogénio, ambas as lesões hiperplásicas e tumorais evidenciaram elevada expressão p53 (50-75%/2+) (Figura 3C<sub>1</sub> e 3C<sub>2</sub>, respetivamente). No grupo Prevenção, as bexigas com urotélio normal mostraram uma fixação imunohistoquímica de intensidade idêntica às bexigas do grupo Controlo (Figura 3D<sub>1</sub>). Nesse grupo, na bexiga com carcinoma, observou-se uma expressão p53 mais intensa (50%/1+) (Figura 3D<sub>2</sub>) do que no mesmo grupo sem tumor, mas menos intensa do que no grupo Carcinogénio.

Em relação à expressão do ki67, verificou-se uma baixa percentagem de imunofixação deste em ambos os grupos Controlo e Atorva (1-2%/1+) (Figura 4A e 4B, respetivamente). Pelo contrário, no grupo Carcinogénio, as lesões hiperplásicas apresentaram elevada percentagem de imunofixação (15%/2+) (Figura 4C<sub>1</sub>), que foi ainda superior nas lesões tumorais (25%/3+) (Figura 4C<sub>2</sub>). O efeito preventivo da atorvastatina manifestou-se pela reduzida imunofixação ki67 no grupo Prevenção: 1-2%/1+ (Figura 4D<sub>1</sub> e 4D<sub>2</sub>, respetivamente).

Não foram encontradas diferenças na expressão CD31 (PECAM-1) nos grupos estudados.

### 4. Análise bioquímica

No grupo Carcinogénio verificou-se que os marcadores de função renal (creatinina e ureia) permaneceram inalterados. O parâmetro de função hepática AST apresentou-se significativamente aumentado ( $p < 0,01$ ), e verificou-se uma tendência para valores elevados de CK comparativamente com o grupo Controlo (Tabela II). No grupo Atorva, comparando com o Controlo, verificou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da atividade da CK. No grupo Prevenção, os marcadores de função renal não se alteraram, mas verificou-se um aumento da AST, ALT e CK ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respetivamente), quando comparados com o grupo Carcinogénio.

Parâmetros	Controlo (n=8)	Atorva (n=8)	Carcinogénio (n=20)	Prevenção (n=8)
Função renal				
Creatinina (µmol/L)	50,39 ± 0,88	56,57 ± 0,88	54,81 ± 1,77	59,23 ± 3,54
Ureia (mmol/L)	6,40 ± 0,31	5,99 ± 0,32	6,27 ± 0,16	6,85 ± 0,24
Função hepática				
AST (UI/L)	51,57 ± 1,09	54,00 ± 2,31	76,78 ± 4,40 <sup>aa</sup>	111,25 ± 5,72 <sup>bb</sup>
ALT (UI/L)	30,86 ± 1,75	31,00 ± 1,00	36,17 ± 2,32	53,43 ± 6,10 <sup>b</sup>
Atividade CK (U/L)	165,80 ± 14,60	697,67 ± 59,22 <sup>a</sup>	231,88 ± 8,22	1132,17 ± 206,39 <sup>bb</sup>

<sup>a</sup> p<0,05 e <sup>aa</sup> p<0,001 vs. Grupo Controlo; <sup>b</sup> p<0,01 e <sup>bb</sup> p<0,001 vs. Grupo BBN

Tabela II) Perfil de segurança: função renal e hepática e atividade da creatinina quinase.

## Discussão

Nos últimos anos, as estatinas têm sido apontadas como potenciais agentes anti-neoplásicos<sup>16-18</sup>, particularmente devido aos seus efeitos pleotrópicos<sup>19</sup>. Além do seu comprovado efeito anti-colesterolémico, as propriedades quimiopreventivas deste fármaco têm sido alvo de vários estudos, com resultados promissores em vários tipos de cânceres<sup>24-27</sup>. Contudo, a investigação da eficácia da atorvastatina na prevenção do carcinoma da bexiga é praticamente inexistente<sup>28</sup>.

