

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Indução química e hormonal de cancro da próstata em ratos
Wistar Unilever e a sua correlação com os efeitos do exercício
físico – Potencial terapia auxiliar**

Dissertação de Mestrado em Biologia

Miguel Ângelo Correia Cardoso

Orientadora:

Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira

Coorientador:

Professor Doutor Mário Manuel Dinis Ginja



VILA REAL, 2018

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Indução química e hormonal de cancro da próstata em ratos
Wistar Unilever e a sua correlação com os efeitos do exercício
físico – Potencial terapia auxiliar**

Dissertação de Mestrado em Biologia

Miguel Ângelo Correia Cardoso

Orientadora

Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Coorientador

Professor Doutor Mário Manuel Dinis Ginja
Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Composição do Júri:

Professora Doutora Ana Isabel Rocha Faustino
Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

VILA REAL, 2018

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/DTP-DES/6077/2014), e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE 2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) (POCI-01-0145-FEDER-016728).

Declaro que esta dissertação de mestrado é resultado da minha pesquisa e trabalho pessoal e das instruções dos meus orientadores. O seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia. Declaro ainda que este trabalho não foi apresentado em nenhuma outra instituição para obtenção de qualquer grau académico.

*“One thing I have learned in a long life:
that all our science, measured against
reality, is primitive and childlike – and yet
it is the most precious thing we have.”*

Albert Einstein

Agradecimentos

A presente dissertação é o conjunto de vários esforços e dedicação. Este trabalho não seria possível de concretizar sem o apoio direto ou indireto de várias pessoas e instituições. Sendo assim quero apelar os meus profundos agradecimentos:

À *Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro*, na pessoa do seu *Magnífico Reitor, Professor Catedrático António Augusto Fontaínhas Fernandes*, por possibilitar as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À *Professora Doutora Paula Oliveira*, orientadora desta dissertação, pela oportunidade de desenvolver experiências e aptidões na minha área de interesse, por todo o apoio, dedicação e simpatia que sempre mostrou desde o primeiro dia.

Ao *Professor Doutor Mário Ginja*, coorientador do presente trabalho por toda a disponibilidade, apoio e empenho.

À *Doutora Ana Faustino* por toda simpatia e disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas no trabalho.

À *Professora Doutora Maria João Pires* e ao *Professor Doutor Bruno Colaço*, por toda a ajuda disponibilizada durante o trabalho.

À Coordenadora do Curso de Mestrado de Biologia, *Professora Doutora Sandra Monteiro*, pelo seu empenho para com os alunos, pela amizade e ajuda e também à anterior diretora de curso, *Professora Doutora Ana Sampaio*, por toda a dedicação enquanto diretora do mesmo.

Aos meus *pais, avós e irmão*, um enorme obrigado por sempre confiar nas minhas capacidades, pelo apoio e carinho prestados ao longo de toda vida, sendo impossível chegar a onde cheguei sem a vossa ajuda.

Aos meus colegas da dissertação *Magda Moutinho, Milene Ribeiro e Carolina Fonseca*, que me acompanharam ao longo da dissertação, mostrando sempre um apoio e simpatia, sendo a melhor equipa de trabalho.

À *Verónica Mestre, Beatriz Fonseca* e ao *Sr. Emanuel Fernando* por toda simpatia e boa disposição.

Aos meus amigos pela amizade fornecida ao longo do percurso académico.

À *Carolina Rodrigues* pelo todo apoio incondicional e carinho prestado ao longo do percurso académico, sendo assim capaz de ultrapassar qualquer dificuldade.

Resumo

O cancro da próstata (CP) assume a quarta posição ao nível de incidência global de neoplasias pela *World Health Organization* (WHO). Vários modelos animais foram desenvolvidos para estudar o CP. Está disponível literatura científica sobre a aplicação do exercício físico como uma terapia auxiliar à doença, mas os mecanismos biológicos subjacentes ainda não foram descritos. A ultrassonografia é uma componente da imagiologia importante para monitorizar diversas doenças, nomeadamente o CP. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar e monitorizar por ultrassonografia o protocolo de indução de CP em animais de laboratório e compreender a influência do exercício na sua evolução.

