

Rute Andreia Dias do Amparo

Avaliação do efeito da Mitomicina C em células uroteliais da bexiga

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado em Análises Laboratoriais Especializadas

Porto, 2013

Rute Andreia Dias do Amparo

Avaliação do efeito da Mitomicina C em células uroteliais da bexiga

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado em Análises Laboratoriais Especializadas

Porto, 2013

Rute Andreia Dias do Amparo

Avaliação do efeito da Mitomicina C em células uroteliais da bexiga

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Análises Laboratoriais Especializadas, na área de especialização em Análise Biomédica, sob a orientação do Prof. Doutor Carlos Palmeira.

Sumário

O cancro da bexiga é a neoplasia maligna mais comum do aparelho urinário, sendo o carcinoma urotelial o tipo histológico mais frequente. Em aproximadamente 70% a 80% dos casos, o tumor é, inicialmente, uma lesão superficial na mucosa da bexiga. Embora sem características histopatológicas de grande agressividade, estes tumores recidivam com frequência e, por vezes, sob formas invasoras. Este facto tem fomentado uma intensa investigação na tentativa de encontrar novas estratégias e alvos terapêuticos, mais eficazes e com menos toxicidade associada. Neste processo de investigação, têm desempenhado um papel fundamental as linhas celulares de tumores de bexiga humana.

Um dos fármacos em investigação é a Mitomicina C (MMC) cujo papel nos atuais esquemas terapêuticos recomendados para os CUB superficiais não está, ainda, bem definido, nomeadamente nos tumores de risco intermédio e alto.

O presente estudo teve como objetivo geral verificar algumas características biológicas da linha celular 5637, considerada uma linha derivada do carcinoma superficial de bexiga humana, após exposição à MMC isolada, bem como em combinação com Everolimus (EVE), Temsirolimus (TEM) e Gemcitabina (GEM).

Para tal, procedeu-se à apreciação do efeito antineoplásico destes fármacos através de três variáveis: avaliação da citotoxicidade celular pelo método de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), estudo do ciclo celular por citometria de fluxo (CF) e avaliação da percentagem de células em apoptose, também por CF. Dada a diversidade de valores de concentração e tempos de exposição à MMC descritos na literatura foi necessário encontrar um valor adequado para o presente estudo, tendo-se optado por uma concentração de MMC de 1,25 µg/ml, durante 1h.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a MMC isolada tem um efeito antineoplásico evidente, demonstrando uma redução acentuada na viabilidade celular da linha celular 5637. No que diz respeito ao efeito da MMC no ciclo celular, observou-se uma acumulação de células em fase S e aumento da percentagem de células em apoptose.

Em relação à terapia de combinação MMC/EVE e MMC/TEM não se observou um acréscimo do efeito antineoplásico da MMC.

Por outro lado, o efeito antineoplásico da MMC é potenciado quando combinada com a GEM, verificando-se os valores mais baixos de viabilidade celular, com paragem do ciclo celular em G_0/G_1 e aumento da percentagem de células em apoptose.

Quanto à exposição das células com EVE e TEM isoladamente, observa-se um efeito antineoplásico moderado, com um ligeiro aumento da percentagem de células em apoptose (apenas significativo para a exposição com EVE).

Relativamente à GEM os resultados são sugestivos de que tem um efeito antineoplásico evidente, com paragem do ciclo celular em G_0/G_1 sendo potenciada, como referido anteriormente, pela MMC.

Adicionalmente, foi objeto de estudo a linha celular humana de urotélio de bexiga (HCV29) para aferir eventuais alterações no conteúdo de ADN após diferentes tempos de exposição à MMC (1h, 6h, 24h, 48h e 72h). Neste estudo verificou-se que todas as populações celulares tinham um conteúdo de ADN sobreponível ao controlo (diplóide de ADN), mesmo após 72h de exposição, ou seja, não revelaram alterações do conteúdo de ADN após exposição à MMC. Estes resultados não confirmaram as alterações genéticas descritas na literatura como resultado da ação repetida deste fármaco.

Palavras-chave: Cancro da bexiga, linhas celulares, MMC, EVE, TEM, GEM, MTT, CF

Summary

Bladder cancer is the most common malignancy of the urogenital region, with urothelial carcinoma being the most frequent histologic type. Approximately 70%-80% of initial tumours are superficial lesions confined to the bladder mucosa. Although without aggressive histopathologic features, these tumours frequently recur and progress to invasive forms. This has led to an intensive research in trying to find new strategies and therapeutic targets, more effective and with lower adverse side effects. In this research process, human bladder tumor cell lines have played a key role.

One of drugs under study is Mitomycin C whose role in current treatment regimens recommended for non-invasive urothelial cell carcinoma is not yet well defined, namely for intermediate and high risk tumours.

The present study aimed to verify some biological characteristics of the 5637 bladder cell line, after Mitomycin C exposure, alone and in combination with Everolimus, Temsirolimus and Gemcitabine. The cell line is accepted as derived from a non-invasive bladder carcinoma.

The anticancer activity of these drugs was measured through three variables: evaluation of cytotoxicity by the method of 3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide, and study of the cell cycle and the percentage of cells undergoing apoptosis by flow cytometry. Given the wide range of values of Mitomycin C concentration and exposure time described in the literature, it was first necessary to find a suitable value for this study. A Mitomycin C concentration of 1,25 µg/ml, for 1h, was chosen.

The results of this study revealed that the isolated Mitomycin C has a clear antineoplastic effect, demonstrating a marked reduction in cell viability of 5637 cell line. With respect to cell cycle and apoptosis, a S-phase arrest and increased apoptosis cell fraction, were observed.

Regarding the Mitomycin C/Everolimus and Mitomycin C/Temsirolimus combination therapy no increase antitumor effects was observed compared with Mitomycin C alone.

On the other hand, the antineoplastic effect is enhanced when combined Mitomycin C with Gemcitabine, verifying the lowest values of cell viability, a G₀/G₁ arrest and increased percentage of cells undergoing apoptosis.

Regarding isolated Everolimus and Temsirolimus exposure, there is a moderate antineoplastic effect, with a slight increase in the percentage of apoptotic cells (only significant with Everolimus).

Regarding Gemcitabine, the results are suggestive of a clear antineoplastic effect in cell cycle with a higher G₀/G₁ arrest, as mentioned above.

Additionally, changes in the DNA content of normal bladder cell line (HCV29) were evaluated, after different Mitomycin C exposure times (1h, 6h, 24h, 48h and 72h). The results showed that all cell populations studied had a DNA content overlapping the DNA content of the control (diploid DNA), even after 72h of Mitomycin C exposure. No changes in DNA content after Mitomycin C exposure were observed. These results did not confirm the genetic alterations described in the literature as a result of the repeated action of this drug.

Keywords: Bladder Cancer, cell lines, Mitomycin C, Everolimus, Temsirolimus, Gemcitabine, MTT, flow cytometry

Dedicatórias

Aos meus pais, os meus anjos da guarda, que me tornaram possível mais esta etapa da minha vida.

À minha querida avó que me tolera todas as manhãs com o meu mau humor.

Ao meu querido e amado irmão, Samuel, que dá cor à minha vida e inspira o meu coração!

Ao meu namorado, Josué, que me ajudou a levar por diante todo este meu trabalho estimulando a minha aprendizagem, não me deixando vacilar na fé, pois ele é o raio de luz que faz o Sol brilhar mesmo nos dias mais cinzentos!

Agradecimentos

Nos próximos parágrafos quero expressar a minha gratidão a todos os que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho: MUITO OBRIGADA!

Primeiramente a Deus por me ajudar a acreditar que aquilo que parece impossível com a Sua ajuda tudo se torna facilitado.

Em segundo lugar cabe-me agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Palmeira, pois sem o seu voto de confiança, a sua amizade e a sua preciosa contribuição este trabalho nunca teria passado de um projeto. Obrigada Professor, por todos os sábios ensinamentos transmitidos com rigor, pelos seus preciosismos que enriquecem qualquer trabalho, pela sua memória inquestionável, pelo seu poder de “descomplicar” as situações que parecem ou tornamos complicadas, pela disponibilidade dispensada em todas as ocasiões (quer em trabalho de secretária, quer de bancada) e especialmente pela amizade criada ao longo deste tempo. Para mim, foi um desafio e, sem dúvida, uma mais valia poder trabalhar com alguém com o seu nível de conhecimento da realidade clínica e visão científica. Agradeço, mais uma vez, o entusiasmo e o otimismo com que acreditou no projeto e nas minhas capacidades.

Correndo o risco de me tornar extensa, não posso deixar de mencionar que sempre me considerei uma privilegiada em ter esta oportunidade de lidar com pessoas com um nível científico e cultural tão exímio.

À Doutora Rosário Leite, do Centro Hospitalar Trás-os-Montes e Alto Douro, quero manifestar o meu apreço por fazer parte da minha comissão de acompanhamento, e pelo empenho e disponibilidade com que sempre me presenteou, especialmente na curta temporada que passei no seu Laboratório.

Ainda no Centro Hospitalar Trás-os-Montes e Alto Douro, não posso esquecer a Mestre Regina pela ajuda imprescindível no processamento da cultura de células e no tratamento dos dados estatísticos, bem como a preciosa e sábia troca de “emails”.

Ao Doutor Lúcio, do Instituto Português de Oncologia do Porto, quero exteriorizar a minha consideração pela apreciação crítica.

Ao Doutor Ricardo Cruz, do Instituto Português de Oncologia do Porto, do serviço de Urologia, pelo esclarecimento sobre o uso da MMC.

Às minhas colegas de Mestrado, Ana Cerqueira e Carla Pereira, pelos trabalhos realizados em conjunto, pelas críticas, pelo divertimento e sobretudo pela amizade que se criou ao longo desta temporada da nossa vida! A vocês, que tanto partilhámos, não podia passar sem deixar o meu muito obrigada!

Não posso deixar também de agradecer ao Doutor Carlos Mourão por toda a preocupação e incentivo durante a fase de dissertação.

Às minhas amigas “do peito” Marta Freitas e Marta Nascimento, quero agradecer toda a partilha diária destes longos anos. Não só por todos os dias de amizade, mas também por todos os momentos de descontração que passaram ao meu lado. Foram como irmãs gémeas: trabalhámos no mesmo espaço, os nossos trabalhos não sendo da mesma área deram azo a grande partilha científica, dividimos o mesmo computador, celebrámos juntas os sucessos e ajudaram-me a superar as horas mais difíceis. Espero poder retribuir essa amizade que para mim, foi e continua a ser o protótipo da verdadeira amizade!

Aos preciosos e (felizmente) imensos amigos que me “aturaram” e desencantaram de mim um sorriso mesmo quando estes pareciam extintos! Mesmo não os nomeando sei que estas palavras chegarão aos seus destinatários.

A toda a família por todas as palavras de estímulo e pela compreensão da minha ausência em momentos mais difíceis, um carinhoso e sincero obrigada.

Especialmente aos meus queridos pais, que foram o que mais se possa aproximar de um clone meu, por me prestarem sempre uma ajuda incondicional, sem horários e repleta de amor e paciência em todos os momentos, um INCOMENSURÁVEL OBRIGADA. A eles devo a conciliação deste trabalho com a existência da minha família.

E por último, mas não menos importantes, quero agradecer aos “homens da minha vida”, Samuel e Josué, obrigada por existirem e pelo amor que me dão em cada dia. Vocês dão-lhe sentido!

Índice Geral

I. INTRODUÇÃO	2
1. Morfologia da bexiga humana	2
2. Cancro da bexiga	4
i. Epidemiologia	4
ii. Classificação histológica e significado prognóstico	6
Classificação TNM	6
Carcinogénese	11
3. Tratamento inicial do carcinoma urotelial superficial da bexiga	13
4. MMC	15
i. Mecanismos de ação	20
ii. Resistência	20
iii. MMC e linhas celulares	21
iv. MMC e efeito mitogénico	24
5. Gemcitabina	26
i. Mecanismos de ação	30
ii. GEM e linhas celulares	31
6. Temsirolimus	33
i. Mecanismos de ação	33
ii. TEM e linhas celulares	34
7. Everolimus	36
i. Mecanismos de ação	36
ii. EVE e linhas celulares	37
II. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	40
III. MATERIAL E MÉTODOS	42
1. Linhas celulares	42
2. Fármacos estudadas	42
3. Avaliação do efeito anti-neoplásico da MMC, isolada e em combinação	43

i.	Citotoxicidade celular	43
ii.	Estudo das diferentes fases do ciclo celular e apoptose	44
4.	Alterações do conteúdo de ADN após exposição prolongada à MMC	48
5.	Análise estatística	49
IV.	RESULTADOS	51
1.	Otimização da concentração da MMC	51
2.	Avaliação do efeito antineoplásico	54
i.	Citotoxicidade celular na linha 5637	54
ii.	Análise do ciclo celular na linha 5637	56
iii.	Estudo da apoptose na linha 5637	57
3.	Alterações do conteúdo de ADN da linha HCV29 após exposição à MMC	59
V.	DISCUSSÃO	61
VI.	CONCLUSÃO	70
VII.	PERSPETIVAS FUTURAS	74
VIII.	BIBLIOGRAFIA	76
IX.	ANEXOS	93

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema representativo da bexiga humana (adaptado de Netter, 2003). _____	2
Figura 2: Estimativas das taxas de incidência ajustadas por idade/100.000 habitantes do sexo masculino (A) e do sexo feminino (B), dos tumores malignos da bexiga, a nível mundial, em 2008 (Adaptado de GLOBOCAN, 2010). _____	4
Figura 3: Percentagem de cancro da bexiga na Região Norte de Portugal em 2007, por sexo (Adaptado de RORENO, 2007). _____	5
Figura 4: Correlação entre a classificação da WHO de 1973 e 2004 (Adaptado de Babjuk et al, 2012). _____	10
Figura 5: Relação entre o ciclo celular e o histograma de ADN (Adaptado de Ormerod, 2008). _____	45
Figura 6: Otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC durante 1, 2, 3 e 24h. Os valores apresentados correspondem à média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A. _____	51
Figura 7: Otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) (0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml/1h). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637. Os valores representam a média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A. _____	52
Figura 8: Otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) (0; 1,25 e 2,5 µg/ml/1h). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637. Os valores representam a média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A. _____	53
Figura 9: Viabilidade celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. E1: EVE a 0,05 µM/72h; E2: EVE a 2 µM/72h; T1: TEM a 500 nM/72h; T2: TEM a 4000 nM/72h; G: GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo B. _____	54
Figura 10: Distribuição do ciclo celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500	

nM/72h; GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo C. _____ 56

Figura 11: Percentagem de células em apoptose (fração sub-G₀/G₁) da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM; GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo D. _____ 57

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos tumores malignos uroteliais da bexiga através do sistema TNM (Adaptado de Babjuk et al, 2013). _____	7
Tabela 2: Classificação das neoplasias uroteliais não invasoras segundo a WHO, 1973 (Adaptado de Babjuk et al, 2012). _____	8
Tabela 3: Classificação das neoplasias uroteliais não invasoras segundo a WHO, 2004 (Adaptado de Babjuk et al, 2012). _____	9
Tabela 4: Ponderação usada para calcular o “score” de recorrência da doença e o “score” de progressão (Adaptado de Babjuk et al, 2013). _____	16
Tabela 5: Probabilidade de recorrência da doença de acordo com o “score” total. Intervalo de confiança (IC) (Adaptado de Babjuk et al, 2013). _____	17
Tabela 6: Probabilidade de progressão da doença de acordo com o "score" total de confiança (IC) (Adaptado de Babjuk et al, 2013). _____	17
Tabela 7: Estratificação de risco (Adaptado de Babjuk et al, 2013). _____	18
Tabela 8: Concentração e tempo de exposição à MMC referida na literatura com linhas celulares de cancro da bexiga. _____	22
Tabela 9: Tempos de exposição aos diferentes fármacos em estudo. _____	43
Tabela 10: Média dos picos G ₀ /G ₁ e valor do ID da linha celular HCV29, após diferentes tempos de exposição à MMC ([1,25 µg/ml]) . Os valores representam a média de três replicados. _____	59
Tabela 11: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 1h. _____	93
Tabela 12: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 2h. _____	93
Tabela 13: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 3h. _____	94

Tabela 14: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 24h. _____	94
Tabela 15: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml de MMC, durante 1h. Placa A. _____	95
Tabela 16: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml de MMC, durante 1h. Placa B. _____	95
Tabela 17: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 1,25 e 2,5 µg/ml de MMC, durante 1h. _____	96
Tabela 18: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. E1: EVE a 0,05 µM/72h; E2: EVE a 2 µM/72h; T1: TEM a 500 nM/72h; T2: TEM a 4000 nM/72h; G: GEM a 100 nM/72h. _____	97
Tabela 19: Média, desvio padrão e distribuição do ciclo celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM/72h; GEM a 100 nM/72h. _____	98
Tabela 20: Média, desvio padrão e percentagem de células em apoptose (fração sub-G ₀ /G ₁) da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM; GEM a 100 nM/72h. _____	99

Lista de Abreviaturas

4EBP-1: proteína de ligação do fator eucariótico de alongação 4E

5-FU: 5-fluorouracil

5'-NT: 5'-nucleotidase

Abs: absorvância

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análise de Variância

ARN: ácido ribonucleico

AUA: American Urological Association Education and Research

BCG: Bacillus de Calmette-Guérin

BTCC: carcinoma de células de transição da bexiga

CCNE1: ciclina E

CDA: citidina desaminase

CDDP: Cisplatina

CDKN1A: inibidor de cinase dependente de ciclina 1A

CF: citometria de fluxo

CIS: carcinoma “in situ”

CR: cistectomia radical

CS: sulfato de condroitina

CSC's: células-tronco cancerígenas

CUB: carcinomas uroteliais da bexiga

dCTP: desoxicitidina trifosfato

dCK: desoxicitidina cinase

dFdC: 2', 2'-difluorodesoxicitidina

dFdCDP: nucleosídeos ativos difosfato

dFdCTP: nucleosídeos ativos trifosfato

DMSO: dimetil-sulfóxido

DOX: Doxorubicina

DTD: DT-diaforase

EAU: European Association of Urology

EMEA: European Medicines Agency

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

EPI: Epirubicina

Et al: Et alli

EVE: Everolimus

FDA: Food and Drug Administration

FKBP-12: proteína de 12 kDa ligante do tracolimus, FK506

GEM: Gemcitabina

hCNT: nucleotídeo equilibrativo humano de concentração

hENT1: transportador de nucleotídeo equilibrativo humano tipo I

HIF-1: fator indutor de hipóxia 1

HIF-2 α : fator indutor de hipóxia 2-alfa

ID: Índice de ADN

IGF-1R: recetor do fator de crescimento semelhante à insulina-I

Integrina β 1: integrina beta1

IC: Intervalo de confiança

IP: iodeto de propídeo

ISUP: International Society of Urologic Pathologists

MMC: Mitomicina C

mrcA: gene resistente à MMC

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1: complexo-1 do mTOR

MTT: 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

M-VAC: metotrexato/vinblastina/DOX/CDDP

NaB: butirato de sódio

P450R: redutase do citocromo P450

PBS: tampão fosfato salino

PUNLMP: neoplasia urotelial papilar de baixo potencial de malignidade

QT: quimioterapia

rpm: rotações por minuto

RRM1: ribonucleotídeo redutase M1

RRM2: ribonucleotídeo redutase M2

RTU: resseção transuretral

S6K1: proteína cinase ribossómica S6

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

TEM: Temsirolimus

TNM: Tumour-Nodes-Metastasis

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

WHO: World Health Organization

y **ADN:** polimerase ípsilon ADN polimerase

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Morfologia da bexiga humana

A bexiga é um órgão oco, localizado na pelve, cuja função principal é servir como reservatório de urina (Figura 1). Nos homens, situa-se acima do soalho pélvico e da próstata, em frente e acima do reto e das vesículas seminais e, nas mulheres, localiza-se à frente da vagina e abaixo do útero. O tamanho e forma da bexiga varia com a quantidade de urina que contém e com a pressão que recebe de órgãos adjacentes (Afonso, 2011).

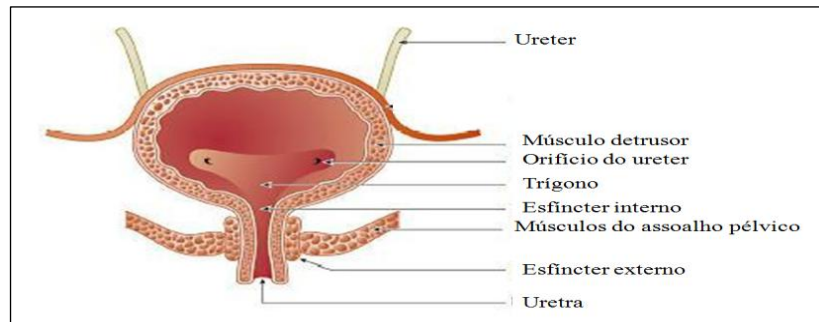


Figura 1: Esquema representativo da bexiga humana (adaptado de Netter, 2003).