Os doentes idosos e com dislipidémia têm uma incidência elevada de neoplasias vesicais. A hiperlipidémia não tratada está associada não só a um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma da bexiga<sup>29</sup>, como também a formas mais agressivas<sup>30</sup>. Assim, se for possível provar o seu efeito anti-neoplásico, o uso preventivo de estatinas terá um duplo benefício, prevenindo a hipercolesterolemia e o cancro, nomeadamente o vesical.

O achado mais importante no nosso estudo, não evidenciado previamente em nenhum modelo animal (ou nos humanos), foi que o crescimento tumoral é inibido pelo tratamento com atorvastatina. A incidência tumoral nos animais do grupo Prevenção, bem como o volume tumoral médio por tumor, contrastam com os resultados do grupo Carcinogénio. Além disto, com exceção do único rato com tumor, cujo urotélio também apresentava hiperplasia e displasia de baixo grau, todos os outros ratos do grupo Prevenção apresentaram um urotélio normal (um caso evidenciava hiperplasia de baixo grau). A hiperplasia e displasia urotelial, induzida pelo carcinogénio, presente em todos os animais tratados com BBN, encontravam-se significativamente reduzidas no grupo Atorva, verificando-se também uma prevenção absoluta de tumores infiltrativos e CIS. Estes resultados sugerem que a atorvastatina é eficaz na quimioprevenção do tumor macroscópico e seu crescimento e também no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas.

Não obstante este efeito quimiopreventivo ter sido obtido com doses de atorvastatina que podem ser

consideradas baixas em estudos animais (considerando as diferenças farmacocinéticas com os humanos), doses semelhantes foram utilizadas em estudos recentes<sup>31-33</sup>, reforçando, assim, estes promissores resultados. Contudo, investigações futuras deverão confirmar as concentrações séricas do fármaco obtidas, no sentido de avaliar a sua eficácia no carcinoma da bexiga em humanos.

Excetuando o aumento esperado na atividade da CK e alguma deterioração dos marcadores de função hepática (AST e ALT), que podem ser efeito da amplificação dos efeitos anti-carcinogénios, o tratamento com a atorvastatina (particularmente em baixas doses) mostrou-se seguro. No entanto, a elevação da CK e das enzimas hepáticas levanta alguma preocupação acerca do perfil de segurança deste fármaco e mais estudos terão de ser realizados no sentido de avaliar se doses ainda mais baixas de atorvastatina poderão ser utilizadas no modelo animal com manutenção da sua eficácia na quimioprevenção. Apesar disso, o perfil de segurança das estatinas aplicadas no contexto clínico já está bem documentado, o que confere uma clara vantagem a este fármaco como potencial agente anti-neoplásico. Vários ensaios clínicos demonstraram que as estatinas são relativamente bem toleradas, sendo os principais efeitos secundários, como os sintomas gastro-intestinais, níveis alterados de enzimas hepáticas, mialgia e/ou miosite, pouco frequentes.<sup>34</sup>

Vários mecanismos celulares/moleculares foram propostos para explicar as propriedades anti-neoplásicas desde grupo de compostos, nomeadamente noutras neoplasias como o cancro da próstata e do pâncreas, incluindo ações a nível do ciclo celular, indução de apoptose e supressão do crescimento.<sup>35-37</sup> Considerando que podem existir outras contribuições relevantes como a modulação das proteínas Ras e Rho pela depleção do mevalonato induzida pelas estatinas<sup>38,39</sup>, o nosso estudo sugere que a atorvastatina é capaz de promover a prevenção do cancro pelo efeito anti-proliferativo, anti-inflamatório e anti-oxidante. Os níveis séricos de TGFβ1, TNFα e PCR estão muito reduzidos