Para se alcançarem os objetivos propostos recorremos a um modelo animal de indução de CP, com ratos *Wistar*, através da administração sequencial de flutamida (fármaco anti-androgénio), propionato de testosterona, N-metil-N-nitrosureia (MNU) e a colocação de implantes de testosterona cristalina. Usaram-se 41 ratos de sexo masculino Wistar Unilever, distribuídos aleatoriamente por quatro grupos experimentais: grupo I, composto por 10 animais de controlo sedentários; grupo II, por 10 animais controlo exercitados; grupo III, por 10 animais induzidos ao CP sedentários; e um grupo IV, por 11 animais com CP induzido e exercitados. Os grupos II e IV foram submetidos a um plano de exercício crónico de corrida em tapete rolante. A massa corporal dos animais foi determinada e os consumos de água e comida registados periodicamente. A próstata de cada animal foi monitorizada nas semanas 12, 15, 21, 32 de vida, usando o modo B de ultrassonografia e na semana 35, pela técnica descrita e pelo modo de Contraste. Na semana 35 de vida, os animais foram sacrificados e realizou-se uma necrópsia completa, sendo recolhidos todos os órgãos e registadas as suas massas.

Na semana 35, o valor médio da massa corporal dos animais exercitados (II e IV) foi inferior ($p < 0,05$) aos animais sedentários (I e III). O protocolo de indução de CP não promoveu diferenças significativas na massa corporal ($p > 0,05$). Os animais induzidos (III e IV) apresentaram uma dimensão prostática superior e uma ecogenicidade inferior ($p < 0,05$) em comparação com os animais saudáveis (I e II). Não se registou qualquer indício de neovascularização. A massa relativa da próstata, da vesícula seminal e da glândula bulbouretral foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) no grupo III e IV. Não se registou qualquer efeito do exercício físico na glândula, através dos resultados obtidos.

Conclui-se que a manipulação hormonal e a administração da MNU causa repercussões significativas nas dimensões da próstata (provocada pela proliferação de células no tecido) e nos valores de massa relativa dos órgãos reprodutores. Os dados sugerem que este protocolo de indução apresenta um período de latência elevado, presumindo a inexistência de lesões neoplásicas para o intervalo a que foi aplicado. Não foi possível aprofundar o efeito do exercício sobre o CP devido à ausência da análise histológica. Este estudo evidencia a importância da ultrassonografia na caracterização e monitorização da próstata num protocolo animal de indução de CP.

Palavras-chave: Wistar, próstata, N-metil-N-nitrosureia (MNU), testosterona, exercício, ultrassonografia

Abstract

Prostate cancer (PC) is ranked fourth in the overall incidence of neoplasms by the World Health Organization (WHO). Several animal models were developed to study PC. Scientific literature on the application of physical exercise as an adjunctive therapy to the disease is available, but the underlying biological mechanisms have not yet been described. Ultrasonography is an important component of imaging to monitor various diseases, namely PC. Thus, the objective of this work was to study and monitor by ultrasonography the protocol of PC induction in laboratory animals and to understand the influence of exercise on its evolution.

To achieve the proposed objectives, we used an animal model of PC induction, with Wistar rats, through the sequential administration of flutamide (anti-androgen drug), testosterone propionate, N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and the placement of testosterone crystalline implants. Forty-one males Wistar Unilever rats randomly assigned to four experimental groups were used: group I, composed of 10 control animals; group II, composed of 10 control exercised; group III, composed of 10 induced to the PC sedentary; and one group IV, composed of 11 PC induced and exercised. Groups II and IV underwent a chronic treadmill exercise plan. The body mass of the animals was determined, and the water and food consumption were recorded periodically. The prostate of each animal was monitored at 12, 15, 21, 32 weeks of life, in B mode of ultrasonography and at week 35, using the described technique and by the Contrast mode. At week 35 of life, the animals were sacrificed and a complete necropsy was performed, all organs were collected and their mass recorded.

At week 35, the mean body mass of the exercised animals (II and IV) was lower ($p < 0.05$) than the sedentary animals (I and III). The PC induction protocol did not promote significant differences in body mass ($p > 0.05$). Induced animals (III and IV) had a higher prostatic dimension and lower echogenicity ($p < 0.05$) when compared with healthy animals (I and II). There was no evidence of neovascularization. The relative mass of the prostate, seminal vesicle and bulbourethral gland was statistically superior ($p < 0.05$) in groups III and IV. There was no effect of physical exercise on the gland, through the results obtained.

It is concluded that hormonal manipulation and MNU administration cause significant repercussions on the size of the prostate (caused by the proliferation of cells in the tissue) and

in the relative mass values of the reproductive organs. It is suggested that this induction protocol presents a period of high latency, presuming the absence of neoplastic lesions for the interval to which it was applied. It was not possible to deepen the effect of exercise on PC due to absence of histological analysis. This study evidences the importance of ultrasonography in the characterisation and monitoring of the prostate in an animal PC induction protocol.