Internamente, a bexiga é revestida por uma mucosa composta por um epitélio transicional, ou urotélio, e a lâmina própria de tecido conjuntivo laxo. O urotélio é apenas encontrado dentro das passagens de condução do sistema urinário, para o qual está especialmente adaptado. Na bexiga contraída, o urotélio tem cinco a sete camadas de células e, na bexiga distendida, três a quatro camadas. As células da camada basal são compactas e cúbicas ou cilíndricas quanto à forma, enquanto as da camada intermediária são mais poligonais. As células superficiais, células em “umbrella”, são grandes, ovoides, com núcleos redondos e citoplasma eosinofílico abundante, podendo ser binucleadas. Estas têm características únicas, uma vez que, permitem manter a impermeabilidade do epitélio à urina (Afonso, 2011; American Cancer Society, 2012; Cabrera, 2010; Solomon, 2008; Wu, 2009).

A parede muscular é formada pelo músculo detrusor, a qual tem três camadas de músculo liso – longitudinal interna, circular média e longitudinal externa – e fibras elásticas que contraem durante a micção. Nas zonas não peritonealizadas, segue-se uma adventícia, constituída por tecido conjuntivo laxo enervado e vascularizado (vasos sanguíneos e linfáticos). A face exterior da bexiga é revestida por mesotélio e liga-se ao peritoneu, mantendo a posição do órgão (Afonso, 2011; American Cancer Society, 2012; Cabrera, 2010; Solomon, 2008; Wu, 2009).

2. Cancro da bexiga

i. Epidemiologia

O cancro da bexiga é o quinto cancro mais frequente no mundo industrializado e o segundo ao nível do trato geniturinário, afetando mais homens do que mulheres (razão mundial, aproximadamente, de 3:1) (Cordon-Cardo, 2008). A incidência deste cancro aumenta, regra geral, com a idade, apresentando um pico entre os 50 e 70 anos e sendo raro antes dos 40. A idade média de diagnóstico situa-se nos 73 anos (American Cancer Society, 2012).

Existe uma variação geográfica e racial na incidência do carcinoma da bexiga: é mais alta em americanos brancos do que em americanos negros, em áreas urbanas do que em áreas rurais e em países industrializados do que em regiões sub-desenvolvidas (Figura 2 A e B) (Afonso, 2011; American Cancer Society, 2012; Hubbard *et al*, 2007; Palmeira, 2010; Piovesan, 2011; GLOBOCAN, 2010).

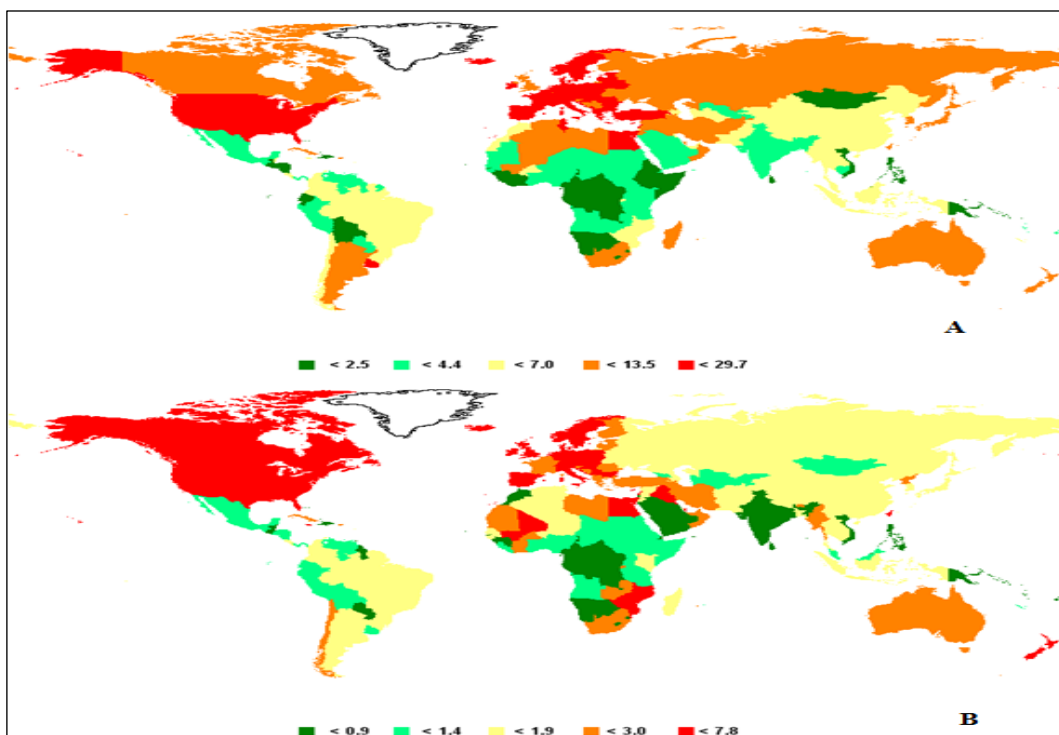


Figura 2: Estimativas das taxas de incidência ajustadas por idade/100.000 habitantes do sexo masculino (A) e do sexo feminino (B), dos tumores malignos da bexiga, a nível mundial, em 2008 (Adaptado de GLOBOCAN, 2010).

Em Portugal, registaram-se 1631 novos casos, em 2001 (RORENO, 2001). Em 2007, e na região norte de Portugal, foram de 687 novos casos de tumores da bexiga (com uma taxa bruta de 20,9), correspondendo ao quinto tumor mais frequente no homem e o décimo na mulher (Figura 3) (RORENO, 2007).

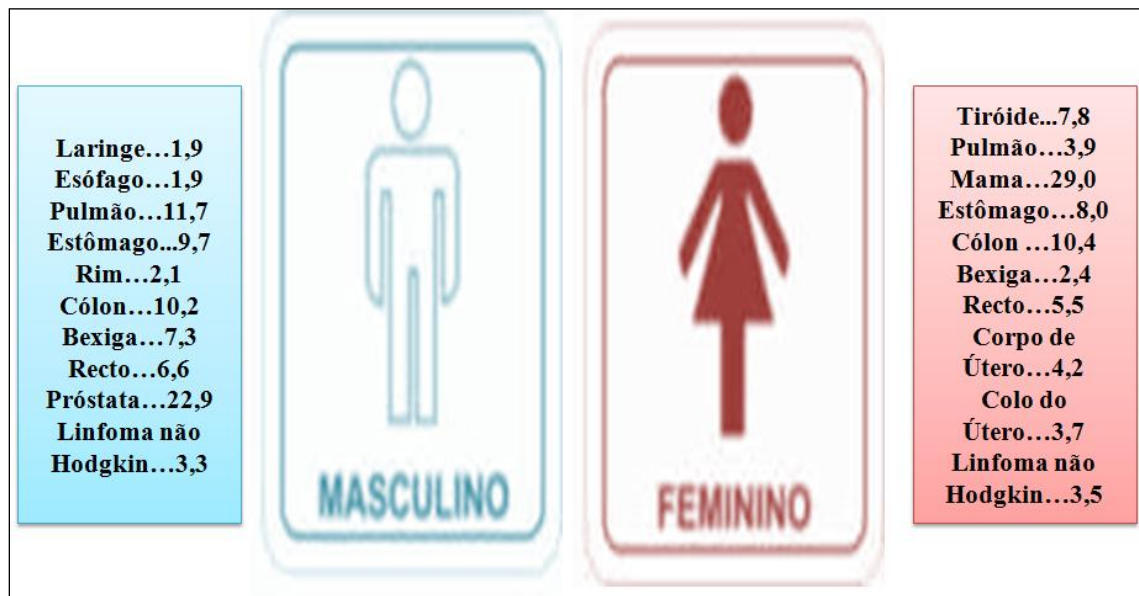


Figura 3: Percentagem de cancro da bexiga na Região Norte de Portugal em 2007, por sexo (Adaptado de RORENO, 2007).

O tabaco é o fator de risco principal para o desenvolvimento de cancro da bexiga, na população em geral. Uma variedade de carcinogénicos de exposição industrial também pode estar implícita, tais como, corantes à base de anilina e benzinas, aminas aromáticas e agentes alquilantes. Outros fatores de risco incluem, ainda, a infeção crónica pelo *Schistosoma sp.* (especialmente nos países menos desenvolvidos), bem como, a exposição à ciclofosfamida e tratamentos de radioterapia (American Cancer Society, 2012, Babjuk *et al.*, 2008; Bernardo, 2011; Cota, 2011; Guimarães, 2007; Oliveira, 2006a; Palmeira, 2010; Piovesan, 2011).

ii. Classificação histológica e significado prognóstico

O estadiamento para o cancro da bexiga é dividido em **estadiamento clínico** e **patológico**. O estadiamento **clínico** é estabelecido a partir dos dados do exame físico e dos exames complementares pertinentes ao caso, enquanto, o **estadiamento patológico** baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico da peça operatória. É estabelecido após tratamento cirúrgico e determina a extensão da doença com maior precisão (Hubbard *et al*, 2007).

Classificação TNM

A classificação dos tumores malignos de acordo com o “Tumour-Nodes-Metastasis” (TNM) permite estabelecer a dimensão da doença, sendo útil para delinear o tratamento, determinar o prognóstico e avaliar os resultados do tratamento (Afonso, 2011; Bernardo, 2011). Nesta classificação o T refere-se ao tamanho do tumor primário e existência, ou não, de invasão dos tecidos envolventes; o N ao envolvimento de gânglios linfáticos regionais; e o M à existência ou não de metástases. Na Tabela 1 apresenta-se a classificação TNM dos tumores malignos da bexiga, de acordo com a “World Health Organization” (WHO) (Babjuk *et al*, 2013).

Tabela 1: Classificação dos tumores malignos uroteliais da bexiga através do sistema TNM (Adaptado de Babjuk *et al*, 2013).

Tumor primário (T)
Ta Tumor papilar não-invasivo
CIS (Tis) Carcinoma “in situ”: tumor plano
T1 Tumor invade o tecido conjuntivo sub-epitelial
T2 Tumor invade a camada muscular pT2a Tumor invade o músculo superficial (metade interna) pT2b Tumor invade o músculo profundo (metade externa)
T3 Tumor invade o tecido perivesical (pericisto) pT3a Microscopicamente pT3b Macroscopicamente
T4 Tumor invade qualquer dos seguintes órgãos: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal T4a Tumor invade a próstata, útero, vagina T4b Tumor invade a parede pélvica, parede abdominal
Gânglios linfáticos regionais (N)
Nx Gânglios linfáticos regionais não avaliados
N0 Não há envolvimento de gânglios linfáticos regionais
N1 Metástases num único gânglio linfático na pélvis verdadeira (hipogástrica, obturador, ilíaca externa, ou pré-sacral)
N2 Metástases em vários gânglios linfáticos na pélvis verdadeira (hipogástrica, obturador, ilíaca externa, ou pré-sacral)
N3 Metástases num gânglio linfático no ilíaco comum
Metástases à distância (M)
Mx Metástases à distância não avaliadas
M0 Não há metástases à distância
M1 Metástases à distância

Grau histológico dos tumores não invasores

O grau histológico do tumor tem sido desde há muito reconhecido como um dos indicadores de prognóstico mais importantes no que diz respeito à recorrência da doença e sua progressão (Hubbard *et al*, 2007). Esta variável recorre a critérios morfológicos relacionados com o padrão de alterações citológicas e estruturais do urotélio (Afonso, 2011; Babjuk *et al*, 2008).

Em 1973, a WHO sugeriu um sistema de classificação (grau de 1 a 3) para os tumores uroteliais não invasores com base na intensidade de anaplasia das células tumorais. Embora as definições de grau 1 e de grau 3 sejam explícitas, o grau 2 é um diagnóstico de exclusão (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação das neoplasias uroteliais não invasoras segundo a WHO, 1973 (Adaptado de Babjuk *et al*, 2012).

Papiloma Urotelial
Grau 1 - Bem diferenciado
Grau 2 - Moderadamente diferenciado
Grau 3 - Pouco diferenciado

No início de 1990, vários fatores levaram à reavaliação desta abordagem. Um novo sistema de classificação foi, então, proposto inicialmente pela “International Society of Urologic Pathologists” (ISUP)/WHO em 1998 e atualizado pela WHO em 2004 (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação das neoplasias uroteliais não invasoras segundo a WHO, 2004 (Adaptado de Babjuk *et al*, 2012).

Lesões planas
Hiperplasia (lesões planas sem atipia ou aspetos papilares)
Atipia reativa (lesões planas com atipia)
Atipia de significado desconhecido
Displasia urotelial
CIS urotelial
Lesões papilares uroteliais não invasoras
Papiloma urotelial (lesão completamente benigna)
Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial de malignidade (PUNLMP)
Carcinoma urotelial papilar de baixo grau
Carcinoma urotelial papilar de alto grau

De acordo com esta classificação de 2004, são consideradas lesões uroteliais planas: hiperplasia, atipia reativa, atipia de significado desconhecido, displasia urotelial e CIS urotelial. Ao nível das lesões papilares uroteliais não invasoras consideram os papilomas uroteliais, a PUNLMP, os carcinomas uroteliais papilares de baixo grau e os carcinomas uroteliais papilares de alto grau.

O principal objetivo desta nova classificação consistiu em criar uma melhor definição de critérios para os diferentes graus (Afonso, 2011; Babjuk *et al*, 2012) aumentando a sua reprodutibilidade. O antigo grau 1 dos carcinomas uroteliais papilares são agora subdivididos em PUNLMP ou carcinoma urotelial papilar de baixo grau; o grau 2 de 1973 são, atualmente, classificados como baixo ou alto grau e o grau 3 como alto grau (Figura 4) (Jacobs *et al*, 2010).

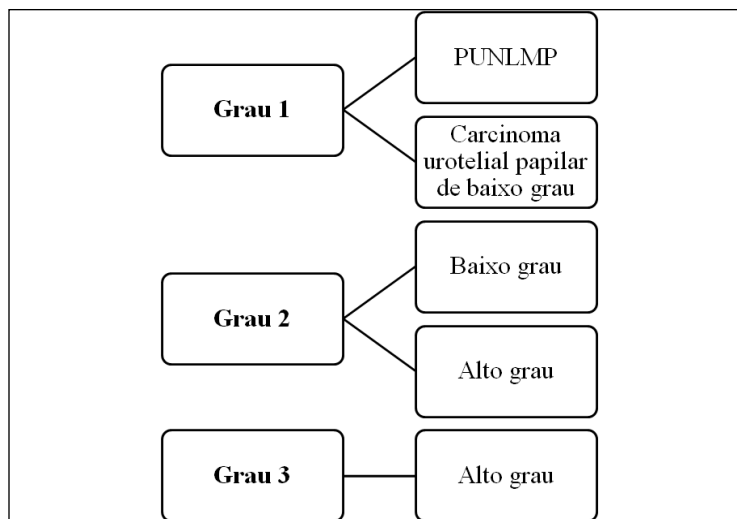


Figura 4: Correlação entre a classificação da WHO de 1973 e 2004 (Adaptado de Babjuk *et al*, 2012).

Defende-se o uso da classificação da WHO de 2004, dado que deverá conduzir a um diagnóstico uniforme dos tumores e melhor estratificado de acordo com o potencial risco. No entanto, até que a classificação da WHO de 2004 seja validada por mais ensaios clínicos, os tumores devem ser classificados recorrendo a ambas as classificações, de 1973 e de 2004 (Babjuk *et al*, 2012).

Carcinogénese

Diversos estudos sugerem que o processo de desenvolvimento deste tipo de cancro decorre em várias etapas, a partir de danos irreversíveis no ADN (iniciação), divisão e proliferação continuada (promoção) e progressão para neoplasia pelo efeito cumulativo de um ou mais agentes de iniciação/progressão (Gutiérrez *et al*, 2001; Hatina *et al*, 2008). Ao longo deste processo de carcinogénese, os tumores superficiais ou invasores da camada muscular podem surgir de novo ou na sequência de lesões pré-malignas anteriores. Estas últimas podem persistir por muitos anos em várias partes do urotélio, oferecendo a oportunidade do aparecimento de novas neoplasias, através de um processo de cancerização em campo (Cota, 2011; Oliveira *et al*, 2005; Lopez-Beltran *et al*, 2004; Piovesan, 2011).

Mais de 90% dos tumores que afetam a bexiga são carcinomas uroteliais da bexiga (CUB), sendo os restantes carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas e carcinomas de células pequenas (Kaufman *et al*, 2009). Dos casos declarados como CUB, cerca de 70% afiguram-se como superficiais, ou seja, não invasores da camada muscular (estágios Ta, T1 ou CIS). Contudo cerca de 50-70% destes vão recorrer e aproximadamente 10-20% irão invadir a muscular própria, tornando-se, portanto, carcinomas invasores (T2-4) (Afonso, 2011; Kaasinen *et al*, 2003; Kaufman *et al*, 2009; Lopez-Beltran *et al*, 2004; Nese *et al*, 2009; Palmeira, 2010). Cerca de 30% apresentam características de tumores de alto grau, invasores ou metastáticos (Babjuk *et al*, 2012, 2008; Palmeira, 2010).

Relativamente a estes CUB superficiais, a grande questão é evitar a recorrência e a progressão. O risco de recidiva e de progressão está associado a diversos fatores clínicos e anátomo-patológicos como: multifocalidade, tamanho do tumor, estadiamento, número de recidivas prévias, presença de CIS e grau tumoral (Castelo-Branco *et al*, 2003; Correia *et al*, 2010; Palmeira, 2010). Neste tipo de tumores não invasores, a abordagem inicial consiste na ressecção transuretral (RTU) do(s) tumor(es) com propósito diagnóstico e terapêutico. Uma RTU de toda a neoplasia visível pode ser suficiente para tratar tumores de baixo risco (Babjuk *et al*, 2012, 2008; Correia *et al*,

2010). No entanto, para a grande maioria dos casos, após a remoção cirúrgica do tumor segue-se uma terapia intravesical ou quimioterapia (QT), de forma a diminuir a probabilidade de recorrência dentro dos primeiros dois anos após a cirurgia. Em relação aos CUB superficiais de alto grau a controvérsia é maior quanto à definição do esquema terapêutico mais adequado (Babjuk *et al*, 2012, 2008; Correia *et al*, 2010).

Quanto aos CUB invasores, principais responsáveis pela morbidade e mortalidade por cancro da bexiga, esta abordagem é claramente insuficiente. A cistectomia radical (CR) é, até ao momento, a abordagem mais indicada (Palmeira, 2010).

3. Tratamento inicial do carcinoma urotelial superficial da bexiga

De acordo com as recomendações da “European Association of Urology” (EAU) (Babjuk *et al*, 2012), a maioria dos urologistas opta primariamente por fazer uma RTU da totalidade do tumor seguida por terapia intravesical (imunoterapia com Bacillus de Calmette-Guérin [BCG] ou QT com Mitomicina C [MMC] ou Epirrubicina [EPI], entre outros) (Correia *et al*, 2010) e posteriormente uma fase de manutenção (Pompeo *et al*, 2008).

Um dos medicamentos mais eficazes e mais utilizado no tratamento do cancro da bexiga é o BCG, derivado do *Mycobacterium bovis* (Marusic *et al*, 2009; Oliveira, 2006a, 2006b; Zhao *et al*, 2000).

A administração do BCG pode ser percutâneo, injeção intralesional, oral, instilação intravesical combinada com percutânea ou apenas instilação intravesical. As três primeiras já não são tão usadas devido aos seus efeitos colaterais severos e ineficácia. Hoje em dia, o procedimento padrão é a instilação isolada (Tobias-Machado *et al*, 2009).

Tal como descrito nas recomendações da EAU o número ideal de instilações, permanece, ainda, por definir. No entanto, e apesar de muitas alternativas se terem ponderado, o esquema recomendado é, ainda o esquema descrito por Morales em 1976 (Morales *et al*, 1976), uma instilação por semana durante seis semanas. No entanto, muitos esquemas terapêuticos de manutenção diferentes têm sido usados, desde um total de 10 instilações dadas em 18 semanas, a 30 instilações administradas por mais de 3 anos. O BCG é instilado na bexiga sob a forma de uma solução de bacilos de tuberculose atenuados, misturado em 50 ml de solução salina através de um cateter colocado na passagem urinária (Tobias-Machado *et al*, 2009).

Como qualquer tratamento, esta terapia de manutenção tem associado algum grau de toxicidade e efeitos colaterais. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG em diferentes graus de intensidade, sendo que esses vão

desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (Babjuk *et al*, 2012). Em dois estudos de metanálise, observou-se maior toxicidade do BCG quando comparado à MMC. Os efeitos colaterais mais frequentes foram: disúria, cistite, polaciúria e hematúria. As complicações sistêmicas são febre, calafrios, indisposição e “rash” cutâneo (Pompeo *et al*, 2008; Urdaneta *et al*, 2008).