quando comparados com o grupo Carcinogénio. O efeito anti-proliferativo da atorvastatina já tinha sido demonstrado em duas linhas celulares de carcinoma de células de transição humano (RTA4 e KU-7)<sup>28</sup>, e num modelo de rato de carcinoma hepático<sup>40</sup>. As estatinas têm um efeito anti-inflamatório em vários tecidos através da sua ação em vias de ativação dos recetores nucleares PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*), que regulam importantes funções celulares, como o catabolismo glucídico e lipídico, diferenciação celular, proliferação e sobrevivência<sup>41-43</sup>. Os PPARs são encarados como um alvo terapêutico promissor no carcinoma da bexiga<sup>44</sup>. Além deste efeito, a ação das estatinas, nomeadamente da atorvastatina, parece ser sinergicamente aumentada pelos inibidores da ciclooxigenase (COX)<sup>45</sup>, que também se mostraram eficazes na prevenção do carcinoma da bexiga num estudo anterior do nosso grupo e em outros trabalhos<sup>15, 46</sup>. A nossa investigação suporta a hipótese de que a inflamação é crucial no desenvolvimento das neoplasias vesicais e a pretensa importância das estratégias preventivas baseadas na atividade anti-inflamatória, como a demonstrada pela atorvastatina no presente estudo.

CD31 é uma proteína integral de membrana de 130 kDa, também conhecida como PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), membro da superfamília das imunoglobulinas, que medeia a adesão inter-celular e é usada como marcador de angiogénese. A neo-vascularização permite ao tumor crescer e permite a entrada das células em circulação para se alojarem em outros órgãos. Esta proteína tem sido correlacionada com o grau e estadio tumoral no cancro da bexiga<sup>47</sup>. No nosso estudo, contudo, apesar de se verificar uma tendência para uma maior expressão de CD31 no grupo Carcinogénio, não se verificaram diferenças entre os grupos. O gene de supressão tumoral p53 tem um papel importante no desenvolvimento do cancro, nomeadamente na regulação da progressão e apoptose do ciclo celular em resposta a vários sinais. A inativação da via do p53 é um dos defeitos moleculares mais comuns no cancro dos humanos, incluindo o carcinoma urotelial<sup>48</sup>. Os nossos resultados confirmam esta alteração na expressão do p53 no carcinoma da bexiga, que se evidencia pelo aumento da imunofixação p53 nos ratos tratados com BBN em ambas as regiões pré-neoplásicas (hipertrofia) e neoplásicas (tumores papilares). Este efeito é claramente prevenido nos animais tratados com Atorva + BBN. Ki67 é uma proteína nuclear que se expressa em células em multiplicação, mas não em células latentes, representando uma medida de crescimento tumoral que permite que seja utilizada como índice de atividade proliferativa<sup>49</sup>. Neste trabalho, o grupo Carcinogénio

apresentava um aumento da imunofixação de ki67 nas áreas de hipertrofia e neoplasias, sugerindo um papel na proliferação tumoral no carcinoma da bexiga. O tratamento com atorvastatina preveniu este efeito, reforçando o efeito anti-proliferativo deste fármaco no carcinoma da bexiga induzido pela nitrosamina.

As ações anti-inflamatórias e anti-proliferativas da atorvastatina foram acompanhadas de uma influência benéfica no estado redox, demonstrado pelo aumento do TAS e redução da relação MDA/TAS, provavelmente indicativo da redução na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). O importante efeito anti-inflamatório, anti-proliferativo e anti-oxidante já tinha sido previamente demonstrado<sup>20-23</sup>. Considerando que estas ações são fundamentais no desenvolvimento do cancro<sup>50</sup>, e que os agentes anti-oxidantes protegem contra a morte das células da bexiga<sup>51</sup>, a inibição destas vias em fases precoces da carcinogénese parece ser crucial para prevenir o crescimento tumoral.

## Conclusões

O nosso estudo demonstrou o potencial do tratamento precoce com a atorvastatina na quimioprevenção do carcinoma da bexiga. O efeito inibitório verificado nos tumores vesicais em ratos poderá ser resultado das propriedades anti-oxidantes, anti-proliferativas e anti-inflamatórias do fármaco. Estas conclusões assumem particular importância para os doentes com fatores de risco para neoplasia vesical e para aqueles com antecedentes de várias recidivas tumorais, dada a elevada taxa de recorrência destes tumores.