Keywords: Wistar, prostate, N-methyl-N-nitrosourea (MNU), testosterone, exercise, ultrasound

Publicações relacionadas com o trabalho experimental

➤ Trabalhos aceites para publicação como *abstracts* em revistas do ISI:

Milene Rodrigues-Ribeiro, Ana I. Faustino-Rocha, Miguel Correia-Cardoso, Carolina N. Fonseca, Magda S.S. Moutinho, Rita Ferreira, Margarida Fardilha, Fernanda Seixas and Paula A. Oliveira. (2017). A spontaneous Zimbal gland tumour in a Wistar male rat. *International Journal of Molecular Medicine*. (Aceite para publicação).

Faustino-Rocha AI, Correia-Cardoso M, Moutinho MSS, Rodrigues-Ribeiro M, Fonseca CN, Ferreira R, Fardilha M, Oliveira PA, Ginja M. (2017). Effects of exercise training on prostate dimensions in a rat model of prostate. cancer. *Annals of Research in Sport and Physical Activity*. (Aceite para publicação).

➤ Publicações em livros de atas em encontros nacionais:

Carolina N. Fonseca, Milene Rodrigues-Ribeiro, Magda S.S. Moutinho, Miguel Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, Rita Ferreira, Margarida Fardilha, Paula A. Oliveira, Mário Ginja. (2017): Non-invasive monitoring of rat prostate ultrasonography. X Encontro nacional de estudantes de bioquímica, de 7 a 10 de abril, pp. 36. Universidade do Minho. Braga, Portugal.

Ana I. Faustino-Rocha, Miguel Correia-Cardoso, Magda S.S. Moutinho, Milene Rodrigues-Ribeiro, Carolina N. Fonseca, Rita Ferreira, Margarida Fardilha, Paula A. Oliveira, Mário Ginja. (2017): Ultrasonographic monitoring of rat prostate during an assay of chemically and hormone-induced prostate cancer. V Encontro nacional de estudantes de química, de 7 a 10 de abril, pp. 45. Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

M. Rodrigues-Ribeiro, M. Correia-Cardoso, C. N. Fonseca, M.S.S. Moutinho, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira, A.I. Faustino-Rocha, M. Ginja. (2017): Effects of physical exercise on the prostate dimensions in a rat model of chemically-induced prostate cancer. X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11 de maio, pp. 34. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

C.N. Fonseca, M. Rodrigues-Ribeiro, M.S.S. Moutinho, M. Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, B. Colaço, M.J. Pires, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira. (2017): Caracterização morfológica dos órgãos reprodutores num protocolo animal de indução de cancro da próstata. X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11 de maio, pp. 32. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

M. Correia-Cardoso, M.S.S. Moutinho, M. Rodrigues-Ribeiro, C.N. Fonseca, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira, M. Ginja, A.I. Faustino-Rocha. (2017): Can the rat prostate dimensions be non-invasively monitored by ultrasonography? X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11 de maio, pp. 33. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

Faustino-Rocha AI, Oliveira PA, Gama A, Moutinho MSS, Rodrigues-Ribeiro M, Correia-Cardoso M, Fonseca CN, Pires MJ, Ferreira R, Ginja M. (2017): Can mast cells modulate mammary tumours vascularization? Symposium on Immunomodulation in Cancer & Regeneration, 23 junho, i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Porto, Portugal.

M. Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, C.N. Fonseca, M.S.S. Moutinho, M. Rodrigues-Ribeiro, M. Fardilha, R. Ferreira, A. Alvarado, B. Colaço, M. J. Pires, M. Ginja, P.A. Oliveira (2017): Aplicação da ultrassonografia num modelo de indução de cancro da próstata em ratos Wistar sujeitos a um plano de exercício físico. 11as Jornadas de Biologia, Ciência e Cidadania, 21 a 24 de novembro, pp. 113-114. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

➤ Publicação em ata de encontro científico internacional:

Faustino-Rocha AI, Correia-Cardoso M, Moutinho MSS, Rodrigues-Ribeiro M, Fonseca CN, Ferreira R, Fardilha M, Oliveira PA, Ginja M. (2017). Effects of exercise training on prostate dimensions in a rat model of prostate cancer. 13th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 11 a 14 de julho, pp. 186. Coimbra, Portugal.