Apesar da grande eficácia do BCG, há situações particulares descritas em que este tratamento é menos eficaz, como por exemplo nos pacientes Ta de alto grau, T1, ou com CIS, uma vez que estes apresentam alto risco de recorrência e, mais importante, progressão (Babjuk *et al*, 2012; 2008; Grossman *et al*, 2008; Lightfoot *et al*, 2011). Nestes doentes que não respondam ao tratamento com BCG, são necessárias outras medidas de tratamento. Estas incluem instilação de agentes imunoterápicos (Interferon) ou agentes quimioterápicos (MMC, EPI, Valrubicina, Doxorubicina [DOX], Gemcitabina [GEM], Cisplatina [CDDP], entre outros) (Grossman *et al*, 2008).

Diversos tratamentos têm sido ensaiados e propostos na literatura, com a utilização isolada ou combinada destes agentes terapêuticos. No entanto, o esquema terapêutico mais adequado para este grupo de CUB superficiais, em termos de eficácia e toxicidade, está ainda por definir.

O grupo de Investigação de Patologia (UFP)/Patologia e Terapêutica Experimental (IPOP,EPE), tem desenvolvido diversos projetos de investigação ao nível do cancro da bexiga com o propósito de esclarecer o papel de novos agentes terapêuticos no tratamento dos CUB, nomeadamente, os inibidores do mTOR. Neste sentido, têm sido efetuados ensaios pré-clínicos, quer recorrendo a modelos animais experimentais (carcinogénese induzida quimicamente e xenógrafos) quer a estudos “in vitro” com linhas celulares de cancro da bexiga humano.

4. MMC

A MMC é um antibiótico anti-tumoral derivado do *Streptomyces lavadulae*. A MMC tem demonstrado atividade anti-tumoral ao nível dos CUB superficiais, cancro da mama, cancro do pâncreas, cancro do estômago, cancro do esófago, cancro gastrointestinal, cancro do colo uterino, cancro pulmão, bem como em melanomas e também na área de oftalmologia (Almeida *et al*, 2005; McKelvie *et al*, 2001; Santo, 2001).

No CUB, a MMC é usada como primeira instilação intravesical até 24h após RTU, independentemente do tipo de risco do tumor (Aldousari *et al*, 2006; Pompeo *et al*, 2006) porque comprovadamente diminui o risco de recidiva tumoral (Babjuk *et al*, 2013). Segundo a “American Urological Association Education and Research” (AUA) (Hubbard *et al*, 2007) a dosagem de instilação vesical da MMC, para os humanos, varia de 20 a 60 mg, sendo a dose mais utilizada de 40 mg, em 40 ml de soro fisiológico, durante 1h. Estudos comprovam que a MMC é mais eficaz durante 1h do que durante 30 minutos, não havendo, ainda, estudos sobre a eficácia deste fármaco durante 2h (Babjuk *et al*, 2013). Contudo, o método ideal de administração de MMC está ainda por estabelecer (American Cancer Society, 2012; Babjuk *et al*, 2008; Hubbard *et al*, 2007). A utilização da MMC intravesical nas primeiras 24h após a RTU, como referido anteriormente, pode diminuir as taxas de recidivas em lesões de baixo grau (utilização mais frequente da MMC) e tem sido amplamente utilizada com essa finalidade (American Cancer Society, 2012; Babjuk *et al*, 2008; Braasch *et al*, 2009; Correia *et al*, 2010; Hubbard *et al*, 2007; Matheus, 2010; Oosterlinck *et al*, 1998; Pompeo *et al*, 2008; Youssef *et al*, 2011).

Após o resultado anátomo-patológico da RTU do tumor vesical, os doentes são melhor estratificados em termos de risco de recidiva e progressão mediante a utilização das tabelas de risco de recidiva e progressão da “European Organisation for Research and Treatment of Cancer” (EORTC) (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4: Ponderação usada para calcular o “score” de recorrência da doença e o “score” de progressão (Adaptado de Babjuk *et al.*, 2013).

Fator	Recorrência	Progressão
Número de tumores		
Único	0	0
2-7	3	3
≥8	6	3
Diâmetro do tumor		
< 3 cm	0	0
≥ 3 cm	3	3
Taxa de recorrência anterior		
Primária	0	0
≤ 1 recorrência/ano	2	2
>1 recorrência/ano	4	2
Categoria		
Ta	0	0
T1	1	4
CIS concomitante		
Não	0	0
Sim	1	6
Grau (WHO, 1973)		
G1	0	0
G2	1	0
G3	2	5
“Score” total	0-17	0-23

Tabela 5: Probabilidade de recorrência da doença de acordo com o “score” total. Intervalo de confiança (IC) (Adaptado de Babjuk *et al*, 2013).

“Score” de recorrência	Probabilidade de recorrência a 1 ano		Probabilidade de recorrência a 5 anos	
	%	(95% IC)	%	(95% IC)
0	15	(10-19)	31	(24-37)
1-4	24	(21-26)	46	(42-49)
5-9	38	(35-41)	62	(58-65)
10-17	61	(55-67)	78	(73-84)

Tabela 6: Probabilidade de progressão da doença de acordo com o "score" total de confiança (IC) (Adaptado de Babjuk *et al*, 2013).

“Score” de progressão	Probabilidade de progressão a 1 ano		Probabilidade de progressão a 5 anos	
	%	(95% IC)	%	(95% IC)
0	0,2	(0-0,7)	0,8	(0-1,7)
2-6	1	(0,4-1,6)	6	(5-8)
7-13	5	(4-7)	17	(14-20)
14-23	17	(10-24)	45	(35-55)

Baseado nestas tabelas da EORTC, foi criado um sistema de estratificação dos doentes em três categorias: baixo risco, risco intermédio e alto risco, tendo por base o grau e o estágio tumoral, o tamanho do tumor, a multifocalidade e a presença de CIS (Tabela 7).

Tabela 7: Estratificação de risco (Adaptado de Babjuk *et al*, 2013).

Tumores de baixo risco	Tumores de risco intermédio	Tumores de alto risco
Único, solitário, Ta, G1 (baixo grau), < 3 cm, sem CIS	Todos os tumores entre a categoria de baixo e alto risco	T1 tumor, G3 (alto grau), CIS, tumores Ta G1G2 múltiplos e recorrentes e grandes (> 3 cm)

No tumor de baixo risco de recidiva e progressão, a RTU completa do tumor, seguida de MMC peri-operatória adjuvante em dose única é o tratamento preferencial preconizado, reservando-se a utilização de esquemas de terapêutica intravesical de manutenção (imunoterapia com BCG ou QT com MMC, EPI, DOX), para doentes que apresentarem no decurso do seguimento clínico, recidiva tumoral (Babjuk *et al*, 2013).

Nos tumores de risco intermédio, a utilização de MMC intravesical adjuvante em regime de manutenção pode estar indicada, embora com resultados no que respeita a diminuição de risco de recidiva inferiores ao tratamento de manutenção com BCG (Babjuk *et al*, 2013). Ao contrário do BCG, a MMC não parece ter qualquer influência na diminuição do risco de progressão tumoral (Babjuk *et al*, 2013).

Mais ainda, reconhece-se que a MMC não é aconselhada nos casos de alto risco. Assim sendo, este tipo de tumores são melhor tratados com BCG. Após a fase de indução, é recomendada uma terapia de manutenção que é variável entre 1 a 3 anos (Babjuk *et al*, 2013).

No entanto, Kaasinen e colaboradores (2003) realizaram um estudo para verificar a eficácia de instilações de MMC e BCG versus instilações de BCG sozinho, em pacientes com CIS da bexiga. Os resultados deste estudo sugeriram que a terapia de combinação foi mais eficaz e menos tóxica do que a monoterapia com BCG (Kaasinen *et al*, 2003).

De forma semelhante, Oosterlinck e colaboradores (2011) testaram a toxicidade de instilações de MMC conjugada com BCG, em pacientes com CIS da bexiga. Concluíram que no tratamento destes doentes a combinação apresentou uma toxicidade aceitável (Oosterlinck *et al*, 2011).

Chen e colaboradores (2012) compararam os perfis de eficácia e toxicidade de 3 regimes intravesicais, incluindo DOX, BCG, e um regime de “cocktail” (MMC, DOX, CDDP), na prevenção da recorrência do cancro da bexiga. Verificaram que o grupo que foi submetido ao “cocktail” teve uma taxa de recidiva semelhante ao do BCG isolado, mas com menos efeitos secundários (Chen *et al*, 2012).

Como se pode constatar, há diversos estudos que comprovam o potencial da MMC e que têm procurado perceber os fatores de resistência ou sensibilização à MMC. Todavia, existem poucos estudos que avaliem a MMC combinada com outros agentes terapêuticos. Assim sendo, são necessários mais estudos sobre a conjugação da MMC com outros fármacos de modo a que se possa contribuir com uma maior acessibilidade dos doentes a tratamentos de qualidade mais eficazes, mas menos tóxicos.

i. Mecanismos de ação

A MMC é um agente alquilante que sofre ativação metabólica através de redução mediada por enzima, gerando um metabólito que se une ao ácido desoxirribonucleico (ADN) por ligação cruzada, particularmente em regiões ricas em guanina/citosina. Considera-se que a ativação biológica deste fármaco se deve a duas enzimas importantes: DT-diaforase (DTD) e redutase do citocromo P450 (P450R). Em altas concentrações o ácido ribonucleico (ARN) e a síntese proteica podem ficar comprometidos. Este fármaco é mais eficaz quando administrada na fase G₁ tardia e na fase S do ciclo celular (Almeida *et al*, 2005; Gan *et al*, 2001; Kraemer *et al*, 2004; Lightfoot *et al*, 2011; Lopez-Beltran *et al*, 2002; McKelvie *et al*, 2001; Netto, 2007; Oliveira *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2012; Zhi *et al*, 2001). Schwartz e colaboradores (1995) demonstraram que a MMC é capaz de induzir apoptose em células de tumores gástricos (Schwartz *et al*, 1995). Da mesma forma, Kim e colaboradores (1999) observaram que a MMC (0,4 mg/ml, durante 5 minutos), induziu, “in vitro”, a apoptose de fibroblastos humanos da cápsula de Tenon (Kim *et al*, 1999).

ii. Resistência

A resistência a este fármaco ocorre de diversas maneiras. Um dos mecanismos associados à resistência deste fármaco é o aumento da expressão do gene MDR-1, que causa uma diminuição da acumulação do fármaco no interior da célula (Hayes *et al*, 2001). Outra causa apontada para esta resistência à MMC é a expressão do gene resistente à MMC (*mrcA*) e a sobreexpressão da π -type glutationa transferase (Belcourt *et al*, 1999). Outros estudos sugerem, ainda, que a menor eficácia da MMC nos tumores de alto grau se deve à baixa expressão de DTD e P450R nos mesmos (Gan *et al*, 2001; Penketh *et al*, 2001; Sheldon *et al*, 1997).

iii. MMC e linhas celulares

As linhas celulares tumorais são extremamente importantes na investigação, uma vez que representam modelos pré-clínicos que permitem esclarecer a biologia molecular do tumor bem como a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Atualmente, já foram determinadas, aproximadamente, 50 linhas celulares de cancro da bexiga humano, principalmente de tumores invasivos e metastáticos. Efetivamente, existem poucas linhas celulares de tumores não-invasivos de cancro da bexiga (Buckley *et al*, 2007; Fujiyama *et al*, 2001; Hatina *et al*, 2008; Neshati *et al*, 2009). São exemplos de linhas celulares de tumores invasores a T24, 253J, J82 e EJ28, entre outras. Contudo, existem algumas linhas celulares (por exemplo, RT4 e RT112) que partiram de cancros da bexiga invasores, mas tendem a comportar-se como um padrão superficial e são amplamente utilizados como tal (Fujiyama *et al*, 2001; Heijden *et al*, 2004). Para além destes exemplos de linhas celulares, ainda existe a linha celular 5637. Esta linha celular tem causado algumas controvérsias quanto à sua caracterização. Para alguns autores, a 5637 é caracterizada e utilizada como linha tumoral superficial (Buckley *et al*, 2007). No entanto, existem algumas dúvidas sobre a sua caracterização havendo autores que referem tratar-se de uma linha celular tumoral invasora e bem diferenciada (Kraemer *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2011), enquanto outros consideram-na como invasora e moderadamente diferenciada (Oliveira *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2012).

Estas linhas celulares, como supracitado, são geralmente utilizadas como modelos pré-clínicos para o estudo de suscetibilidade a fármacos. Um dos muitos fármacos testados nas linhas celulares do cancro da bexiga é a MMC. No entanto, e tal como acontece na instilação nos Humanos, a concentração e o tempo ideal de exposição à MMC ainda não estão estabelecidos (Tabela 8).

Tabela 8: Concentração e tempo de exposição à MMC referida na literatura com linhas celulares de cancro da bexiga.

Estudo	Linha celular	Exposição (h)	[Fármaco]
Zhi <i>et al</i>, 2001	T24	1	0,2 µM e 3 µM
Heijden <i>et al</i>, 2004	RT112, RT4, 253J e T24	1	0; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 µg/ml
Kraemer <i>et al</i>, 2004	EJ28, J82, 5637 e RT112	2	0,33; 0,67 µg/ml
Krause <i>et al</i>, 2005	SW1710, BC-3C, RT112, RT4, EJ28, HT1376, HT1197, J82 e 5637	2	0,33; 0,67; 1,0 µg/ml
Li <i>et al</i>, 2012	T24 e 5637	24	8; 16; 32; 63; 125; 250; 500; 1000; 2000 µg/ml
Zhang <i>et al</i>, 2012	T24 e 5637	2	100 µg/ml

Zhi e colaboradores (2001), usaram uma concentração de MMC entre 0,2 e 3 µM, na linha celular T24, para testar se o bloqueio da sinalização do recetor do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-1R) potenciava a sensibilização das células à QT. Os resultados deste estudo sugerem que o bloqueio da sinalização de IGF-IR pode contribuir para a diminuição da resistência das células ao tratamento (Zhi *et al*, 2001).

Heijden e colaboradores (2004), expuseram quatro linhas celulares da bexiga (RT112, RT4, 253J e T24) a uma concentração de MMC de 0; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/ml para avaliar se o efeito de hipertermia impelia a citotoxicidade nas mesmas. Este estudo sugeriu que havia um efeito sinérgico quando se aplica MMC com o efeito de hipertermia (Heijden *et al*, 2004).

Kraemer e colaboradores (2004), testaram, nas linhas celulares EJ28, J82, 5637 e RT112, uma concentração de MMC de 0,33 e de 0,67 µg/ml, e um tempo de exposição de 2h, para verificar o efeito da quimiossensibilização com transcriptase reversa da telomerase humana. Os resultados apontaram que o tratamento “antisense” com a transcriptase reversa da telomerase humana poderá ser uma nova abordagem terapêutica (Kraemer *et al*, 2004).

Krause e colaboradores (2005), utilizaram as linhas celulares SW1710, BC-3C, RT112, RT4, EJ28, HT1376, HT1197, J82 e 5637, com concentrações de MMC que variaram entre 0,33; 0,67 e 1,0 µg/ml, e um tempo de exposição à MMC de 2h, para testar se o pré-tratamento “antisense” com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta ou não a citotoxicidade de MMC, GEM e CDDP. Os resultados desta investigação sugerem que o VEGF como um alvo suplementar pode reforçar o benefício terapêutico destes fármacos (Krause *et al*, 2005).

Li e colaboradores (2012), aplicaram diversas concentrações de MMC que alternaram desde 8; 16; 32; 63; 125; 250; 500; 1000 a 2000 µg/ml, e um tempo de exposição de 24h, nas linhas celulares T24 e 5637 para verificarem se com determinadas técnicas conseguiam identificar “células-tronco cancerígenas” (CSC’s), que são resistentes a fármacos, no carcinoma de células de transição da bexiga (BTCC). No final, este trabalho sugere que, apesar das limitações, é possível haver um novo meio de isolamento destas CSC’s e proporcionar, portanto, um tratamento intravesical modificado para um melhor prognóstico (Li *et al*, 2012).

Zhang e colaboradores (2012), estudaram, nas linhas celulares T24 e 5637 e com uma concentração de MMC de 100 µg/ml, e um tempo de exposição de 24h, o envolvimento da integrina beta 1 (integrina β 1) na resistência à MMC no cancro da bexiga. Os resultados apresentados por estes autores são sugestivos de que a integrina β 1 mediada pela adesão da fibronectina confere, de facto, resistência a este fármaco (Zhang *et al*, 2012).

iv. MMC e efeito mitogénico

A MMC é um fármaco que tem demonstrado um enorme poder anti-tumoral. Porém, alguns estudos têm relatado alterações celulares após instilações repetidas de MMC. Alguns autores descrevem estas alterações como transitórias, todavia outros descrevem-nas como permanentes.

Murphy e colaboradores (1981) descreveram alguns efeitos morfológicos da MMC em bexiga de mamíferos. No seu estudo, mostraram que a terapia intravesical com MMC causava multinucleação, vacuolização e degeneração aparentemente relacionadas com os efeitos tóxicos do fármaco (Murphy *et al*, 1981).

Demirci e colaboradores (2000), estudaram amostras de tecidos oculares obtidas antes e depois do tratamento com MMC em pacientes com melanose primária difusa, multifocal ou recorrente adquirida e/ou melanoma conjuntival maligno. No seu estudo, encontraram alterações celulares e nucleares devido à instilação com a MMC. Segundo estes autores, estas mudanças são persistentes, conquanto não clinicamente significativas (Demirci *et al*, 2000).

McKelvie e Daniell (2001) observaram alterações celulares em “imprints” da superfície ocular provocadas por instilações de MMC. Em todas as amostras, detetaram vacuolização citoplasmática, citomegalia, nucleomegalia com rugas nucleares e, ainda, verificaram binucleação ou multinucleação em algumas células. No entanto, constataram que estas alterações eram transitórias e que ao fim de mais ou menos oito meses após a terapêutica com MMC desapareciam (McKelvie *et al*, 2001).

Oliveira e colaboradores (2007), estudaram a proliferação de células e conteúdo de ADN em lesões uroteliais identificadas depois de instilações intravesicais repetidas de MMC e BCG, em urotélio normal de rato. Observaram que quando exponham o urotélio de rato à MMC para além de lesões de hiperplasia simples, displasia e metaplasias escamosas, também foram encontradas lesões de CIS. O conteúdo de ADN multiplóide e índice de proliferação elevado (avaliado por Ki-67) observados nestas lesões uroteliais de CIS sugeriam um elevado grau de instabilidade do genoma destas células (Oliveira *et al*, 2007).

Pelo acima exposto, percebe-se a necessidade de se realizarem mais estudos experimentais que permitam, por um lado, conhecer os efeitos de dose e tempo de exposição da MMC em células tumorais da bexiga e, por outro, compreender melhor o impacto genético deste fármaco em células normais da bexiga.

5. Gemcitabina

A GEM é um análogo de nucleosídeo, em que os átomos de hidrogénio na posição 2' do carbono de desoxicidina são substituídos por flúor (2',2'-difluorodesoxicidina [dFdC]), que exibe especificidade de atuação na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese de ADN (Pauwels *et al*, 2009; Pinto-Leite *et al*, 2012b). A ação citotóxica “in vitro” da GEM é dependente de tempo e da concentração. A GEM é usada nos seguintes tipos de cancro: adenocarcinoma de pâncreas metastático ou localmente avançado, refratário ao 5-fluorouracil (5-FU); tratamento paliativo de carcinoma pulmonar de não-pequenas células, metastático ou localmente avançado; cancro colorretal; cancro da vesícula biliar; cancro do ovário; cancro testicular (Bernardo, 2011; Gontero *et al*, 2006; Gunelli *et al*, 2007). Além destes, a GEM é usada em combinação com a CDDP e outros fármacos nos carcinomas invasores da bexiga (Jian *et al*, 2009; Kaneko *et al*, 2011; Maase *et al*, 2000), bem como em cancros da bexiga refratários ao BCG (Dalbagni *et al*, 2006; Elkoushy, 2010).

A GEM tem um peso molecular de 299 Daltons, mais baixa do que a dos quimioterápicos intravesicais comumente usados. Assim sendo, isto pode permitir a penetração da GEM na mucosa da bexiga com efeitos benéficos no tratamento do cancro da bexiga invasor precoce (T1) (Gontero *et al*, 2006).

Com base nos resultados de estudos de fase I, verifica-se que a dose de 2000 mg de GEM em 50 ou 100 ml de solução salina, quando administrado intravesicalmente até 2h, uma vez por semana durante 6 semanas tem poucos efeitos secundários sistémicos e locais, e, portanto, este esquema deveria ser considerado como o mais conveniente (Gontero *et al*, 2007, 2006).

Maase e colaboradores (2000) realizaram um estudo de fase III sobre o efeito da conjugação GEM/CDDP versus a conjugação metotrexato/vinblastina/DOX/CDDP (M-VAC) em pacientes com cancro da bexiga invasor. Aos pacientes foram-lhes administrados GEM/CDDP (1000 mg/m² GEM nos dias 1, 8 e 15; 70 mg/m² CDDP no dia 2) ou M-VAC (cada 28 dias para um máximo de seis ciclos). No final, os resultados

obtidos confirmaram que a conjugação de GEM/CDDP é a alternativa mais segura para a terapêutica de pacientes com cancro da bexiga localmente avançado e metastático e deve ser considerada um tratamento de referência para estes pacientes (Maase *et al*, 2000).