Em conclusão, além do conhecido benefício cardiovascular devido à sua ação anti-dislipidémica, a atorvastatina poderá também desempenhar um papel relevante na quimioprevenção de neoplasias vesicais.

## Referências

1. Grasso, M. Bladder cancer: A major public health issue. *Eur Urol Suppl* 2008;7:510-5.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.
3. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: Epidemiology, staging, grading and diagnosis. *Urology* 2005;66:4-34.
4. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinek W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined



- analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466-77.
5. Malkowicz SB, van Poppel H, Mickisch G, et al. Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2007;69:3-16.
  6. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000;66:4-34.
  7. Kogevinas M, "t Mannetje A, Cordier S, et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Contr* 2003;14:907-14.
  8. Wolff DJ. The genetics of bladder cancer: A cytogeneticist's perspective. *Cytogenet. Genome Res* 2007;118:177-81.
  9. Pelucchi C, La Vecchia C. Alcohol, coffee, and bladder cancer risk: A review of epidemiological studies. *Eur J Cancer Prev* 2009;18:62-8.
  10. Kunze E, Schauer A, Schatt S. Stages of transformation in the development of Nbutyltransitional cell carcinomas in the urinary bladder of rats. *Z Krebsforsch Klin Onkol* 1976;87:139-60.
  11. Oliveira PA, Colaço A, de la Cruz LF, Lopes C. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Exp Oncol* 2006;28:2-11.
  12. Fukushima S, Hirose M, Tsuda H, Shirai T, Hirao K. Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-n-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 1976;67:81-90.
  13. Hameed DA, el-Metwally TH. The effectiveness of retinoic acid treatment in bladder cancer: Impact on recurrence, survival and TGF-alpha and VEGF as end-point biomarkers. *Canc Biol Ther* 2008;7:92-100.
  14. Parada B, Reis F, Figueiredo A, et al. Inhibition of bladder tumor growth by sirolimus in an experimental carcinogenesis model. *BJU Int* 2011;107:135-43.
  15. Parada B, Sereno J, Reis F, et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant profiles of selective cyclooxygenase-2 inhibition as chemoprevention for rat bladder carcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 2009;8:1615-22.
  16. Demierre MF, Higgins P, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nature* 2005;5:930-42.
  17. Brown AJ. Cholesterol, statins and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:135-41.
  18. Sassano A, Plataniias LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Lett* 2008;260:11-9.
  19. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:89-111.
  20. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: Statins as anti-inflammatory agents? *Circulation* 2004;109:18-26.
  21. Wassmann S, Laufs U, Müller K, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300-5.
  22. Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Anti-apoptotic effect of atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on cardiac myocytes through protein kinase C activation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:360-4.
  23. Dulak J, Józkwicz A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: Relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:579-94.
  24. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002;122:308-17.
  25. Hamilton RJ, Freedland SJ. Rationale for statins in the chemoprevention of prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2008;9:189-96.
  26. Calabro A, Tai J, Allen SL, Budman DR. In vitro synergism of m-TOR inhibitors, statins, and classical chemotherapy: Potential implications in acute leukemia. *Anti-cancer Drugs* 2008;19:705-12.
  27. Schmidmaier R, Simsek M, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Synergistic antimyeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anti-cancer Drugs* 2006;17:621-9.
  28. Kamat AM, Nelkin GM. Atorvastatin: A potential chemopreventive agent in bladder cancer. *Urology* 2005;66:1209-12.
  29. Kaye JA, Jick H. Statin use and cancer risk in the General Practice Research Database. *Br J Cancer* 2004;90:635-7.
  30. Kitayama J, Hatano K, Kaisaki S, Suzuki H, Fujii S, Nagawa H. Hyperlipidaemia is positively correlated with lymph node metastasis in men with early gastric cancer. *Br J Surg* 2004;91:191-8.
  31. Manickavasagam S, Ye Y, Lin Y, et al. The cardioprotective effect of a statin and cilostazol combination: Relationship to Akt and endothelial nitric oxide synthase activation. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007;21:321-30.
  32. Birnbaum Y, Lin Y, Ye Y, Merla R, Perez-Polo JR, Uretsky BF. Pretreatment with high-dose statin, but not low-dose statin, ezetimibe, or the combination of low-dose statin and ezetimibe, limits infarct size in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2008;13:72-9.
  33. Schmechel A, Grimm M, El-Armouche A, et al. Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects. *Cardiovasc Res* 2009;82:100-6.