➤ Comunicação oral em encontro científico nacional:

Faustino-Rocha AI, Oliveira PA, Gama A, Moutinho MSS, Rodrigues-Ribeiro M, Correia-Cardoso M, Fonseca CN, Pires MJ, Ferreira R, Ginja M. (2017): Can mast cells

modulate mammary tumours vascularization? Symposium on Immunomodulation in Cancer & Regeneration, 23 junho, i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Porto, Portugal.

➤ Sob a forma de painel em congressos nacionais:

Carolina N. Fonseca, Milene Rodrigues-Ribeiro, Magda S.S. Moutinho, Miguel Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, Rita Ferreira, Margarida Fardilha, Paula A. Oliveira, Mário Ginja. (2017): Non-invasive monitoring of rat prostate ultrasonography. X Encontro nacional de estudantes de bioquímica de 7 a 10 de abril, Universidade do Minho. Braga, Portugal.

Ana I. Faustino-Rocha, Miguel Correia-Cardoso, Magda S.S. Moutinho, Milene Rodrigues-Ribeiro, Carolina N. Fonseca, Rita Ferreira, Margarida Fardilha, Paula A. Oliveira, Mário Ginja. (2017): Ultrasonographic monitoring of rat prostate during an assay of chemically and hormone-induced prostate cancer. V Encontro nacional de estudantes de química, de 7 a 10 de abril, Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal.

M. Rodrigues-Ribeiro, M. Correia-Cardoso, C. N. Fonseca, M.S.S. Moutinho, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira, A.I. Faustino-Rocha, M. Ginja. (2017): Effects of physical exercise on the prostate dimensions in a rat model of chemically-induced prostate cancer. X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

C.N. Fonseca, M. Rodrigues-Ribeiro, M.S.S. Moutinho, M. Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, B. Colaço, M.J. Pires, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira. (2017): Caracterização morfométrica dos órgãos reprodutores num protocolo animal de indução de cancro da próstata. X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11 de maio, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

M. Correia-Cardoso, M.S.S. Moutinho, M. Rodrigues-Ribeiro, C.N. Fonseca, R. Ferreira, M. Fardilha, P.A. Oliveira, M. Ginja, A.I. Faustino-Rocha. (2017): Can the rat prostate dimensions be non-invasively monitored by ultrasonography? X Jornadas de bioquímica, de 10 a 11 de maio, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.

➤ Comunicação por painel em encontro científico internacional:

Faustino-Rocha AI, Correia-Cardoso M, Moutinho MSS, Rodrigues-Ribeiro M, Fonseca CN, Ferreira R, Fardilha M, Oliveira PA, Ginja M. (2017). Effects of exercise training on prostate dimensions in a rat model of prostate cancer. 13th International Society of Exercise and Immunology (ISEI) Symposium, 11 a 14 de julho, Coimbra, Portugal.

M. Correia-Cardoso, A.I. Faustino-Rocha, C.N. Fonseca, M.S.S. Moutinho, M. Rodrigues-Ribeiro, M. Fardilha, R. Ferreira, A. Alvarado, B. Colaço, M. J. Pires, M. Ginja, P.A. Oliveira (2017): Aplicação da ultrassonografia num modelo de indução de cancro da próstata em ratos Wistar sujeitos a um plano de exercício físico. 11as Jornadas de Biologia, Ciência e Cidadania, 21 a 24 de novembro, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract	V
Publicações relacionadas com o trabalho experimental.....	VII
Índice de figuras	XV
Índice de tabelas.....	XVII
Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas	XIX
1. Introdução	1
1.1. Cancro.....	1
1.2. Carcinogénese.....	2
1.2.1. Iniciação tumoral.....	3
1.2.2. Promoção tumoral	4
1.2.3. Progressão tumoral.....	5
1.3. Cancro da próstata	5
1.3.1. Epidemiologia	5
1.3.2. Fatores de risco	6
1.3.2.1. Idade.....	6
1.3.2.2. Etnia	7
1.3.2.3. Heritabilidade.....	8
1.3.2.4. Influência hormonal	8
1.4. Modelos animais.....	9
1.5. O rato como modelo animal	9
1.6. Anatomia e fisiologia da próstata do roedor e do homem	10
1.7. Indução química e hormonal do CP no modelo animal.....	11
1.8. A interferência do exercício físico no CP	12