Mattioli e colaboradores (2005) testaram a segurança, eficácia e farmacocinética da administração intravesical de 2000 mg de GEM uma vez por semana nas quatro semanas antes da RTU de cancro superficial da bexiga e nas quatro semanas seguintes. Este estudo revelou que, a GEM é bem tolerada, está associada com o mínimo de absorção sistémica e tem uma eficácia moderada no tratamento do cancro superficial da bexiga. Sugere, ainda, que será razoável analisar se uma mais administração frequente de GEM, por exemplo, em dias alternados, e/ou uma dosagem mais elevada, pode assegurar uma menor incidência de recorrências (Mattioli *et al*, 2005).

Gontero e Frea (2006) descreveram o desenvolvimento da GEM como tratamento do cancro superficial da bexiga. Este estudo demonstrou que a GEM é um fármaco com um excelente perfil de segurança e toxicidade mínima em concentrações até 40 mg/ml. O mesmo estudo evidenciou que os pacientes exibem uma excelente tolerabilidade às instilações de 1 e 2h. Assim sendo, estes autores concluíram que instilações semanais de GEM durante 6 semanas pode ser adotada como tratamento de carcinoma não invasor da bexiga de risco intermediário (Gontero *et al*, 2006).

Gunelli e colaboradores (2007) avaliaram a atividade da GEM em tumores superficiais refratários à terapia por BCG. Sugeriram que a instilação quinzenal com GEM foi bem sucedida para tumores superficiais Ta G3 e T1 G1-3 refratários à terapia por BCG (Gunelli *et al*, 2007).

Kaneko e colaboradores (2011) realizaram um estudo retrospectivo sobre a toxicidade da combinação da GEM/CDDP versus M-VAC, e confirmaram que GEM/CDDP foi associado a menor toxicidade não hematológica (Kaneko *et al*, 2011).

Fairey e colaboradores (2012) avaliaram os resultados patológicos e sobrevivência da conjugação GEM/CDDP versus a conjugação M-VAC em pacientes com cancro da bexiga invasor. No final, concluíram que os resultados não diferem em pacientes que receberam GEM/CDDP e M-VAC. Sendo assim, estes dados suportam a utilização do esquema de GEM/CDDP no contexto neoadjuvante, devido a ser menos tóxico do que M-VAC (Fairey *et al*, 2012).

Jones e colaboradores (2012) avaliaram, através de bases de dados, a eficácia e a toxicidade da GEM na prevenção da recorrência do tumor e progressão no cancro da bexiga não invasor. No fim do estudo, verificaram que a GEM pode ser mais ativa e menos tóxica do que a MMC. Em comparação com a terapia intravesical com BCG, a GEM teve efeitos semelhantes em pacientes de risco intermediário, menos eficaz em pacientes de alto risco e superior em doentes refratários (Jones *et al*, 2012).

Matsubara e colaboradores (2012) compararam os resultados clínicos entre a QT neoadjuvante e QT adjuvante em pacientes com cancro da bexiga invasor que receberam GEM/CDDP. Os resultados deste estudo não demonstraram diferença estatisticamente significativa na sobrevida livre de recidiva entre a QT neoadjuvante e a QT adjuvante (Matsubara *et al*, 2012).

Yuh e colaboradores (2013) avaliaram, através de uma revisão sistemática da literatura, os resultados clínicos em pacientes com cancro da bexiga invasor que receberam GEM/CDDP. Os dados desta revisão sugerem que a QT neoadjuvante produz taxas apreciáveis de resposta patológica em pacientes com cancro da bexiga invasor (Yuh *et al*, 2013).

Em relação à GEM versus MMC apenas foram encontrados dois estudos. Montella e colaboradores (2008) compararam a eficácia terapêutica e a toxicidade da QT intravesical de GEM e MMC em pacientes com cancro da bexiga superficial recorrente. Os doentes que foram incluídos no estudo foram tratados com instilações de GEM (2000 mg em 50 ml de soro fisiológico) ou com instilações de MMC (40 mg), durante 4 semanas. Em ambos os casos, para os respondedores iniciais que permaneceram livres

de recorrência, a terapia de manutenção consistiu num tratamento de 10 meses durante o primeiro ano. Terminado o estudo, constataram que a terapia intravesical com GEM é melhor tolerada do que a MMC em pacientes de cancro de bexiga refratários (Montella *et al*, 2008).

Addeo e colaboradores (2010) compararam a eficácia terapêutica e toxicidade de instilações intravesicais de GEM versus MMC em pacientes com cancro de bexiga superficial recorrente. Este estudo demonstra que a GEM tem melhor eficácia e menor toxicidade do que a MMC. Assim sendo, a GEM aparece como um candidato lógico para a terapia interna da bexiga de pacientes com carcinoma de células de transição refratário, em que este medicamento citotóxico pode representar uma alternativa válida à cistectomia (Addeo *et al*, 2010).

Relativamente ao efeito combinado destes dois fármacos apenas Breyer e colaboradores (2010) testaram esta QT de combinação intravesical em pacientes com cancro da bexiga. Os doentes estudados apresentavam CUB não invasor refratário ao BCG e foram tratados com uma combinação de GEM intravesical (1000 mg em 50 ml de água estéril) seguida por MMC intravesical (40 mg em 20 ml de água estéril), 1 vez por semana durante 6 semanas. A terapia de indução foi seguida por um regime de manutenção utilizando a mesma dose de GEM e MMC, uma vez por mês durante 12 meses. Após o final do estudo, concluíram que, nos casos de cancro da bexiga refratário ao BCG, a GEM combinada com MMC parece ser bem tolerada e produz uma resposta positiva na maioria destes pacientes (Breyer *et al*, 2010).

Também com esta combinação, mas na linha celular de carcinoma de cólon humano, HT29, Aung e colaboradores (2000) verificaram que os tumores sensíveis à MMC eram igualmente mais sensíveis à GEM (Aung *et al*, 2000).

i. Mecanismos de ação

A GEM é metabolizada intracelularmente pelas cinases-nucleosídeo para dar origem aos nucleosídeos ativos difosfato (dFdCDP) e trifosfato (dFdCTP), que possuem atividade citotóxica (Pinto-Leite *et al*, 2012b). A ação citotóxica da GEM parece ser devida à inibição da síntese do ADN pela dupla ação do dFdCDP e do dFdCTP. Primeiro, o dFdCDP inibe a ribonucleotídeo redutase que é a única responsável pela catalisação das reações que geram os deoxinucleosídeos trifosfatos para a síntese do ADN. A inibição desta enzima pelo dFdCDP causa uma redução nas concentrações de deoxinucleosídeos, especialmente da desoxicitidina trifosfato (dCTP). Segundo, o dFdCTP compete com a dCTP para incorporação no ADN. Assim, a redução na concentração intracelular de dCTP potencializa a incorporação de dFdCTP no ADN (Pinto-Leite *et al*, 2012b). A ípsilon ADN polimerase (ϵ ADN polimerase) é incapaz de remover a GEM e restaurar o crescimento das cadeias de ADN. Após a GEM ser incorporada no ADN, é adicionado um nucleosídeo ao crescimento das cadeias de ADN. Após esta adição, há uma inibição completa na síntese subsequente de ADN (terminação mascarada de cadeia). Após a incorporação no ADN, a GEM parece, então, induzir o processo de morte celular programada conhecido como apoptose (Bernardo, 2011; Gontero *et al*, 2006; Mey *et al*, 2006; Pauwels *et al*, 2009). A GEM (<10%) e o seu principal metabólito inativo (2'-desoxi-2',2'-difluorouridina) são eliminados pela urina. A depuração é afetada em função da idade e do sexo do paciente, razão pela qual existe uma diferença na meia-vida e nas concentrações plasmáticas deste fármaco, sendo mais alta em mulheres e pacientes idosos (Bernardo, 2011; Gontero *et al*, 2006; Mey *et al*, 2006; Pauwels *et al*, 2009).

ii. GEM e linhas celulares

Tal como a MMC e muitos outros fármacos, a GEM é um fármaco testado, regularmente, nas linhas celulares do cancro da bexiga.

Mey e colaboradores (2006) testaram “in vitro” a citotoxicidade da GEM e do Pemetrexed e as suas respostas à farmacogenética em pacientes com carcinoma da bexiga, usando as linhas celulares T24 e J82. Concluíram que a atividade da combinação GEM/Pemetrexed é sinérgica contra as células cancerosas da bexiga. Além disso, verificaram que a avaliação da expressão de genes (desoxicitidina cinase [*dCK*], 5'-nucleotidase [*5'-NT*], citidina desaminase [*CDA*], ribonucleotídeo redutase M1 [*RRM1*], ribonucleotídeo redutase M2 [*RRM2*], transportador de nucleotídeo equilibrativo humano tipo I, [*hENT1*] e nucleotídeo equilibrativo humano de concentração [*hCNT*]), envolvidos na captação e ativação da GEM, pode ser um possível determinante da resposta do carcinoma da bexiga, representando uma nova ferramenta para otimização do tratamento (Mey *et al*, 2006).

Pauwels e colaboradores (2009) desenvolveram um trabalho que tinha como objetivo avaliar o efeito radiosensitivo da GEM, em termos de progressão do ciclo celular e indução de apoptose, bem como investigar os eventos moleculares que regulam a apoptose. Após o término deste trabalho, aferiram que o efeito de radiosensitivo da GEM induz a apoptose (Pauwels *et al*, 2009).

Jian e colaboradores (2009) constataram que a Enzastaurina apresenta atividade antitumoral em linhas celulares de bexiga e que aumenta a atividade da GEM (Jian *et al*, 2009).

Silva e colaboradores (2010) estudaram os efeitos da CDDP e GEM no índice apoptótico e a cinética do ciclo celular de linhas celulares de carcinoma da bexiga com TP53 normal (RT4) ou mutado (5637 e T24). Este estudo revelou que o tratamento concomitante com CDDP e GEM foi mais eficaz do que os fármacos isolados, levando a uma diminuição da sobrevivência das células tumorais independentemente do estado e da expressão do TP53 (Silva *et al*, 2010).

Silva e colaboradores (2012) averiguaram a atividade toxicogénica da GEM em duas linhas celulares de carcinoma da bexiga, T24 e 5637, com TP53 mutado. No fim do seu estudo verificaram que independentemente do local e da mutação do TP53 e do tipo de tumor, a GEM interfere com a apoptose, reparação do ADN, ativação de fatores de transcrição, principalmente pela regulação positiva dos genes ciclina E (*CCNE1*), inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (*CDKN1A*) e *GADD45A*. Assim sendo, a identificação dos genes responsivos à GEM fornece “insights” sobre os seus mecanismos anti-cancro e pode ser utilizado na prática clínica para prever respostas quimioterápicas (Silva *et al*, 2012).

Embora alguns trabalhos se tenham realizado para testar vários aspetos da GEM nas linhas celulares de carcinoma da bexiga, mais estudos são necessários para comprovar algumas conclusões dos mesmos, em particular no que se refere à combinação com outros fármacos, nomeadamente a MMC.

6. Temsirolimus

O Temsirolimus (TEM) foi aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA) e pela “European Medicines Agency” (EMA) para o tratamento de carcinoma de células renais avançado, nos Estados Unidos e na Europa em 2007 (Yuan *et al*, 2009). Além destes, o TEM é usado: carcinoma da bexiga, carcinoma do endométrio e carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (Schedel *et al*, 2011; Strimpakos *et al*, 2009; Yuan *et al*, 2009).

i. Mecanismos de ação

O TEM é um inibidor específico do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e interfere com a síntese de proteínas que regulam a proliferação, o crescimento e a sobrevivência das células tumorais.

O tratamento com TEM leva à paragem do ciclo celular na passagem da fase G₁ para S. Este fármaco liga-se a uma proteína intracelular (proteína de 12 kDa ligante do tacrolimus, FK506 [FKBP-12]) e o complexo proteína-TEM liga-se e inibe a atividade do mTOR que controla a divisão celular (Pópulo, 2011). “In vitro”, em concentrações elevadas (10-20 µM), o TEM pode ligar-se e inibir o mTOR na ausência de FKBP-12. Observa-se uma resposta bifásica à dose na inibição do crescimento celular (Pópulo, 2011). As concentrações elevadas têm como resultado uma inibição completa do crescimento celular “in vitro”, enquanto que a inibição mediada apenas pelo complexo FKBP-12/TEM tem como resultado uma diminuição de, aproximadamente, 50% da proliferação celular. A inibição da atividade do mTOR resulta num atraso da progressão da fase G₁ em concentrações nanomolares e numa suspensão do crescimento em concentrações micromolares das células tumorais tratadas, devido a uma interrupção seletiva da tradução de proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como, ciclina D e c-myc, entre outras. Quando a atividade do mTOR é inibida, a sua capacidade de fosforilar e, por conseguinte, de controlar a atividade dos fatores de tradução das

proteínas que controlam a divisão celular, é bloqueada. Além de regular a síntese das proteínas, o mTOR pode regular, também, a tradução dos fatores induzidos pela hipóxia, fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) e fator indutor de hipóxia 2-alfa (HIF-2 α). Estes fatores de transcrição regulam a capacidade do tumor se adaptar a microambientes de hipóxia e de produzir o VEGF. Assim, o efeito antitumoral do TEM, pode também, em parte, derivar da sua capacidade de diminuir os níveis de HIF e VEGF no tumor ou no microambiente do tumor, comprometendo o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Garcia *et al*, 2008; Nawroth *et al*, 2011; Pópulo, 2011).

ii. TEM e linhas celulares

Em relação a este fármaco, o grupo de Investigação de Patologia (UFP)/Patologia e Terapêutica Experimental (IPOP, EPE), tem investigado a sua eficácia terapêutica de forma isolada ou combinada com linhas celulares de tumores da bexiga, a T24, a 5637 e a HT29, entre outras.

Pinto-Leite e colaboradores (2013) analisaram a ação citotóxica do TEM utilizando três linhas celulares humanas de carcinoma da bexiga (5637, T24 e HT1376) e avaliaram se o TEM potencializava a atividade da GEM e CDDP. Concluíram que o TEM, de forma isolada, contribui, moderadamente, em termos de inibição da proliferação celular, aumento da apoptose e da autofagia. Por outro lado, aferiram que o TEM potencia a atividade da GEM, bem como o tratamento com a CDDP, observando-se inibição da proliferação celular e o aumento do número de células apoptóticas, nas três linhas celulares utilizadas. Desta feita, estes resultados apoiam fortemente a afirmação de que o TEM potencia a eficácia de agentes antineoplásicos para o tratamento do cancro da bexiga (Pinto-Leite *et al*, 2013).

Para além deste trabalho, Merseburger e colaboradores (2012) desenvolveram um estudo que tinha como objetivo medir “in vivo” e “in vitro” o efeito do TEM, a nível molecular, em linhas celulares humanas de carcinoma da bexiga e carcinoma renal. Para a realização deste trabalho as linhas celulares humanas de carcinoma da bexiga usadas foram T24, 5637, RT112, EJ-28, CLS-439, HB-CLS-1, HB-CLS-2. Após o findar do mesmo, sugeriram que a inibição do mTOR em carcinoma da bexiga é um possível alvo para futuros estudos experimentais terapêuticos (Merseburger *et al*, 2012).

Os estudos já realizados permitem constatar que o papel no TEM no tratamento dos CUB não é, ainda, claro. No entanto, há evidências de potenciar o efeito de outros fármacos, nomeadamente a GEM. Contudo, nenhum estudo foi encontrado sobre o seu efeito com a MMC.

7. Everolimus

O Everolimus (EVE) é um derivado oral da rapamicina obtido através da fermentação de estirpes de *Actinomicetos*. O EVE é produzido através da introdução de 2-hidroxi-etil na posição 40 na estrutura da molécula de rapamicina. A rapamicina e o EVE são estruturalmente muito semelhantes e têm o mesmo mecanismo de ação, como inibidores do mTOR. No entanto, o EVE supera os problemas de formulação da rapamicina, mantendo a sua atividade farmacológica. O EVE obteve recentemente aprovação da FDA e da EMEA para o tratamento de carcinoma de células renais avançado, após falha do tratamento com Sunitinib ou Sorafenib (Yuan *et al*, 2009). Além destes, o EVE tem sido testado em linhas celulares de cancro da mama, linfoma, cancro de próstata, cancro gástrico e cancro do endométrio (Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011).

i. Mecanismos de ação

O EVE, como supracitado, é um inibidor do mTOR. O tratamento com EVE leva à paragem do ciclo celular na passagem da fase G₁ para S (Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011). O mTOR é uma cinase serina-treonina essencial cuja atividade se sabe estar desregulada em determinados cancros humanos. O EVE liga-se à proteína intracelular FKBP-12, formando um complexo que inibe a atividade do complexo-1 do mTOR (mTORC1). A inibição da via de sinalização do mTORC1 interfere com a transdução e síntese de proteínas através da redução da atividade da proteína cinase ribossómica S6 (S6K1) e da proteína 1 de ligação do fator inicial de transcrição eucariótico 4E (4EBP-1) que regulam as proteínas envolvidas no ciclo celular, na angiogénese e na glicólise. O EVE reduz os níveis de VEGF, que potencia os processos angiogénicos tumorais. O EVE é um inibidor potente do crescimento e da proliferação das células tumorais, das células endoteliais, dos fibroblastos e das células de músculo liso associadas a vasos sanguíneos e demonstrou-se que reduz a glicólise em tumores sólidos “in vitro” e “in vivo” (Chiong *et al*, 2011; Garcia *et al*, 2008; Nawroth *et al*, 2011; Pinto-Leite *et al*, 2012a; Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011).

ii. EVE e linhas celulares

De forma similar ao TEM, o grupo de Investigação de Patologia (UFP)/Patologia e Terapêutica Experimental (IPOP,EPE), tem investigado o EVE relativamente à sua eficácia terapêutica de forma isolada ou combinada com linhas celulares de tumores da bexiga, a T24, 5637 e HT29, entre outras.

Pinto-Leite e colaboradores (2012) usando duas linhas celulares, T24 e a 5637, verificaram que a combinação do EVE com a GEM produz um efeito anti-proliferativo mais potente quando comparado com os fármacos individuais (Pinto-Leite *et al*, 2012b).

Pinto-Leite e colaboradores (2012) avaliaram, “in vitro”, a capacidade do EVE para aumentar a citotoxicidade da CDDP em três linhas celulares de tumores da bexiga (T24, 5637 e HT1376), de forma isolada ou combinada. Constataram que a atividade anti-proliferativa da CDDP em combinação com EVE era estatisticamente significativa, em todas as concentrações testadas. Assim sendo, estes resultados sugerem que a combinação de CDDP/EVE poderia ser útil para o tratamento de pacientes com cancro da bexiga (Pinto-Leite *et al*, 2012a).

Chiong e colaboradores (2011) investigaram o efeito do EVE em linhas celulares de carcinoma da bexiga, bem como em modelos de ratinhos. Verificaram que o EVE inibe a síntese proteica e o crescimento de células cancerosas da bexiga “in vitro” com doses variando de 0,1 a 100 nmol/l, apresentando, porém alguma heterogeneidade. Relativamente ao modelo de ratinho, averiguaram que o EVE é mais eficaz do que “in vitro”, em parte, por causa das mudanças na angiogénese. Desta maneira os autores concluíram que o EVE afeta o crescimento do tumor através de diferentes mecanismos, dependendo do genótipo das células tumorais da bexiga. Este trabalho aponta que o mTOR é um novo alvo terapêutico para o cancro da bexiga (Chiong *et al*, 2011).

Vasconcelos-Nóbrega e colaboradores (2011) propuseram avaliar a influência do EVE em lesões uroteliais induzidas quimicamente em camundongos e a sua influência sobre as linhas celulares de carcinoma da bexiga, T24, HT1376, e 5637. No término, aferiram que o EVE não parece ter um efeito significativo sobre lesões uroteliais induzidas

quimicamente em camundongos. O efeito do EVE na proliferação e apoptose através das linhas celulares de carcinoma da bexiga é heterogêneo, apresentando apenas efeito nas linhas superficiais (Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011).

Os ensaios já executados possibilitam verificar que a função do EVE no tratamento dos CUB não é, ainda, esclarecedora, variando com o modelo usado (“in vivo” ou “in vitro”) e o tipo de tumores estudados (superficiais ou invasores). Contudo, há evidências de potencializar o efeito de outros fármacos, nomeadamente a GEM, em particular em tumores superficiais. Todavia, nenhum estudo foi encontrado sobre o seu efeito com a MMC.

MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

II. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

Os atuais esquemas terapêuticos recomendados não respondem eficazmente a todos os grupos de cancro da bexiga. Assim sendo, persiste a necessidade de investigar novos fármacos, quer isolados quer em combinação.

A MMC é um dos antineoplásicos mais usados no cancro da bexiga, porém a sua eficácia em termos de controlo da doença está, ainda, por estabelecer, em particular o possível benefício em termos de eficácia/toxicidade, quando combinada com outros fármacos.