34. Wierzbicki AS, Poston R, Ferro A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther* 2003;99:95-112.
35. Chan KKW, Oza AM, Siu LL. The statins as anti-cancer agents. *Clin Canc Res* 2003;9:10-9.
36. Bababeygy SR, Polevaya NV, Youssef S, et al. HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. *Anticancer Res* 2009;29:4901-8.
37. Jánosi J, Sebestyén A, Bocsi J, et al. Mevastatin-induced apoptosis and growth suppression in U266 myeloma cells. *Anticancer Res* 2004;24:1817-22.
38. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson S. Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumors. *Nature* 1984;309:464-6.
39. Oxford G, Theodorescu D. The role of Ras superfamily proteins in bladder cancer progression. *J Urol* 2003;170:1987-93.
40. Björkhem-Bergman L, Acimovic J, Torndal UB, Parini P, Eriksson LC. Lovastatin prevents carcinogenesis in a rat model for liver cancer. Effects of ubiquinone supplementation. *Anticancer Res* 2010;30:1105-12.
41. Jain MK, Ridker PM. Anti-inflammatory effects of statins: Clinical evidence and basic mechanisms. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:977-87.
42. Paumelle R, Staels B. Peroxisome proliferators-activated receptors mediate pleiotropic actions of statins. *Circ Res* 2007;100:1394-5.
43. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptors and cancer: Complex stories. *Nat Rev* 2004;4:61-70.
44. Mansure JJ, Nassim R, Kassouf W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bladder cancer: A promising therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 2009;8:6-15.
45. Zheng X, Cui XX, Avila GE, et al. Atorvastatin and celecoxib inhibit prostate PC-3 tumors in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2007;13:5480-7.
46. Keller JJ, Giardiello FM. Chemoprevention strategies using NSAIDs and COX-2 inhibitors. *Canc Biol Ther* 2003;2:S140-S149.
47. El Gehani K, Al-Kikhia L, Mansuri N, Syrjänen K, Al-Fituri O, Elzagheid A. Angiogenesis in urinary bladder carcinoma as defined by microvessel density (MVD) after immunohistochemical staining for Factor VIII and CD31. *Libyan J Med* 2011;6; doi:10.3402/ljm.v6i0.6016.46.
48. Goebell PJ, Groshen SG, Schmitz-Dräger BJ. International Study-Initiative on Bladder Cancer (ISBC). p53 immunohistochemistry in bladder cancer- a new approach to an old question. *Urol Oncol* 2010;28:377-88.
49. Lara PC, Rey A, Santana C, et al. The role of Ki67 proliferation assessment in predicting local control in bladder cancer patients treated by radical radiation therapy. *Radiother Oncol* 1998;49:163-7.
50. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007;121:2381-6.
51. Coyle CH, Philips BJ, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N. Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells. *Life Sci* 2008;83:12-8.
52. Piloto N, Teixeira HM, Teixeira-Lemos E, et al. Erythropoietin promotes deleterious cardiovascular effects and mortality risk in a rat model of chronic sports doping. *Cardiovasc Toxicol* 2009;9:201-10.
53. Kelsey KT, Hirao T, Schned A, et al. A population-based study of immunohistochemical detection of p53 alteration in bladder cancer. *Br J Cancer* 2004;90:1572-6.
54. Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: The role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Am J Clin Pathol* 2004;122:444-52.
55. Taylor JA III, Kuchel GA, Hegde P, et al. Null mutation for macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with less aggressive bladder cancer in mice. *BMC Cancer* 2007;7:135.