1.9.	Diagnóstico do CP e ultrassonografia	14
1.9.1.	Modo B.....	16
1.9.2.	Modo <i>Doppler</i>	17
1.9.3.	Modo Contraste	17
2.	Objetivos	21
3.	Materiais e métodos	23
3.1.	Considerações prévias	23
3.2.	Animais.....	23
3.3.	Protocolo experimental.....	23
3.4.	Marcação dos animais.....	24
3.5.	Condições de manutenção e monitorização dos animais.....	25
3.6.	Determinação da massa corporal.....	26
3.7.	Plano de exercício dos animais.....	26
3.8.	Indução dos tumores prostáticos.....	28
3.9.	Monitorização da próstata por ultrassonografia	28
3.9.1.	Determinação da dimensão da próstata.....	30
3.9.2.	Quantificação da ecogenicidade no modo B	31
3.9.3.	Quantificação da ecogenicidade no modo Contraste	32
3.10.	Eutanásia	34
3.11.	Recolha das amostras.....	34
3.12.	Análise estatística.....	34
4.	Resultados.....	37
4.1.	Comportamento dos animais e índice de perdas	37
4.2.	Consumo de comida e de água	37
4.3.	Índice de homogeneidade ponderal	38
4.4.	Média da massa corporal e média do ganho ponderal	38
4.5.	Análise ultrassonográfica.....	39

4.5.1.	Dimensão da próstata	39
4.5.2.	Quantificação da ecogenicidade no modo B	41
4.5.3.	Quantificação da ecogenicidade no modo Contraste	43
4.6.	Média da massa absoluta e relativa dos órgãos reprodutores	44
5.	Discussão	47
6.	Conclusão e perspectivas futuras.....	53
7.	Referências bibliográficas.....	55
Anexos.....		XXI
Anexo A – Protocolo de exercício		XXIII

Página propositadamente deixada em branco

Índice de figuras

Figura 1. Os seis <i>hallmarks</i> do cancro propostos por Hanahan e Weinberg, em 2000 (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).	2
Figura 2. Etapas da carcinogénese, ilustração construída com elementos do Servier Medical Art (Kufe <i>et al.</i> , 2003; Baba e Câtoi, 2007; Yewei Liu <i>et al.</i> , 2015).	3
Figura 3. Ilustração esquemática da próstata do roedor (A) e do homem (B) (adaptado de Valkenburg e Williams, 2011).	11
Figura 4. Esquema do protocolo experimental realizado (US- ultrassonografia).	24
Figura 5. Identificação dos animais através do corte nas orelhas.	25
Figura 6. Representação das gaiolas (A- Eurostandard Tipo IV 1354G, Tecniplast, Itália; B- Eurostandard Tipo IV S 1500U, Tecniplast, Itália) utilizadas para o alojamento animal, com cama de carolo de milho, comida, água e enriquecimento ambiental.	26
Figura 7. Representação do tapete rolante, com cada faixa ocupada pelos animais em estudo (A) e a unidade de controlo (B).	27
Figura 8. Representação do aparelho Logic P6 [®] utilizado (A) e a obtenção de imagens ultrassonográficas num plano transversal (B).	29
Figura 9. Imagem transversal dos lobos ventrais (A1: direita, A2: esquerda) e dorsais (B1: direita, B2: esquerda), usando a bexiga como ponto de referência (estrela). Apresentação dos valores dos eixos de cada lobo (canto inferior esquerdo) obtidos através dos cursores integrados no aparelho ultrassonográfico. No canto superior direito é possível visualizar as características utilizadas no exame (frequência da sonda, percentagem de ganho).	30
Figura 10. Representação ilustrativa da medição da IE (seta amarela) na ROI (25x25 pixéis) do lobo ventral direito (seta branca) através dos recursos disponíveis pelo <i>software</i> utilizado.	32
Figura 11. Representação ilustrativa da medição da IE nas duas ROIs (setas), em tempos diferentes. A- Visualização do vídeo, no aparelho Logic P6 [®] , e congelamento das imagens no instante em que o meio de contraste foi administrado (T0, não ilustrado) e no momento em que foi observado um forte sinal ecogénico (T1, a 4s do vídeo) na passagem do meio de contraste pelos vasos (estabelecido a olho nu). As duas ROIs foram estabelecidas, através de um cursor	

do aparelho ultrassonográfico (cardinal amarelo), nos dois locais em que foram observados uma maior intensidade de eco (um no interior [cardinal superior] e outro na periferia da glândula [cardinal inferior]). B1 e C1- Leitura da média da IE no tempo T0 na ROI no interior (B1) e na periferia da glândula (C1); B2 e C2- Leitura da média da IE no tempo T1 na ROI no interior (B2) e na periferia da glândula (C2)..... 33