O principal objetivo desta dissertação consistiu em verificar algumas características biológicas da linha celular 5637, considerada uma linha derivada do carcinoma superficial de bexiga humana, após exposição à MMC isolada, bem como em combinação com outros fármacos, nomeadamente com EVE, TEM e GEM. Além disso, foi objeto de estudo a linha celular humana de urotélio de bexiga (HCV29) para aferir eventuais alterações no conteúdo de ADN após diferentes tempos de exposição à MMC.

Para que o objetivo principal fosse alcançado, foram estabelecidos vários objetivos específicos:

- Otimizar a concentração e o tempo de exposição à MMC;
- Avaliar o efeito da MMC isolada e conjugada com outros fármacos na linha celular de cancro da bexiga 5637, em termos de viabilidade celular;
- Avaliar o efeito da MMC isolada e conjugada com outros fármacos na linha celular de cancro da bexiga 5637, em termos de alterações no ciclo celular;
- Avaliar o efeito da MMC isolada e conjugada com outros fármacos na linha celular de cancro da bexiga 5637, em termos de percentagem de células em apoptose;
- Avaliar o conteúdo de ADN na linha HCV29 após exposição a diferentes tempos à MMC.

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhas celulares

No presente estudo foram utilizadas as seguintes linhas celulares da bexiga humana: a 5637, linha tumoral (fornecida pela Dra. Paula Videira, da Universidade Nova de Lisboa) e a HCV29, linha celular normal (fornecida pela Dra. Mónica Botelho, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge do Porto).

A linha 5637 e a HCV29 foram cultivadas em monocamada em meio de cultura RPMI 1640 (PAA, Pasching, Austria) suplementados com 10% soro fetal bovino inativado pelo calor (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 100 U/ml de penicilina (Biological Industries), 100 µg/ml de estreptomicina (Biological Industries), e 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). As células foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de dióxido de carbono e foram rotineiramente subcultivadas por tripsinização. Todas as experiências foram realizadas em triplicado, durante o crescimento celular exponencial.

2. Fármacos estudadas

Neste estudo foram utilizadas os seguintes fármacos: MMC, EVE, TEM e GEM.

A MMC foi obtida a partir da Kyowa e dissolvida em água destilada. As suas concentrações variaram entre 1,25 µg/ml e 200 µg/ml.

O EVE foi obtido a partir da Sigma, St. Louis, USA, e dissolvido em etanol. Foram utilizadas duas concentrações 0,05 µM e 2 µM.

O TEM foi obtido a partir da Sigma Aldrich, Portugal e dissolvido em etanol. Foram utilizadas duas concentrações 500 nM e 4000 nM.

A GEM foi obtida a partir da Hospira, Portugal e dissolvida em soro fisiológico. A concentração usada foi de 100 nM.

Os tempos de exposição estão indicados na Tabela 9.

Tabela 9: Tempos de exposição aos diferentes fármacos em estudo.

Fármacos	Tempos de exposição (h)	
MMC	<u>Efeito antineoplásico</u> 1, 2, 3, 24	<u>Alterações do conteúdo de ADN</u> 1, 6, 24, 48 e 72
EVE		72
TEM		72
GEM		72

3. Avaliação do efeito anti-neoplásico da MMC, isolada e em combinação

i. Citotoxicidade celular

A citotoxicidade dos diferentes fármacos foi avaliada pelo ensaio colorimétrico brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O ensaio é baseado na capacidade das enzimas dehidrogenases mitocondriais nas células vivas converterem a solução aquosa do substrato amarelo MTT, sal monotetrazólico, num produto arroxado, designado por cristais de formazan, que é insolúvel em água (Cordeiro, 2007).

Em resumo, as células da linha 5637 e as da linha HCV29 foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura numa concentração de 2×10^4 células/ml. As células foram semeadas numa microplaca de 96 poços (Sarstedt, EUA) e a placa foi incubada por 24h para permitir a aderência das células ao fundo dos poços. Após incubação durante a noite, o meio foi removido e as células foram tratadas com os diferentes fármacos, durante os tempos de exposição atrás referidos (Tabela 9).

Seguidamente, 10 μ l de solução de trabalho do corante MTT (5 mg/ml) foi adicionado a cada poço. Depois de 4h de incubação, o sobrenadante dos poços foi removido e substituído por 100 μ l/poço de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, EUA). O valor da absorvância (Abs) de cada poço foi medido espectrofotometricamente a 492 nm num leitor ELISA (Multiskan EX, Labsystems). O meio contendo corante de tetrazólio, mas sem células (branco), foi utilizado como controlo negativo. Após a correção do branco, a percentagem da viabilidade celular foi determinada como se segue: (Abs do grupo experimental/Abs branco) x 100. A absorvância obtida a partir de células não tratadas foi tomada como 100% de viabilidade celular. Cada experiência foi realizada em triplicado.

ii. Estudo das diferentes fases do ciclo celular e apoptose

No presente trabalho, o estudo das diferentes fases do ciclo celular e células em apoptose foi realizado por citometria de fluxo (CF), na linha celular 5637.

O ciclo celular é um processo através do qual uma célula somática duplica o seu material genético e o distribui igualmente às suas células-filhas. É didaticamente dividido em duas fases principais: a interfase e a mitose. Na interfase ocorre a síntese de diversos constituintes que permitem que a célula entre em divisão celular, ou seja, em mitose, maior intuito do ciclo celular. A interfase pode ser subdividida em 3 fases: G₁ - preparação da síntese de ADN; S - fase da síntese de ADN; G₂ - preparação para a mitose.

O estudo do ciclo celular através da CF, pode ser feito utilizando corantes, por exemplo o iodeto de propídeo (IP), que se intercala com as moléculas de ADN presente no núcleo das células. Esta marcação permite avaliar o conteúdo de ADN de uma forma estequiométrica, isto é, a quantidade de corante é diretamente proporcional à quantidade de ADN no interior da célula em cada uma das fases do ciclo celular (Figura 5).

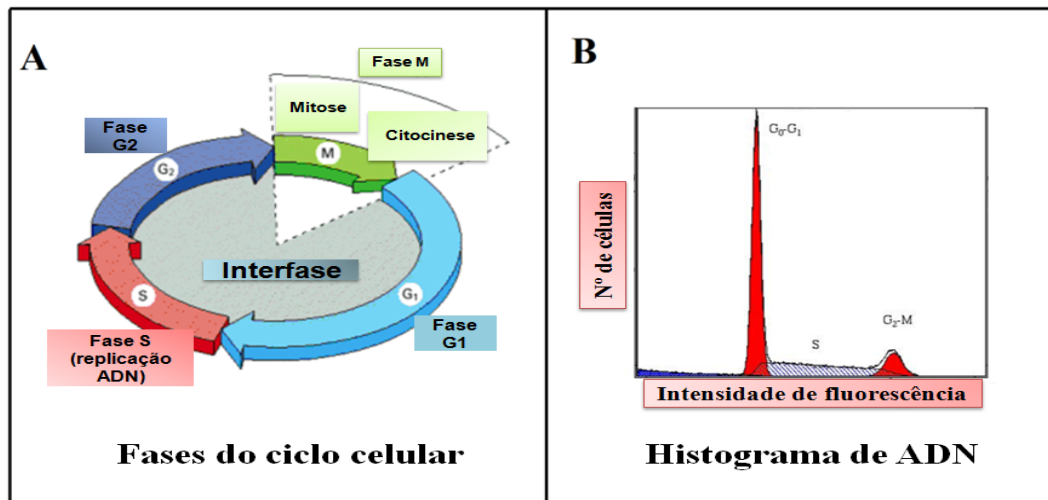


Figura 5: Relação entre o ciclo celular e o histograma de ADN (Adaptado de Ormerod, 2008).

Além da percentagem de células em cada fase do ciclo celular, a técnica de CF permite, ainda, obter informação sobre a ploidia de ADN (Ormerod, 2008). As alterações no conteúdo de ADN são, normalmente, designadas por aneuploidias de ADN e correspondem a um número anormal de cromossomas, refletindo-se por uma variação na quantidade de ADN ao nível do histograma de ADN.

As células denominadas aneuploides, demonstram uma quantidade de ADN discrepante daquela que é detetada nas células normais diplóides. A alteração pode ser por excesso ou por defeito, sendo designadas, respetivamente, por hiperdiploidia ou hipodiploidia de ADN (Ribeiro, 2008; Ormerod, 2008). A aneuploidia é um fenómeno biológico que ocorre frequentemente nos tumores sólidos (Pinto *et al*, 2002). Para se avaliar o grau de alteração é utilizado o Índice de ADN (ID), definido como o quociente entre o pico G_0/G_1 da população em estudo e o pico G_0/G_1 da população normal ou de referência (Ormerod, 2008; Pinto *et al*, 2002).

A qualidade de um histograma de ADN está diretamente relacionada com a largura do pico G₀/G₁, ou seja com o coeficiente de variação (CV) (Ormerod, 2008), sendo este calculado através da fórmula (Palmeira, 1999):

$$CV = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{valor médio do pico}} \times 100$$

Quanto menor for o CV mais precisa é a medição da ploidia de ADN e melhor a estimativa da percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular (Ormerod, 2008). As recomendações internacionais de CF consideram que o CV é um critério fundamental na validação de métodos citológicos e descrevem um intervalo entre 1 e 2% para análises de alta qualidade e 3% como um valor de rotina. No entanto, estabeleceram um CV <5% como critério de aceitação (Ormerod, 1998).

Outro processo celular, não de divisão, mas de morte programada da célula é a apoptose. Este processo é normal, programado e fisiológico, contudo pode, também, ser causado por um estímulo patológico (como a lesão no ADN celular).

A marcação pelo IP permite, também, avaliar a percentagem de células em apoptose. Tal como já referenciado, o IP é uma molécula que se intercala na cadeia dupla de ADN, desde que a membrana celular esteja permeável. Tal propriedade deve-se ao facto de que marcadores de ADN de elevado peso molecular, como o IP, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais da apoptose (Ribeiro, 2008; Ormerod, 2008).

Numa fase tardia da cascata apoptótica, as endonucleases quebram as ligações entre os nucleossomas, unidade fundamental da cromatina. Concludentemente, um grande número de pequenos fragmentos de ADN, cujos tamanhos são oligómeros de cerca de

180 pb, acumulam-se na célula. Estas células podem ser observadas como uma hipodiploidia ou um pico “sub-G₀/G₁” num histograma de ADN, uma vez que são uma sub-população de células com um teor menor de ADN, corpos apoptóticos (Ormerod, 2008).

Para o estudo das diferentes do ciclo celular e apoptose da linha celular 5637, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos, e rejeitado o sobrenadante. Seguidamente, adicionou-se tampão fosfato salino (PBS), centrifugou-se novamente a 1200 rpm, durante 10 minutos e rejeitou-se o sobrenadante. Para a fixação, usou-se álcool a 70%. As amostras foram mantidas a -20°C (até o máximo de 3 dias), até se iniciar a marcação com IP. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 rpm, durante 5 minutos, posteriormente rejeitou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 2 ml de solução isotónica recomendada pelo fabricante do citómetro de fluxo (BD FACSTFlow™, BD Biosciences). Seguidamente, centrifugou-se as células a 2000 rpm, durante 5 minutos, rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 250 µl de solução de marcação de ADN (1 ml de solução stock de 5 mg de IP [Sigma®] em 10 ml de tampão Tris-Mg-Cl₂ + 9 ml de tampão Tris-Mg-Cl₂+ 5 mg de RNAse+ 0,1% de Triton X). Finalmente, incubou-se no escuro, durante 15 minutos. A leitura foi feita utilizando-se o citómetro de fluxo EPICS™ XL-MCL™ (Beckman Coulter, USA), do CERLAB, da Universidade Fernando Pessoa. Pela análise dos histogramas de ADN obtidos foram calculadas a percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular. A percentagem de células em apoptose foi avaliada através da fração de células em sub-G₀/G₁.

4. Alterações do conteúdo de ADN após exposição prolongada à MMC

A avaliação do conteúdo de ADN da linha HCV29 foi realizada por CF, recorrendo à metodologia atrás referida com marcação com IP. Pela análise dos histogramas de ADN foi avaliado não só a percentagem de células em cada umas fases do ciclo celular bem como o ID para cada tempo de exposição à MMC, usando o pico G_0/G_1 do controlo como referência.

De acordo com as diretrizes de CF (Ormerod, 1998), os diplóides de ADN são definidos por:

- 1 pico G_0/G_1
- ID = 1, para CV que não ultrapassem os 3%.

No entanto, dado existirem variações na ligação do corante ao ADN celular, é norma definir um intervalo de diploidia que varia em função dos CV do pico G_0/G_1 . Assim sendo, neste trabalho, foram considerados diplóides os casos em que os valores de ID alternaram entre 0,95-1,05 e aneuplóides os valores fora deste intervalo (Pinto *et al*, 1999).

5. Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise estatística descritiva de todas as variáveis em estudo.

Para análise da significância estatística do ensaio de citotoxicidade celular foi usado a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste por comparação múltipla de Dunnett. Para a análise das várias fases do ciclo celular foi utilizado a ANOVA seguida do teste por comparação múltipla de Dunnett e o método de Tukey. O teste da ANOVA seguida do método de Dunnett foi, também, utilizado para avaliar as alterações do conteúdo de ADN.

Em todas as análises estatísticas foi adotado um valor de significância de 5%, ou seja, foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

O programa de análise estatística utilizado foi o “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS), versão 17.0 (SPSS, Inc., USA).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Otimização da concentração da MMC

Para a otimização da concentração e do tempo de exposição à MMC, utilizou-se o ensaio do MTT, na linha celular tumoral 5637. Dada a grande variabilidade de concentrações e tempos de exposição referidos na bibliografia, conforme atrás referido, realizou-se um primeiro ensaio onde foram testadas as concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$, durante 1h, 2h, 3h e 24h de exposição. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 6.

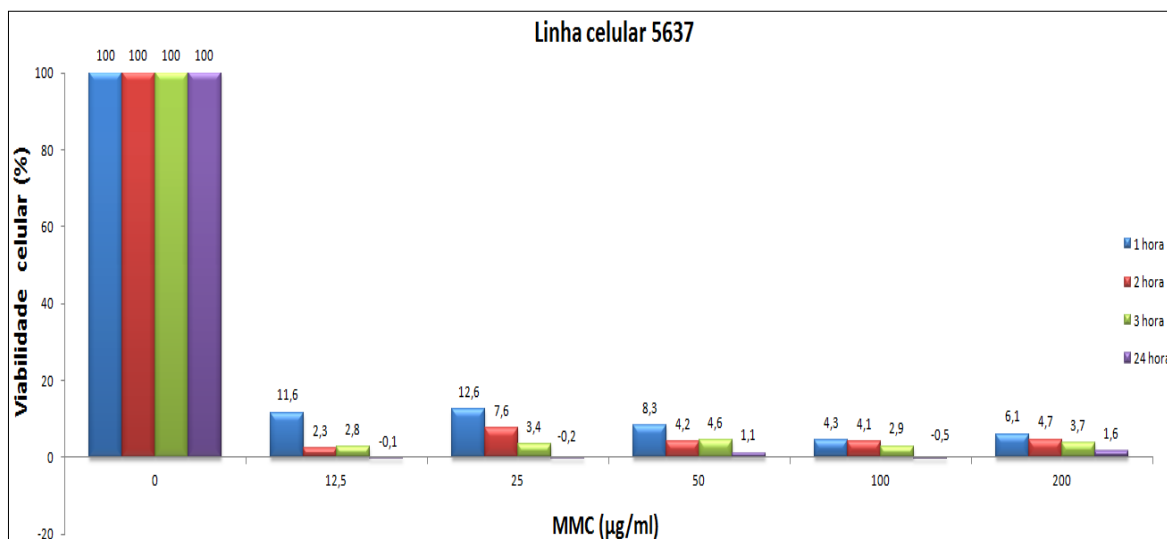


Figura 6: Otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ de MMC durante 1, 2, 3 e 24h. Os valores apresentados correspondem à média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A.

O ensaio de citotoxicidade, revelou um decréscimo acentuado na viabilidade celular das células expostas à MMC, quando comparadas com o grupo controlo. Esta redução foi estatisticamente significativa para todas as concentrações e tempos de exposição estudados ($p < 0,01$). O aumento da citotoxicidade celular variou de forma proporcional com o aumento da concentração e tempo de exposição, observando-se valores quase nulos de viabilidade celular para concentrações de MMC acima das 12,5 $\mu\text{g/ml}$ ou tempos de exposição superiores a 1h (Figura 6).

Atendendo aos resultados acima descritos, decidiu-se testar concentrações mais baixas de MMC (2,5; 5 e 10 µg/ml) e reduzir o tempo de exposição para 1h. Os resultados são apresentados na Figura 7.

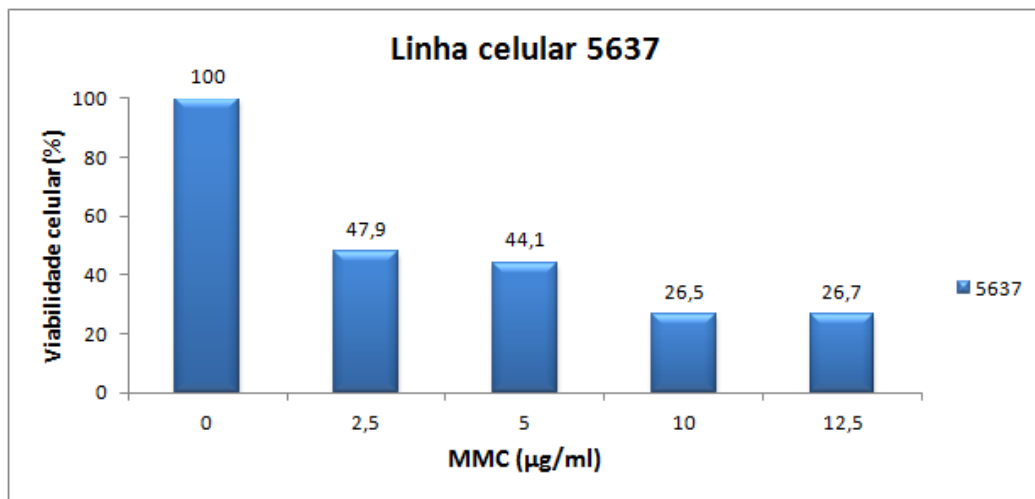


Figura 7: Otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) (0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml/1h). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637. Os valores representam a média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A.

O ensaio do MTT, revelou que todas as concentrações são estatisticamente significativas quando comparadas com o grupo controlo ($p < 0,01$) (Figura 7). Tal como no teste anterior, através desta metodologia, é visível o aumento da citotoxicidade celular com o acréscimo da concentração: 47,9%, 44,1%, 26,5% e 26,7% de viabilidade celular para concentrações de 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml de MMC, respetivamente.

Como o efeito citotóxico foi tão elevado mesmo na concentração mais baixa de MMC (2,5 µg/ml), optou-se por testar concentrações de MMC inferiores. Para tal, e usando a metodologia acima descrita, na linha celular 5637, testou-se a concentração de 1,25 µg/ml. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.

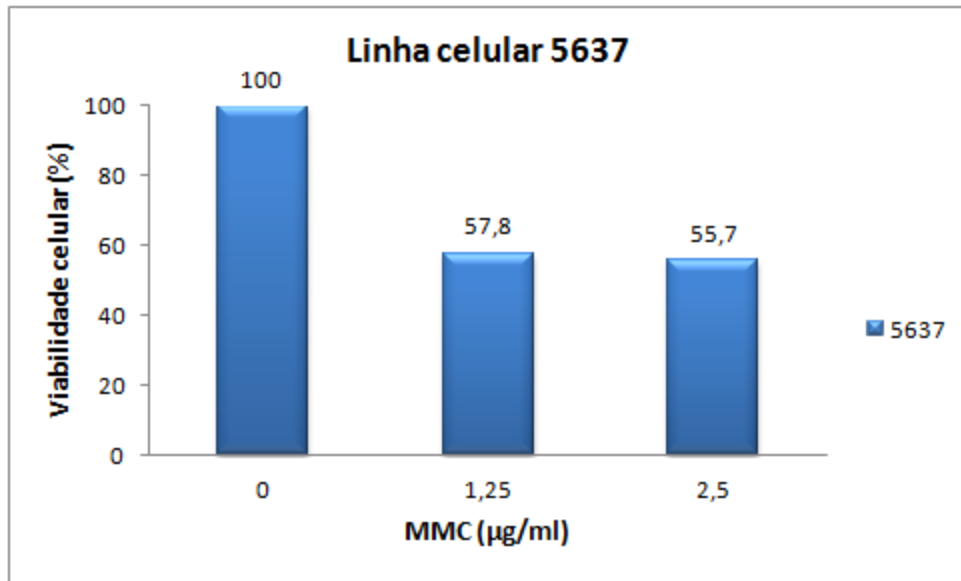


Figura 8: Otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) (0; 1,25 e 2,5 µg/ml/1h). Viabilidade celular avaliada por MTT das células da linha celular 5637. Os valores representam a média de três replicados. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo A.

O ensaio do MTT, revelou um efeito citotóxico significativo nas duas concentrações testadas comparativamente com o controlo ($p=0,001$), embora o efeito citotóxico não tenha sido significativamente diferente ($p=0,974$) entre as duas concentrações testadas (taxas de viabilidade de 57,8% para a concentração de 1,25 µg/ml e 55,7% para a concentração de 2,5 µg/ml). Por este facto, decidiu-se pelo valor mais baixo de MMC para os estudos subsequentes.

2. Avaliação do efeito antineoplásico

Depois de definida a concentração de MMC e o tempo de exposição, pretendeu-se avaliar o efeito antineoplásico deste fármaco (isolada ou em combinação com EVE, TEM e GEM) nas células da linha celular tumoral 5637, medindo a citotoxicidade celular, analisando alterações ao nível do ciclo celular e percentagem de células em apoptose.

i. Citotoxicidade celular na linha 5637

A avaliação da citotoxicidade celular foi realizada pelo teste de MTT. Para tal, expôs-se as células com os diferentes fármacos e diferentes concentrações em comparação com um grupo controlo (sem fármaco) (Figura 9).

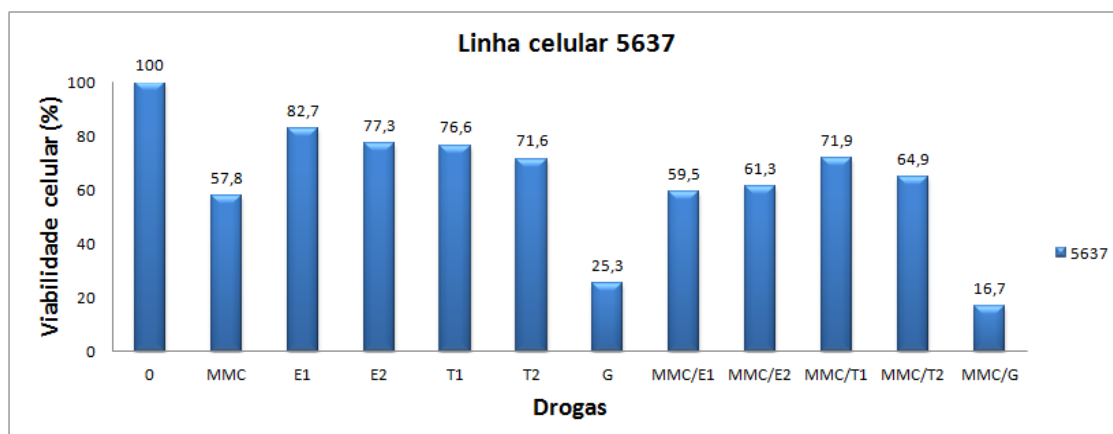


Figura 9: Viabilidade celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. E1: EVE a 0,05 µM/72h; E2: EVE a 2 µM/72h; T1: TEM a 500 nM/72h; T2: TEM a 4000 nM/72h; G: GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo B.

O valor de viabilidade celular das células tratadas com MMC (57,8%) foi significativamente inferior ao controlo ($p < 0,01$). Em relação à conjugação de MMC/EVE e MMC/TEM não se vê aumento deste efeito citotóxico em comparação com os níveis já observados de MMC isolada (Figura 9).

Em contrapartida, os resultados obtidos com a conjugação de MMC/GEM sugerem que a MMC potencia o efeito citotóxico de GEM, como evidenciado pelas taxas de viabilidade de 16,7%.

Relativamente ao EVE e TEM, em qualquer das concentrações testadas, o efeito antineoplásico é muito menor, não se observando taxas de viabilidade significativamente diferentes do controlo ($p=0,42$ e $p=0,17$, respetivamente).

A GEM foi o fármaco com maior efeito citotóxico, especialmente, como atrás referido, quando conjugado com a MMC (Figura 9).

ii. Análise do ciclo celular na linha 5637

A análise da percentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular, abrangendo o controlo e os diferentes fármacos testados, está resumida na Figura 10.

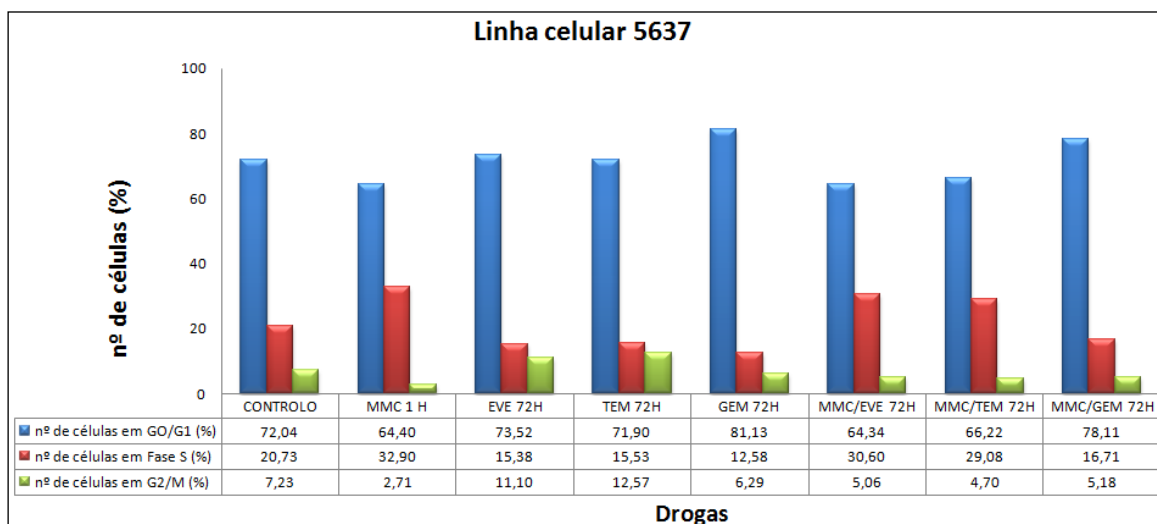


Figura 10: Distribuição do ciclo celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM/72h; GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo C.

As células não tratadas (controlo) estão distribuídas ao longo do ciclo celular com predomínio de fase G₀/G₁: 72%, 20,7% e 7,2% nas fases G₀/G₁, S e G₂/M, respetivamente. Quando as células foram tratadas com a MMC isolada observa-se uma acumulação de células em fase S. Esta acumulação manteve quando se expôs as células à combinação de MMC/EVE e MMC/TEM. Deste modo, aparentemente, esta combinação não incrementa qualquer efeito ao nível do ciclo celular (Figura 10).

Por outro lado, com a combinação de MMC/GEM verifica-se uma acumulação numa fase inicial do ciclo celular: fase G₁ (p=0,05). Esta paragem é igualmente observada quando as células foram tratadas apenas com GEM.

No caso das células expostas a EVE e TEM isolados observa-se diminuição da fase S e uma ligeira paragem em G₂/M (p=0,02 e p<0,01, respetivamente).

iii. Estudo da apoptose na linha 5637

Os resultados da distribuição do ciclo celular da fração sub-G₀/G₁ do controlo e das células tratadas com os diferentes fármacos são apresentados na Figura 11.

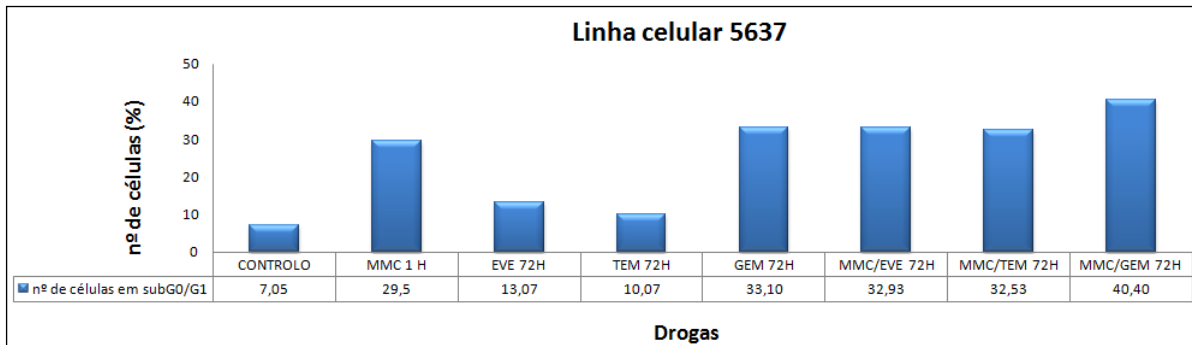


Figura 11: Percentagem de células em apoptose (fração sub-G₀/G₁) da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. Os valores representam a média de três replicados. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM; GEM a 100 nM/72h. Os valores referentes a este gráfico encontram-se no Anexo D.

Um aumento significativo da fração sub-G₀/G₁ (que é considerado por ser relacionado com mecanismo de apoptose) foi encontrado em todos os fármacos testados independentemente de ser de forma isolada ou combinada, exceto para o TEM isolado (p=0,10). Os dados sugerem que o efeito antineoplásico da MMC é potenciado quando em combinação com a GEM (p<0,01). O esquema combinado MMC/EVE e MMC/GEM não parece incrementar o efeito da MMC isolada (p= 0,09 e p=0,16, respetivamente).

Pela análise das três técnicas utilizadas, os resultados sugerem que:

- A MMC isolada tem um efeito antineoplásico visível, com baixas taxas de viabilidade celular, evidenciando uma paragem na fase S do ciclo celular e aumento da percentagem de células em apoptose.
 - Em relação à terapia de combinação MMC/EVE e MMC/TEM não se observa um acréscimo do efeito antineoplásico da MMC.
 - O efeito antineoplásico da MMC é potenciado quando combinada com a GEM, verificando-se os valores mais baixos de viabilidade celular, com paragem do ciclo celular em G_0/G_1 e aumento da percentagem de células em apoptose.
- Quanto à exposição das células com EVE e TEM isoladamente, observa-se um efeito antineoplásico moderado, com um ligeiro aumento da percentagem de células em apoptose (apenas significativo para a exposição com EVE).
- Relativamente à GEM os resultados são sugestivos de que tem um efeito antineoplásico evidente, com paragem do ciclo celular em G_0/G_1 sendo potenciada, como referido anteriormente, pela MMC.

3. Alterações do conteúdo de ADN da linha HCV29 após exposição à MMC

Para avaliar possíveis alterações do conteúdo de ADN na linha HCV29 recorreu-se ao ID, definido como o quociente entre o pico G_0/G_1 da população em estudo e o pico G_0/G_1 da população normal ou de referência.

Utilizando os intervalos de diploidia de ADN descritos no Material e Métodos (0,95-1,05), foram calculados os índices de ADN para cada uma das condições de MMC. Conforme se pode observar na Tabela 10, não foram detetados valores de ID fora do intervalo de diploidia, ou seja, não foram detetadas populações celulares com conteúdo de ADN alterado (aneuploidia de ADN).

Tabela 10: Média dos picos G_0/G_1 e valor do ID da linha celular HCV29, após diferentes tempos de exposição à MMC ([1,25 $\mu\text{g/ml}$]). Os valores representam a média de três replicados.

Linha HCV29		
	Pico G_0/G_1	ID
Controlo	177,50	—
MMC 1 h	186,67	1,05
MMC 6 h	178,33	1,00
MMC 24 h	185,00	1,04
MMC 48 h	179,00	1,00
MMC 72 h	170,67	0,96

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

É reconhecido pela comunidade científica que os CUB constituem um grupo complexo e heterogéneo quer em termos de apresentação e comportamento biológico, quer em termos de prognóstico. Este facto tem levado à necessidade de investigar novos fármacos, quer isolados quer em regime de combinação, que possam ser utilizados para otimizar a terapia para cada paciente. Nesta investigação intensa, têm sido utilizadas diversas estratégias, nomeadamente a utilização de linhas celulares, uma vez que, desempenham um papel substancial no progresso e apreciação pré-clínica de novas estratégias e agentes terapêuticos para o cancro da bexiga.

A terapia de combinação é uma opção relevante em todas as áreas da Medicina, mas, peculiarmente, é aplicada na terapia do cancro. Diversos medicamentos direcionados para distintos alvos terapêuticos podem aperfeiçoar a resposta ao tratamento ou minorar o desenvolvimento da resistência do tumor ou os efeitos secundários.

Como referido anteriormente, a MMC é um fármaco que tem demonstrado atividade anti-tumoral ao nível dos CUB superficiais. Esta é usada como primeira instilação intravesical, até 24h após RTU (Aldousari *et al*, 2006; Pompeo *et al*, 2006) porque comprovadamente diminui o risco de recidiva tumoral (Babjuk *et al*, 2013). Após o resultado anátomo-patológico da RTU do tumor, os doentes são estratificados em termos de risco de recidiva e progressão, classificando os doentes em baixo risco, risco intermédio e alto risco. Assim sendo, após a RTU dos tumores de baixo risco, a MMC é o tratamento preferencial, seguida de esquemas de terapêutica intravesical de manutenção. Nos tumores de risco intermédio, a utilização de MMC intravesical adjuvante em regime de manutenção pode estar indicada, mas apresenta resultados inferiores ao tratamento de manutenção com BCG, em termos de diminuição de risco de recidiva. Mais ainda, a MMC não é aconselhada nos casos de alto risco, sendo estes tipos de tumores melhor tratados com BCG (Babjuk *et al*, 2013).

Pelo acima exposto, os esquemas quimioterápicos atuais no tratamento de cancro da bexiga não invasor são promissores, apesar de existir, ainda, alguma toxicidade considerável associada a alguns esquemas e persistir a ocorrência de recorrências. Este cenário sugere a importância de se investigar uma abordagem terapêutica mais eficaz e menos tóxica para este grupo de doentes com CUB.

Os vários trabalhos que compõem esta dissertação, tiveram como objetivo global verificar algumas características biológicas da linha celular 5637, após exposição à MMC isolada, bem como em combinação com EVE, TEM e GEM, através da determinação da citotoxicidade celular, do estudo do ciclo celular e análise da apoptose. Além disso, foi objeto de estudo, a linha celular HCV29 para aferir eventuais alterações no conteúdo de ADN após diferentes tempos de exposição à MMC.

No início deste estudo foi necessário definir a concentração e o tempo de exposição mais adequada para avaliar o efeito antineoplásico da MMC quer isolada quer em regime de combinação.

Em relação aos efeitos da MMC na linha celular 5637 apenas foram encontrados quatro estudos, os quais utilizaram valores diferentes em relação à concentração e tempo de exposição à MMC, tal como atrás referido. Relativamente à concentração da MMC os valores variaram entre o valor mínimo de 0,33 µg/ml (Kraemer *et al*, 2004; Krause *et al*, 2005) e o valor máximo de 2000 µg/ml (Zhang *et al*, 2012) e o tempo de exposição variou entre 2h (Kraemer *et al*, 2004; Krause *et al*, 2005) e 24h (Li *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2012).

Os primeiros ensaios realizados no âmbito deste trabalho utilizaram valores de concentração e tempos de exposição sobreponíveis aos descritos. No entanto, foi imediatamente constatado uma viabilidade celular quase nula para valores de concentração de MMC superiores a 12,5 µg/ml e tempos de exposição acima de 1h.

Neste processo de otimização, foram testadas concentrações sucessivamente mais baixas, com 1h de exposição, até ser definido o valor de 1,25 µg/ml como a concentração adequada para avaliar o efeito antineoplásico sem provocar a morte da totalidade das células.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a MMC isolada tem um efeito antineoplásico evidente, demonstrando uma redução acentuada na viabilidade celular da linha celular 5637 (taxas de sobrevivência de 57,8%). Estes resultados “in vitro”, são sobreponíveis aos observados “in vivo”, em doentes com CUB que revelam que a MMC é um agente antineoplásico eficaz, bem tolerado e menos tóxico do que a monoterapia com BCG (Chen *et al*, 2012; Kaasinen *et al*, 2003; Oosterlinck *et al*, 2011).

No que diz respeito ao efeito da MMC no ciclo celular, diversos estudos apontam que este fármaco é mais eficaz quando aplicada na fase G₁ tardia e fase S do ciclo celular (Almeida *et al*, 2005; Gan *et al*, 2001; Kraemer *et al*, 2004; Lightfoot *et al*, 2011; Lopez-Beltran *et al*, 2002; McKelvie *et al*, 2001; Netto, 2007; Oliveira *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2012; Zhi *et al*, 2001) e que é capaz de induzir apoptose em células de tumores gástricos (Schwartz *et al*, 1995) bem como em fibroblastos humanos da cápsula de Tenon (Kim *et al*, 1999). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura, observando-se uma acumulação de células em fase S e aumento da percentagem de células em apoptose após exposição ao fármaco.

Em relação à terapia de combinação MMC/EVE e MMC/TEM, em qualquer das concentrações testadas, o efeito antineoplásico é muito menor, não se observando taxas de viabilidade significativamente diferentes relativamente à MMC isolada. Além disso, não se observam diferenças ao nível do ciclo celular e apoptose relativamente à MMC isolada. De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, estes são os primeiros resultados descritos sobre a utilização combinada de MMC e destes dois análogos da rapamicina.

Por outro lado, verificou-se que o efeito antineoplásico da MMC é potenciado quando combinada com a GEM, verificando-se os valores mais baixos de viabilidade celular. Estes resultados corroboram a literatura que afirmam que a terapêutica de combinação MMC/GEM parece ser bem tolerada, produzindo uma resposta positiva em doentes com cancro da bexiga não invasor refratário ao BCG (Breyer *et al*, 2010). Relativamente ao estudo com linhas celulares este efeito sinérgico, também, foi observado na linha celular de carcinoma de cólon humano, a HT29 (Aung *et al*, 2000).

Em relação ao ciclo celular verificou-se uma paragem na fase G_0/G_1 e aumento da percentagem de células em apoptose. Mais uma vez, estes dados são sobreponíveis aos referidos na literatura, nomeadamente no estudo de Ferro e colaboradores (2012). Estes autores observaram, igualmente, uma forte inibição do crescimento celular após ação combinada de sulfato de condroitina (CS) e MMC ou GEM (Ferro *et al*, 2012).

Quanto à exposição da linha celular 5637 com EVE e TEM isoladamente, observa-se um efeito antineoplásico moderado, diminuição da fase S e uma ligeira paragem em G_2/M com um ligeiro aumento da percentagem de células em apoptose (apenas significativo para a exposição com EVE). Os resultados são sobreponíveis aos descritos na literatura. Vasconcelos-Nóbrega e colaboradores (2011) estudaram os efeitos do EVE, “in vivo” com murinos e “in vitro” nas linhas celulares T24, HT1376, e 5637. Verificaram que o EVE não parece ter um efeito significativo sobre a tumorigénese quimicamente induzida na bexiga de murinos (Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011). Adicionalmente, observaram que o EVE conduz a uma diminuição da fase S do ciclo celular apenas se verificando apoptose na linha celular derivada de cancro da bexiga superficial, a 5637. Chiong e colaboradores (2011) sugerem que o EVE é muito heterogéneo “in vitro”. Em relação ao TEM, os dados recentemente publicados do grupo de Investigação de Patologia (UFP)/Patologia e Terapêutica Experimental (IPOP,EPE), sugerem que contribui, de forma moderada, em termos de inibição da proliferação celular, aumento de apoptose e autofagia (Pinto-Leite *et al*, 2013).

Relativamente à GEM os estudos publicados realçam a eficácia no tratamento do cancro da bexiga quer no modelo “in vivo” (Gontero *et al*, 2006; Jones *et al*, 2012; Mattioli *et al*, 2005), quer no “in vitro” (Mey *et al*, 2006; Pinto-Leite *et al*, 2012b; Silva *et al*, 2010, 2012). Esta eficácia também foi verificada neste estudo, uma vez que a GEM isolada apresentou taxas de viabilidade celular de 25,3%. Além do mais, verifica-se, que a GEM é potenciada, como referido anteriormente, pela MMC, evidenciando taxas de viabilidade de 16,7%. Quanto ao ciclo celular, Pauwels e colaboradores (2009) e Pinto-Leite e colaboradores (2012), descrevem uma paragem do ciclo celular na fase S (Pauwels *et al*, 2009; Pinto-Leite *et al*, 2012b). No presente estudo, verificou-se uma acumulação na fase inicial do ciclo celular: fase G₁. Esta paragem é igualmente observada quando as células foram tratadas com a terapia de combinação MMC/GEM.

Relativamente à fração sub-G₀/G₁, observa-se que a GEM aumenta a percentagem de células em apoptose (33,1%), sendo potenciada, como já referido pela MMC (40,4%). Estes resultados são sobreponíveis aos descritos na literatura (Aung *et al*, 2000; Bernardo, 2011; Breyer *et al*, 2010; Gontero *et al*, 2006; Mey *et al*, 2006; Pauwels *et al*, 2009).

Como atrás referido, outro dos objetivos deste trabalho, foi avaliar possíveis alterações no conteúdo de ADN da linha celular da bexiga normal, HCV29, após exposição prolongada à MMC. Oliveira e colaboradores (2007), utilizando um modelo animal de roedores, observaram, após instilações repetidas de MMC, o aparecimento de CIS com alterações ao nível do seu conteúdo de ADN, ou seja aneuploidias (Oliveira *et al*, 2007). Estas aneuploidias revelaram, até, um padrão multiplóide, compatível com grande instabilidade genética própria destas lesões (Palmeira, 2011). No entanto, os dados do presente estudo não revelam alterações do conteúdo de ADN desta linha celular normal da bexiga após exposição à MMC, ou seja, todas as populações celulares tinham um conteúdo de ADN sobreponível ao controlo (diplóide de ADN), mesmo após 72h de exposição. As condições experimentais escolhidas neste trabalho podem não ter sido as mais adequadas para reproduzir o efeito observado no modelo animal por Oliveira e colaboradores (2007), ou seja um modelo “in vivo” e não “in vitro” como no presente estudo (Oliveira *et al*, 2007). Por outro lado, as alterações celulares atribuídas à ação da MMC poderão ser transitórias tal como descrito por McKelvie e colaboradores (2001)

(McKelvie *et al*, 2001). Este autor defendia que as alterações relacionadas após a terapêutica com MMC podiam persistir no epitélio da superfície ocular por pelo menos oito meses após o tratamento com este fármaco. Assim como Demirci e colaboradores (2000) que verificaram que a MMC conduzia a alterações persistentes, mas não clinicamente significativas do epitélio da conjuntiva (Demirci *et al*, 2000).

Apesar das metodologias utilizadas no presente trabalho terem permitido atingir os objetivos inicialmente definidos, ou seja, avaliar a ação antineoplásica da MMC isolada ou combinada, sobre uma linha celular tumoral da bexiga, algumas limitações deste estudo devem ser apontadas.

Os testes “*in vitro*” possuem limitações, não só quando se fazem correlações clínicas, principalmente em relação ao seu benefício em termos de sobrevivência, mas, fundamentalmente, pelas diferenças ao nível do microambiente envolvente às células tumorais, nomeadamente, a ausência do sistema imunitário do hospedeiro, entre outros aspetos (Arantes-Rodrigues *et al*, 2013).

O teste de MTT possui algumas limitações, tais como, o estado fisiológico das células e a variação na atividade de desidrogenase mitocondrial, em diferentes tipos de células. No entanto, e apesar das suas limitações este teste é útil na medição do crescimento celular em resposta a mitogénios, estímulos antigénicos, fatores de crescimento e outros reagentes de promoção de crescimento celular, estudos de viabilidade celular e na derivação de curvas de crescimento de células. Deste modo, este teste foi útil para avaliar a viabilidade celular neste estudo. Alguns autores usam juntamente o termo de viabilidade celular/citotoxicidade celular (Andrade, 2007; Cordeiro, 2007; Pinto Leite *et al*, 2012; Vasconcelos-Nóbrega *et al*, 2011) com proliferação celular (Pinto Leite *et al*, 2012). Neste trabalho, optou-se pelo termo “viabilidade celular”, por nos parecer mais adequado, uma vez que este teste é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais nas células vivas converterem a solução aquosa do substrato amarelo do MTT, sal monotetrazólico, num produto arroxeadado, designado por cristais de formazan, que é insolúvel em água (Cordeiro, 2007).

Para avaliar a proliferação celular devem ser utilizadas outras metodologias, designadamente, o teste de deteção com o anticorpo Ki67, teste colorimétrico com Laranja de Acridina, Bromodeoxiuridina (BrdUrd), ou a percentagem de células em fase S por CF, método usado neste trabalho.

Com efeito, foi possível avaliar o efeito dos fármacos estudados, não apenas na proliferação celular através da percentagem de células em fase S, mas também perceber se ocorria paragem do ciclo celular e em que fase. Conforme se observou esta paragem está intimamente relacionada com a forma de atuação de cada fármaco.

Apesar dos dados facultados por esta aplicação da CF, esta análise em estudos com linhas celulares deve ser feita em conjugação com uma técnica como o MTT, que mede a citotoxicidade, pelo facto de apenas permitir observar o efeito terapêutico nas células viáveis, ou seja, que se encontram em repouso ou em ciclo celular e que poderão representar uma percentagem muito pequena da cultura celular após exposição ao fármaco.

Mais ainda, o teste usado neste trabalho para avaliação da apoptose poderá não ser o mais informativo. Com efeito, a fração sub-G₀/G₁ apresenta algumas limitações importantes. Por um lado, não permite identificar células nas fases iniciais da apoptose, mas apenas as células que já perderam uma quantidade significativa de ADN devido à formação dos corpos apoptóticos. Por outro lado, se as células em fase S ou G₂/M entrarem em apoptose poderão não aparecer representadas nesta região sub-G₀/G₁ (Blizard Institute of Cell and Molecular Science; Tounekti *et al*, 1995). Uma outra limitação desta metodologia é que não permite distinguir células apoptóticas de células necróticas, ou mesmo de fragmentos celulares resultantes do próprio processamento técnico. No entanto, é um método rápido e pouco dispendioso, obtido simultaneamente com o estudo do ciclo celular e, por isso, é utilizado em numerosos artigos científicos (Blizard Institute of Cell and Molecular Science).

Para avaliar a percentagem de células em apoptose poderá ser mais elucidativo a marcação pela anexina V. A anexina V é uma proteína de 36 kDa com ligação a fosfolípidos, dependente de cálcio, que possui afinidade nanomolar para a fosfatidilserina (Ishino *et al*, 2007). A anexina V marcada com fluorocromos é bastante usada para a deteção “in vitro” por CF de células em apoptose, permitindo a distinção das células numa fase inicial e mais tardia da apoptose (Vriens *et al*, 1998). No entanto, esta técnica também tem algumas limitações, principalmente relacionadas com o processo de tripsinização, devido às alterações na membrana causadas por esta técnica.

Outro método alternativo para detetar a fragmentação do ADN envolve a identificação das quebras na cadeia utilizando a técnica de “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling” (TUNEL). A avaliação da fragmentação do ADN pela técnica de TUNEL baseia-se na incorporação de nucleosídeos (d-UTP= 2’desoxiuridina 5’trifosfato) marcados com um corante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína-FITC) na região livre 3’OH das quebras de ADN de cadeia simples ou cadeia dupla. Essa reação é catalisada por uma enzima denominada de “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT), que irá polimerizar os nucleosídeos modificados nas regiões de fragmentação do ADN. A incorporação de d-UTP fluoresceína é, então, amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e medida por microscopia de fluorescência ou por CF. Apesar da técnica de TUNEL ter vindo a ser usada extensivamente, os resultados obtidos por este método devem ser interpretados com cuidado, uma vez que células em necrose e algumas células que não estão em processo de morte celular podem ser detetadas (Hathaway *et al*, 2002). Segundo Florell e colaboradores (2005), esta técnica não é um marcador específico da apoptose, uma vez que pode detetar extremidades livres de ADN, associadas à proliferação celular. Por estas razões, um crescente número de grupos de investigação tem questionado a especificidade e a fiabilidade dos resultados obtidos pela técnica de TUNEL (Florell *et al*, 2005).

CONCLUSÃO

VI. CONCLUSÃO

Pretende-se neste capítulo apresentar, de forma resumida, os resultados mais relevantes observados nos vários trabalhos que compõem a presente dissertação de Mestrado.

- O estudo de otimização da concentração e tempo de exposição à MMC permitiu estabelecer um valor de 1,25 µg/ml, durante 1h, como adequado para futuros estudos com a linha celular tumoral da bexiga 5637;
- A esta concentração e tempo de exposição observou-se uma redução acentuada na viabilidade celular (taxas de viabilidade de 57,8%), o que evidencia o caráter sensível desta linha celular tumoral da bexiga, podendo servir como modelo experimental para o estudo antineoplásico da MMC, quer de forma isolada quer de forma combinada com outros fármacos;
- A MMC isolada tem um efeito antineoplásico visível, com baixas taxas de viabilidade celular, evidenciando uma paragem na fase S do ciclo celular e aumento da percentagem de células em apoptose;
- Em relação à terapia de combinação MMC/EVE e MMC/TEM não se observa um acréscimo do efeito antineoplásico da MMC;
- O efeito antineoplásico da MMC é potenciado quando combinada com a GEM, verificando-se os valores mais baixos de viabilidade celular, com paragem do ciclo celular em G₀/G₁ e aumento da percentagem de células em apoptose;
- Quanto à exposição das células com EVE e TEM isoladamente, observa-se um efeito antineoplásico moderado, com um ligeiro aumento da percentagem de células em apoptose (apenas significativo para a exposição com EVE);

- Relativamente à GEM os resultados são sugestivos de que tem um efeito antineoplásico evidente, com paragem do ciclo celular em G_0/G_1 sendo potenciada, como referido anteriormente, pela MMC;
- A análise do conteúdo de ADN da linha celular da bexiga normal (HCV29) não revelou populações aneuploides após tempos de exposição à MMC de 1h, 6h, 24h, 48h e 72h, não sendo possível confirmar o aparecimento de alterações genéticas após exposição repetida à MMC como descrito na bibliografia;
- As metodologias utilizadas no presente trabalho permitiram atingir os objetivos inicialmente definidos, ou seja, quer avaliar a ação antineoplásica da MMC isolada ou combinada com outros fármacos sobre uma linha celular tumoral da bexiga, quer avaliar possíveis alterações no conteúdo de ADN sobre uma linha celular normal da bexiga;
- No entanto, foram evidenciadas algumas limitações:
 - O presente estudo foi realizado em testes “in vitro”. Estes testes não só limitam as correlações clínicas, principalmente em relação ao seu benefício em termos de sobrevivência, como também, estão sujeitos a contaminações cruzadas, heterogeneidade do microambiente tumoral e falta de vascularização;
 - No presente estudo avaliou-se a viabilidade celular através do teste do MTT, o qual possui algumas limitações nomeadamente, o estado fisiológico das células e a variação na atividade de desidrogenase mitocondrial, em diferentes tipos de células;

- Mais ainda, o teste usado no presente trabalho para avaliação da apoptose (fração sub-G₀/G₁) poderá não ser o mais informativo, uma vez que, não permite identificar células nas fases iniciais da apoptose, nem distinguir, corretamente, células apoptóticas, necróticas ou mesmo fragmentos celulares. Outras técnicas, nomeadamente, a marcação pela anexina V, ou a técnica de TUNEL, poderão ser mais informativas a este nível.

PERSPETIVAS FUTURAS

VII. PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar de se terem atingido os objetivos previamente estabelecidos, os resultados obtidos sugerem a realização de novos ensaios. Por um lado, em termos da caracterização citogenética da linha celular 5637, de maneira a permitir conhecer melhor a sua caracterização histopatológica, ou seja, se efetivamente pode ser considerada uma linha celular tumoral superficial, e por outro lado perceber melhor o comportamento biológico destas células, nomeadamente em termos de sensibilidade aos fármacos estudados.

No que diz respeito à avaliação da percentagem de células em apoptose seria relevante a realização de novos ensaios, com metodologias mais específicas para esta via de morte celular, nomeadamente a marcação com a anexina V, não só para comparar com os resultados atuais, mas também para avaliar uma forma mais precoce da apoptose.

Será importante avaliar o efeito antineoplásico da MMC, quer de forma isolada quer de forma combinada, com modelos “in vivo” tirando partido das vantagens destes modelos sobre os “in vitro”, nomeadamente, a preservação da estrutura tridimensional do tumor, interação entre as células e o microambiente envolvente e avaliação da farmacocinética e toxicidade dos fármacos.

Na sequência destes estudos com modelos “in vivo”, será interessante comparar, numa fase pré-clínica, o tratamento com MMC isolada e MMC/GEM versus BCG.

BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

Addeo, R. *et al.* (2010). Randomized phase III trial on Gemcitabine versus Mytomicin in recurrent superficial bladder cancer: evaluation of efficacy and tolerance. *Journal Of Clinical Oncology*, 28(4), pp. 1-6.

Afonso, J. (2011). Estudo da linfangiogénese e da angiogénese em tumores avançados da bexiga. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Aldousari, S. e Kassouf, W. (2010). Update on the management of non-muscle invasive bladder cancer. *Can. Urol. Assoc. J.*, 4(1), pp. 56-64.

Almeida, V. *et al.* (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, 28(1), pp. 118-129.

American Cancer Society. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cancer.org/cancer/bladdercancer/detailedguide/>>. [Consultado em 22/06/2013].

American Urological Association. [Em linha]. Disponível em <<https://www.auanet.org/education/guidelines/bladder-cancer.cfm>>. [Consultado em 22/06/2013].

Andrade, M. (2007). Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Arantes-Rodrigues, R. *et al.* (2013). *In vitro* and *in vivo* experimental models as tools to investigate the efficacy of antineoplastic drugs on urinary bladder cancer. *Anticancer Res.*, 33(4), pp. 1273-1296.

Aung, TT. *et al.* (2000). Interaction between Gemcitabine and Mitomycin-C *in vitro*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 45(1), pp. 38-42.

Babjuk, M. *et al.* (2013). Guidelines on non-muscle invasive (Ta, T1, CIS) bladder cancer. *European Association of Urology*, 59(4), pp. 584-594.

Babjuk, M. *et al.* (2012). Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer. *European Association of Urology*, pp. 1-36.

Babjuk, M. *et al.* (2008). Guidelines on TaT1 (non-muscle invasive) bladder cancer. *European Association of Urology*, pp. 1-22.

Belcourt, MF. *et al.* (1999). Mitomycin resistance in mammalian cells expressing the bacterial Mitomycin C resistance protein MCRA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, pp. 10489-10494.

Bernardo, C. (2011). Xenotransplante directo de cancro da bexiga em ratinhos imunodeficientes. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.

Blizard Institute of Cell and Molecular Science. [Em linha]. Disponível em <<http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/apoptosis/dnafragmentation/>>. [Consultado em 17/07/2013].

Braasch, MR. *et al.* (2009). Intravesical instillation treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *European Urology Supplements*, 8, pp. 549-555.

Breyer, BN. *et al.* (2010). Sequential intravesical Gemcitabine and Mitomycin C chemotherapy regimen in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol.*, 28(5), pp. 510-514.

Buckley, MT. *et al.* (2007). The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Translational Medicine*, 5(49), pp. 1-12.

Cabrera, R. (2010). “Back to the basics” – o urotélio normal. *In*: Silva, F., Oliveira, P. (Ed.). *Tumores Uroteliais Papilares Vesicais*, pp. 7-11.

Castelo-Branco, N., Figueiredo, P. e Lacerda, M. (2003). MIB-1 and p53 as markers of aggressiveness in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Acta Urológica*, 20(3), pp. 9-18.

Chen, CH. *et al.* (2012). A cocktail regimen of intravesical Mitomycin-C, Doxorubicin, and Cisplatin (MDP) for non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 30(4), pp. 421-427.

Chiong, E. *et al.* (2011). Effects of mTOR inhibitor Everolimus (RAD001) on bladder cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 17, 2863-2873.

Cordeiro, R. (2007). Preparação e caracterização de microsferas para libertação controlada de fármacos em oftalmologia. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Correia, T. *et al.* (2010). Análise retrospectiva do tratamento do carcinoma urotelial superficial de alto risco da bexiga com terapêutica intravesical. *Acta Urológica*, 27(1), pp. 11-18.

Cota, J. (2011). Identificação de proteínas estruturais em tumores de bexiga de bovinos. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica De Lisboa.

Dalbagni, G. *et al.* (2006). Phase II trial of intravesical Gemcitabine in Bacille Calmette-Guérin–refractory transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Clin. Oncol.*, 24, pp. 2729-2734.

Demirci, H., McCormick, S. e Finger, P. (2000). Topical Mitomycin chemotherapy for conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Arch Ophthalmol.*, 118, pp. 885-891.

Elkoushy, MA. (2010). Intravesical Gemcitabine for treatment of superficial bladder cancer not responding to Bacillus Calmette-Guérin vaccine. *African Journal of Urology*, 16(4), pp. 110-116.

Fairey, AS. *et al.* (2012). Neoadjuvant chemotherapy with Gemcitabine/Cisplatin vs. Methotrexate/Vinblastine/Doxorubicin/Cisplatin for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: A retrospective analysis from the University of Southern California. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141776>>. [Consultado em 22/06/2013].

Ferro, M. *et al.* (2012). Chondroitin sulphate enhances the antitumor activity of Gemcitabine and Mitomycin-C in bladder cancer cells with different mechanisms. *Oncol. Rep.*, 27(2), pp. 409-415.

Florell, SR. *et al.* (2005). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi. *Journal of Cutaneous Pathology*, 32(1), pp. 45-49.

Fujiyama, C. *et al.* (2001). Human bladder cancer invasion model using rat bladder *in vitro* and its use to test mechanisms and therapeutic inhibitors of invasion. *British Journal of Cancer*, 84(4), pp. 558–564.

Gan, Y. *et al.* (2001). Expression of DT-diaphorase and cytochrome P450 reductase correlates with Mitomycin C activity in human bladder tumors¹. *Clinical Cancer Research*, 7, pp. 1313–1319.

Garcia, JA. e Danielpour, D. (2008). Mammalian target of rapamycin inhibition as a therapeutic strategy in the management of urologic malignancies. *Mol. Cancer Ther.*, 7, pp. 1347-1354.

Gontero, P. e Tizzani, A. (2007). Intravesical Gemcitabine: State of the Art. *European Urology Supplements*, 6(14), pp.787-816.

Gontero, P. e Frea, B. (2006). Actual experience and future development of Gemcitabine in superficial bladder cancer. *Annals of Oncology*, 17(5), pp. 1-6.

Grossman, HB. *et al.* (2008). Bacillus Calmette-Guérin failures and beyond: contemporary management of non–muscle-invasive bladder cancer. *Reviews in Urology*, 10(4), pp. 281-289.

Guimarães, P. (2007). Estudo molecular de genes envolvidos com adesão celular em câncer de bexiga. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Gunelli, R. *et al.* (2007). Activity of endovesical Gemcitabine in BCG-refractory bladder cancer patients: a translational study. *British Journal of Cancer*, 97, pp. 1499-1504.

Gutiérrez, J. e Salsamendi, A. (2001). Carcinogenesis química. In: Gutiérrez, J. e Salsamendi, A. (Ed.) *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Diaz de Santos, Madrid, pp. 155-177.

Hathaway, TR. e Kuechle, MK. (2002). Apoptosis and cutaneous biology. *Advances in Dermatology*, 18, pp. 287-311.

Hatina, J. *et al.* (2008). Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series. *Urologie A.*, 47(6), pp. 724-734.

Hayes, MC. *et al.* (2001). Cellular resistance to Mitomycin C is associated with overexpression of MDR-1 in a urothelial cancer cell line (MGH-U1). *BJU International*, 87, pp. 245-250.

Heijden, AG. *et al.* (2004). The effect of hyperthermia on Mitomycin-C induced cytotoxicity in four human bladder cancer cell lines. *European Urology*, 46, pp. 670-674.

Ishino, S. *et al.* (2007). ^{99m}Tc-Annexin A5 for noninvasive characterization of atherosclerotic lesions: imaging and histological studies in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 34, pp. 889-899.

Jacobs, BL., Lee, CT. e Montie, JE. (2010). Bladder cancer in 2010 How far have we come? *Ca Cancer J Clin*, 60, pp. 244-272.

Jian, W. *et al.* (2009). Enzastaurin shows preclinical antitumor activity against human transitional cell carcinoma and enhances the activity of Gemcitabine. *Mol. Cancer Ther.*, 8(7), pp. 1772-1778.

Jones, G. *et al.* (2012). Intravesical Gemcitabine for non-muscle invasive bladder cancer. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22259002>>. [Consultado em 22/06/2013].

Kaasinen, E. *et al.* (2003). Alternating Mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma *in situ* of the urinary bladder: a nordic study. *European Urology*, 43, pp. 637-645.

Kaneko, G. *et al.* (2011). Neoadjuvant Gemcitabine plus Cisplatin for muscle-invasive bladder cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 41(7), pp. 908–914.

Kaufman, DS., Shipley, WU. e Feldman, AS. (2009). Bladder cancer. *Lancet*, 374, pp. 239-249.

Kim, JW. *et al.* (1999). Mitomycin C-induced apoptosis in cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Korean J. Ophthalmol.*, 13(1), pp. 7-15.

Kraemer, K. *et al.* (2004). Chemosensitization of bladder cancer cell lines by human telomerase reverse transcriptase antisense treatment. *The Journal Of Urology*, 172, pp. 2023-2028.

Krause, S. *et al.* (2005). Vascular endothelial growth factor antisense pretreatment of bladder cancer cells significantly enhances the cytotoxicity of Mitomycin C, Gemcitabine and Cisplatin. *The Journal Of Urology*, 174, pp. 328-331.

Li, L. *et al.* (2012). Chemotherapy sorting can be used to identify cancer stem cell populations. *Mol. Biol. Rep.*, pp. 1-9.

Lightfoot, AJ., Rosevear, HM. e O'Donnell, MA. (2011). Recognition and treatment of BCG failure in bladder cancer. *The Scientific World Journal*, 11, pp. 602-613.

Lopez-Beltran, A. *et al.* (2004). Urothelial carcinoma *in situ*. In: Eble, J., Sauter, G., Epstein, J. e Sesterhenn, I. (Ed.). *WHO Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon, IARCPress, pp. 119-123.

Lopez-Beltran, A. *et al.* (2002). Changes produced in the urothelium by traditional and newer therapeutic procedures for bladder cancer. *J. Clin. Pathol.*, 55, pp. 641-647.

Maase, H. *et al.* (2000). Gemcitabine and Cisplatin versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 17(17), pp. 3068-3077.

Marušić, Z., Zhang, D. e Krušlin, B. (2009). Bladder cancer therapy related histopathologic changes. *The Open Pathology Journal*, 3, pp. 74-80.

Matheus, W. (2010). Câncer de Bexiga PTa, PTis e PT1. *In: Júnior, A., Filho, M. e Reis, R. (Ed.). Urologia Fundamental*, pp. 158-163.

Matsubara, N, *et al.* (2012). Comparison between neoadjuvant and adjuvant Gemcitabine plus Cisplatin chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127231>>. [Consultado em 23/06/2013].

Mattioli, F. *et al.* (2005). Intravesical Gemcitabine in superficial bladder cancer: a phase II safety, efficacy and pharmacokinetic study. *Anticancer Research*, 25, pp. 2493-2496.

McKelvie, PA. e Daniell, M. (2001). Impression cytology following Mitomycin C therapy for ocular surface squamous neoplasia. *Br. J. Ophthalmol.*, 85, pp. 1115-1119.

Merseburger, AS. *et al.* (2012). Molecular characterization of Temsirolimus-induced response in human renal and bladder cancer cell lines. *J. Clin. Oncol.*, 5(295), pp. 1-9.

Mey, V. *et al.* (2006). *In vitro* synergistic cytotoxicity of Gemcitabine and Pemetrexed and pharmacogenetic evaluation of response to Gemcitabine in bladder cancer patients. *British Journal of Cancer*, 95, pp. 289-297.

Montella, L. *et al.* (2008). Intravesical Gemcitabine versus Mitomycin for recurrent superficial bladder tumors (Stages pTa and pT1): A randomized prospective study. *J. Clin. Oncol.*, 26(15).

Morales, A., Eidinger, D. e Bruce, AW. (1976). Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 116(2), pp. 180-183.

Murphy, WM., Soloway, MS. e Crabtree, WN. (1981). The morphologic effects of Mitomycin C in mammalian urinary bladder. *Cancer*, 47(11), pp. 2567-2574.

Nawroth, R. *et al.* (2011). S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer. *Plos One*, 6(11), pp. 1-11.

Nese, N. *et al.* (2009). Carcinoma *in situ* of the urinary bladder: review of clinicopathologic characteristics with an emphasis on aspects related to molecular diagnostic techniques and prognosis. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 7(1), pp. 48-57.

Neshati, V. *et al.* (2009). Cytotoxicity of Vincristine on the 5637 cell line is enhanced by combination with Conferone. *Z. Naturforsch C.*, 64(5-6), pp. 317-322.

Netter, F. (2003). Pelve e Péríneo. In: Netter, F. (Ed.). *Atlas de Anatomia Humana*. 3ª Edição. Porto Alegre, Artmed, p. 353.

Netto, M. (2007). Efeitos do uso tópico da Mitomicina C na prevenção e tratamento da opacidade corneana em coelhos submetidos à ceratectomia fotorrefrativa. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Oliveira, JC. *et al.* (2011). MicroRNA-100 acts as a tumor suppressor in human bladder carcinoma 5637 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, pp. 3001-3004.

Oliveira, P. *et al.* (2007). Cell proliferation and DNA content in rat urothelial lesions after repeat intravesical instillations of Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guérin. *Urologia Internationalis*, 182, pp. 1-8.

Oliveira, P. (2006a). Cancerização experimental do urotélio do rato. Tese de Doutoramento, Universidade da Trás-os-Montes e Alto Douro.

Oliveira, P. *et al.* (2006b). DNA content analysis, expression of ki-67 and p53 in rat urothelial lesions induced by N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine and treated with Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guérin. *Anticancer Research*, 26, pp. 2995-3004.

Oliveira, P. *et al.* (2005). Evaluation of DNA content in preneoplastic changes of mouse urinary bladder induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) Nitrosamine. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 24(4), pp. 609-616.

Oosterlinck, W. *et al.* (1998). Guideline on bladder cancer. *European Association of Urology*, pp. 1-30.

Oosterlinck, W. *et al.* (2011). Sequential intravesical chemoimmunotherapy with Mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin and with bacillus Calmette-Guérin alone in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder: results of an EORTC genitourinary group randomized phase 2 trial (30993). *Eur. Urol.*, 59(3), pp. 438-446.

Ormerod, M. (2008). "Cell death, including apoptosis". In: Ormerod, M. (Ed.). *Flow Cytometry - A Basic Introduction*. [Em linha]. Disponível em <http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_9%3A_Cell_Death,_Including_Apoptosis>. [Consultado em 23/06/2013].

Ormerod, M. (2008). "DNA Analysis". In: Ormerod, M. (Ed.). *Flow Cytometry - A Basic Introduction*. [Em linha]. Disponível em

<http://flowbook.denovosoftware.com/Flow_Book/Chapter_6%3a_DNA_Analysis>.

[Consultado em 23/06/2013].

Ormerod, MG., Tribukaitb, B. e Giarrettic, W. (1998). DNA consensus in flow cytometry. *Analytical Cellular Pathology*, 17, pp. 103-110.

Palmeira, C. *et al.* (2011). CIS is a surrogate marker of genetic instability and field carcinogenesis in the urothelial mucosa. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 29(2), pp. 205-211.

Palmeira, C. (2010). Estudo comparativo entre o carcinoma urotelial da bexiga no homem e o carcinoma urotelial induzido quimicamente em roedores (murganho e rato). Tese de Doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Palmeira, C. (1999). Conteúdo de ADN no carcinoma da mama: associação com variáveis clínico-patológicas. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Pauwels, B. *et al.* (2009). The role of apoptotic cell death in the radiosensitising effect of Gemcitabine. *British Journal of Cancer*, 101, pp. 628-636.

Penketh, PG. *et al.* (2001). Inhibition of DNA cross-linking by Mitomycin C by peroxidase mediated oxidation of Mitomycin C hydroquinone. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276(37), pp. 34445-34452.

Pinto, AE., Fonseca, I. e Soares, J. (2002). Citometria de fluxo do ADN em tumores sólidos. *Acta Médica Portuguesa*, 15, pp. 133-142.

Pinto, AE., Saudade, A. e Soares, J. (1999). Short term significance of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic markers in a series of 308 patients. *J. Clin. Pathol.*, 52, pp. 604-611.

Pinto-Leite, R. *et al.* (2013). Temsirolimus improves cytotoxic efficacy of Cisplatin and Gemcitabine against bladder-cancer cell lines. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, pp. 1-14.

Pinto-Leite, R. *et al.* (2012a). Everolimus combined with Cisplatin has a potential role in treatment of urothelial bladder cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 67(2), pp. 116-121.

Pinto-Leite, R. *et al.* (2012b). Everolimus enhances Gemcitabine-induced cytotoxicity in bladder-cancer cell lines. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 75, pp. 1-12.

Piovesan, L. (2011). Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e seus reguladores no câncer de bexiga. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Pompeo, A. *et al.* (2008). Câncer de bexiga – estadiamento e tratamento I. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 54(3), pp. 189-201.

Pompeo, L. *et al.* (2006). Câncer de Bexiga - Parte I. *Sociedade Brasileira de Urologia*, pp. 1-14.

Pópulo, H. (2011). Relevance of mTor pathway in the initiation/progression of human tumours. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Ribeiro, N. (2008). Avaliação do conteúdo de ADN nos Linfomas Não-Hodgkin de células B. Monografia de Licenciatura, Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde.

RORENO – Registo Oncológico Regional do Norte. (2007). Ed. Instituto Português de Oncologia do Porto.

Santo, L. (2001). Aplicação de métodos semiempíricos ao estudo da estrutura eletrônica de compostos bioativos. Tese de Doutorado, Instituto de Física Gleb Wataghin da Universidade Estadual de Campinas.

Schedel, F. *et al.* (2011). mTOR inhibitors show promising in vitro activity in bladder cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 25, pp. 763-768.

Sheldon, PJ. *et al.* (1997). Characterization of a Mitomycin-binding drug resistance mechanism from the producing organism, *Streptomyces lavendulae*. *Journal Of Bacteriology*, pp. 1796-1804.

Schwartz, GK. *et al.* (1995). Potentiation of apoptosis by treatment with protein kinase-c specific inhibitor safinol in Mitomycin C treated gastric cancer cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 87, pp. 1394-1399.

Silva, GN. *et al.* (2012). Toxicogenomic activity of Gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. *Mol. Biol. Rep.*, 39, pp. 10373-10382.

Silva, GN. *et al.* (2010). Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with Cisplatin and Gemcitabine. *Experimental Biology and Medicine*, 235, pp. 814-824.

Solomon, E. (2008). *Introduction to human anatomy and physiology*. Saunders.

Strimpakos, AS. *et al.* (2009). The role of mTOR in the management of solid tumors: An overview. *Cancer Treatment Reviews*, 35, pp. 148-159.

The International Agency for Research on Cancer-France GLOBOCAN. [Em linha]. Disponível em <<http://www-dep.iarc.fr>>. [Consultado em 21/02/2013].

Tobias-Machado, M. *et al.* (2009). O que nós aprendemos após 30 anos de terapia intravesical com BCG no tratamento do câncer de bexiga superficial? *Einstein*, 7, pp. 515-519.

Tounekti, O., Belehradek, J. Jr. e Mir, LM. (1995). Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 217(2), pp. 506-516.

Urdaneta, G., Solsona, E. e Palou, J. (2008). Intravesical chemotherapy and BCG for the treatment of bladder cancer: evidence and opinion. *European Urology Supplements*, 7, pp. 542-547.

Vasconcelos-Nóbrega, C. *et al.* (2011). *In vivo* and *in vitro* effects of RAD001 on bladder cancer. [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169072>>. [Consultado em 05/06/2013].

Vriens, PW. *et al.* (1998). The use of technetium Tc 99m annexin V for *in vivo* imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*, 116, pp. 844-853.

Wu, XR. (2009). Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev.*, 28, pp. 281-290.

Youssef, RF. e Lotan, Y. (2011). Predictors of outcome of non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *The Scientific World Journal*, 11, pp. 369-381.

Yuan, R. *et al.* (2009). Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 2(45), pp. 1-12.

Yuh, BE. *et al.* (2013). Pooled analysis of clinical outcomes with neoadjuvant Cisplatin and Gemcitabine chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *J. Urol.*, 189(5), pp. 1682-1686.

Zhang, CH. *et al.* (2012). Engagement of integrin $\beta 1$ induces resistance of bladder cancer cells to Mitomycin-C. *Urology*, 79(3), pp. 638-643.

Zhao, W. *et al.* (2000). Role of a Bacillus Calmette-Guérin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *Int. J. Cancer*, 86, pp. 83-88.

Zhi, SH., Wu, SF. e Tu, ZH. (2001). Blockage of IGF-1R signaling sensitizes urinary bladder cancer cells to Mitomycin-mediated cytotoxicity. *Cell Research*, 11(2), pp. 107-115.

Zhu, Y. *et al.* (2011). ncRAN, a newly identified long noncoding RNA, enhances human bladder tumor growth, invasion, and survival. *Urology*, 77(2), pp. 510-515.

ANEXOS

Índice de Anexos

1. Anexo A - Otimização da concentração da MMC _____	93
2. Anexo B - Avaliação do efeito antineoplásico - Citotoxicidade celular na linha 5637 _____	97
3. Anexo C - Avaliação do efeito antineoplásico - Análise do ciclo celular na linha 5637 _____	98
4. Anexo D - Avaliação do efeito antineoplásico - Estudo da apoptose na linha celular 5637 _____	99

IX. ANEXOS

1. Anexo A - Otimização da concentração da MMC

Os seguintes valores são referentes à Figura 6.

Tabela 11: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 1h.

Exposição 1h							
Concentração (µg/ml)							
	Branco	0	12,5	25	50	100	200
	0,077	0,812	0,173	0,193	0,164	0,113	0,134
		0,889	0,192	0,134	0,132	0,107	0,119
		0,908	0,144	0,205	0,133	0,115	0,123
Média		0,870	0,170	0,177	0,143	0,112	0,125
Desvio padrão		0,051	0,024	0,038	0,018	0,004	0,008
Média-branco		0,793	0,093	0,100	0,066	0,035	0,048
Viabilidade (%)		100,000	11,627	12,589	8,281	4,349	6,064

Tabela 12: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 2h.

Exposição 2h							
Concentração (µg/ml)							
	Branco	0	12,5	25	50	100	200
	0,077	0,885	0,096	0,128	0,112	0,110	0,113
		0,887	0,099	0,161	0,109	0,106	0,109
		0,884	0,092	0,124	0,111	0,113	0,121
Média		0,885	0,096	0,138	0,111	0,110	0,114
Desvio padrão		0,002	0,004	0,020	0,002	0,004	0,006
Média-branco		0,808	0,019	0,061	0,034	0,033	0,037
Viabilidade (%)		100,000	2,309	7,505	4,165	4,051	4,619

Avaliação do efeito da Mitomicina C em células uroteliais da bexiga

Tabela 13: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 3h.

Exposição 3h							
Concentração (µg/ml)							
	Branco	0	12,5	25	50	100	200
	0,077	0,833	0,098	0,105	0,110	0,098	0,105
		0,838	0,097	0,084	0,110	0,091	0,098
		0,820	0,100	0,119	0,115	0,108	0,111
Média		0,830	0,098	0,103	0,112	0,099	0,105
Desvio padrão		0,09	0,002	0,018	0,003	0,009	0,007
Média-branco		0,753	0,021	0,026	0,035	0,022	0,028
Viabilidade (%)		100,000	2,832	3,407	4,602	2,920	3,673

Tabela 14: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração e tempo de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/ml de MMC, durante 24h.

Exposição 24h							
Concentração (µg/ml)							
	Branco	0	12,5	25	50	100	200
	0,077	0,808	0,078	0,075	0,084	0,074	0,089
		0,745	0,077	0,076	0,086	0,074	0,088
		0,727	0,074	0,075	0,084	0,073	0,086
Média		0,760	0,076	0,075	0,085	0,074	0,088
Desvio padrão		0,043	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002
Média-branco		0,683	-0,001	-0,002	0,008	-0,003	0,011
Viabilidade (%)		100,000	-0,098	-0,244	1,122	-0,488	1,562

Os seguintes valores são referentes à Figura 7.

Tabela 15: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml de MMC, durante 1h. Placa A.

Exposição 1h - Placa A						
Concentração (µg/ml)						
	Branco	0	2,5	5	10	12,5
	0,082	0,583	0,331	0,301	0,244	0,219
		0,595	0,299	0,293	0,234	0,220
		0,589	0,343	0,294	0,245	0,238
Média		0,589	0,324	0,296	0,241	0,2267
Desvio padrão		0,008	0,023	0,004	0,006	0,011
Média-branco		0,507	0,242	0,214	0,159	0,144
Viabilidade (%)		100,000	47,809	42,209	31,361	28,337

Tabela 16: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 2,5; 5; 10 e 12,5 µg/ml de MMC, durante 1h. Placa B.

Exposição 1h - Placa B						
Concentração (µg/ml)						
	Branco	0	2,5	5	10	12,5
	0,088	0,515	0,293	0,289	0,208	0,205
		0,517	0,295	0,287	0,178	0,202
		0,516	0,293	0,280	0,157	0,178
Média		0,516	0,294	0,285	0,181	0,195
Desvio padrão		0,001	0,001	0,005	0,026	0,015
Média-branco		0,428	0,206	0,197	0,093	0,107
Viabilidade (%)		100,000	48,053	46,106	21,729	25,000

Os seguintes valores são referentes à Figura 8.

Tabela 17: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à otimização da concentração de exposição à Mitomicina C (MMC) das células da linha celular 5637 após exposição a 0; 1,25 e 2,5 µg/ml de MMC, durante 1h.

Exposição 1h				
Concentração (µg/ml)				
	Branco	0	1,25	2,5
	0,068	0,721	0,412	0,481
		0,721	0,483	0,440
		0,719	0,441	0,374
Média		0,721	0,445	0,432
Desvio padrão		0,001	0,036	0,054
Média-branco		0,653	0,377	0,364
Viabilidade (%)		100,000	57,585	55,692

2. Anexo B - Avaliação do efeito antineoplásico - Citotoxicidade celular na linha 5637

Os seguintes valores são referentes à Figura 9.

Tabela 18: Média, desvio padrão, média-branco e percentagem de viabilidade celular referentes à exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. E1: EVE a 0,05 µM/72h; E2: EVE a 2 µM/72h; T1: TEM a 500 nM/72h; T2: TEM a 4000 nM/72h; G: GEM a 100 nM/72h.

	Branco	0	MMC	E1	E2	T1	T2	G	MMC/E1	MMC/E2	MMC/T1	MMC/T2	MMC/G
	0,068	0,721	0,412	0,544	0,496	0,605	0,522	0,219	0,451	0,431	0,516	0,483	0,171
		0,721	0,483	0,672	0,642	0,531	0,556	0,235	0,544	0,495	0,548	0,522	0,190
		0,719	0,441	0,609	0,581	0,569	0,529	0,245	0,374	0,478	0,549	0,470	0,170
Média		0,721	0,445	0,608	0,573	0,568	0,536	0,233	0,456	0,468	0,538	0,492	0,177
Desvio padrão		0,000	0,036	0,064	0,073	0,037	0,018	0,013	0,085	0,033	0,019	0,027	0,011
Média-branco		0,653	0,377	0,540	0,505	0,500	0,468	0,165	0,388	0,400	0,470	0,4224	0,109
Viabilidade (%)		100,000	57,785	82,746	77,335	76,621	71,618	25,268	59,469	61,256	71,924	64,880	16,692

3. Anexo C - Avaliação do efeito antineoplásico - Análise do ciclo celular na linha 5637

Os seguintes valores são referentes à Figura 10.

Tabela 19: Média, desvio padrão e distribuição do ciclo celular da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM/72h; GEM a 100 nM/72h.

Caso	Sub-G ₀ /G ₁ A	Sub-G ₀ /G ₁ B	Sub-G ₀ /G ₁ C	Média	Desvio padrão	FaseSA	FaseSB	FaseSC	Média	Desvio padrão	G2MA	G2MB	G2MC	Média	Desvio padrão
CONTROLO	70,616	73,462	72,050	72,043	1,423	21,801	19,662	20,720	20,728	1,069	7,583	6,878	7,230	7,230	0,354
MMC 1 H	60,615	65,602	66,972	64,397	3,346	36,018	31,785	30,887	32,897	2,740	3,367	2,612	2,141	2,707	0,619
EVE 72H	73,196	74,003	73,367	73,522	0,425	15,206	15,058	15,877	15,380	0,446	11,598	10,940	10,755	11,098	0,443
TEM 72H	75,286	69,240	71,170	71,899	3,088	14,989	16,271	15,320	15,526	0,666	9,725	14,489	13,510	12,575	2,516
GEM 72H	81,956	80,029	81,392	81,125	0,991	11,295	13,837	12,621	12,585	1,272	6,749	6,134	5,987	6,290	0,404
MMC/EVE 72H	62,003	64,852	66,156	64,337	2,124	32,990	30,793	28,025	30,602	2,488	5,007	4,355	5,819	5,060	0,734
MMC/TEM 72H	62,667	67,945	68,045	66,219	3,077	32,741	27,147	27,345	29,078	3,174	4,593	4,908	4,610	4,704	0,177
MMC/GEM 72H	77,295	79,062	77,963	78,107	0,892	17,195	15,578	17,362	16,712	0,986	5,509	5,360	4,674	5,181	0,445

4. Anexo D - Avaliação do efeito antineoplásico - Estudo da apoptose na linha celular 5637

Os seguintes valores são referentes à Figura 11.

Tabela 20: Média, desvio padrão e percentagem de células em apoptose (fração sub-G₀/G₁) da linha 5637 após exposição à Mitomicina C (MMC) (1,25 µg/ml/1h), de forma isolada ou combinada com EVE, TEM e GEM. EVE a 0,05 µM/72h; TEM a 500 nM; GEM a 100 nM/72h.

Caso	Sub-G₀/G₁A	Sub-G₀/G₁B	Sub-G₀/G₁C	Média	Desvio padrão
CONTROLO	7,800	6,300	7,040	7,047	0,750
MMC 1 H	28,600	30,200	29,700	29,500	0,819
EVE 72H	13,100	13,200	12,900	13,067	0,153
TEM 72H	10,100	9,800	10,300	10,067	0,252
GEM 72H	31,500	33,300	34,500	33,100	1,510
MMC/EVE 72H	31,800	31,700	35,300	32,933	2,050
MMC/TEM 72H	31,300	33,700	32,600	32,533	1,201
MMC/GEM 72H	40,800	42,100	38,300	40,400	1,931