Índice de tabelas

Tabela 1. Número de animais na semana 5 e 35 de vida e o respetivo %IP, para cada grupo.	37
Tabela 2. Média ($\pm$ EP) do consumo médio diário de comida e água nos grupos I, II, III e IV nas semanas 5 e 35 de vida.....	38
Tabela 3. Peso inferior (Pin), Peso superior (Ps) e o índice de HP para os grupos I, II, III e IV.	38
Tabela 4. Média ($\pm$ EP) da massa corporal inicial e final e percentagem da média do ganho ponderal (%GP) para os grupos I, II, III, IV. CTR – controlo, CP – cancro da próstata, sed – sedentário e ex – exercitado.. ..	39
Tabela 5. Média ($\pm$ DP) da área da próstata ventral: área lobo direito + área lobo esquerdo. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.	40
Tabela 6. Média ($\pm$ DP) da área da próstata dorsal: área lobo direito + área lobo esquerdo. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.	41
Tabela 7. Média ($\pm$ EP) da IE das ROIs, na próstata ventral. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.	42
Tabela 8. Média ($\pm$ EP) da IE das ROIs, na próstata dorsal. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.	43
Tabela 9. Média ($\pm$ EP) da IE nas duas ROIs selecionadas (um na periferia e outro no interior da glândula prostática).....	44
Tabela 10. Média ($\pm$ EP) da massa absoluta em gramas (g) e massa relativa (entre parênteses) dos órgãos reprodutores.	44

Página propositadamente deixada em branco

Lista de siglas, acrónimos e abreviaturas

%GP – Percentagem do ganho ponderal

%IP – Percentagem de índice de perdas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFMR – Atividade física moderada-rigorosa

ANOVA – Análise de variância

AT – Tempo de chegada

BOP – N-nitrosobis(2-oxopropil)amina

CAS – Identificador numérico atribuído pelo *Chemical Abstracts Service*

COMPETE/POCI – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização

CP – Cancro da Próstata

DP – Desvio padrão

DMAB – 3,2'-dimetil-4-aminobifenil

EP – Erro padrão

EROs – Espécies reativas de oxigénio

EUA – Estados Unidos da América

FCT – Fundação para Ciência e Tecnologia

FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

FELASA – *Federation for Laboratory Animal Science Associations*

GWAS – *Genomic-wide association study*

HIF – Fator induzível por hipoxia

HP – Homogeneidade ponderal

HPB – Hiperplasia benigna da próstata

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

IE – Intensidade de eco

MNU – N-metil-N-nitrosureia e *N-methyl-N-nitrosourea*

MTT – Tempo de trânsito médio

N – Número de animais

O₂ máx. – Consumo máximo de oxigénio

PC – *Prostate Cancer*

Pf – Peso final

PhIP – 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina

PI – Intensidade de pico

Pi – Peso inferior

Pin – Peso inicial

Ps – Peso superior

PSA – Antígeno sérico prostático

Rn – Identificação do animal pelo corte da orelha

ROI – Região de interesse

SF₆ – Hexafluoreto sulfúrico

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

T0 – Tempo 0

T1 – Tempo 1

TAC – Tomografia axial computadorizada

TIC – Curva de tempo-intensidade

TRUS – Ultrassonografia trans-retal

TTP – Tempo de chegada do meio de contraste

US – Ultrassonografia

USC – Ultrassonografia de contraste

UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

WHO – *World Health Organization*

1. Introdução

1.1. Cancro

Cancro é o nome vulgarmente atribuído a um conjunto de doenças que envolvem uma multiplicação descontrolada de células com mutações genéticas, podendo invadir outras regiões do corpo, isto é, metastizar (Hanahan e Weinberg, 2011).

A par do nome cancro são utilizados outros termos com o mesmo significado como é o caso de neoplasia e de tumor (Cooper, 1992). O termo neoplasia contém o conceito de cancro, porque “neo” significa novo e “plasia” significa formação, assim neoplasia quer dizer formação de um novo tecido. A palavra tumor, antigamente, foi usada para definir qualquer tumefação ou aumento anormal de volume no corpo humano, isto porque “*tumor*”, em latim, significa um estado inchado. O termo latim *tumor* ou inchaço constitui um dos cinco sinais cardinais da inflamação aguda, sendo os restantes quatro: *rubor* (vermelhidão); *ardor* (calor); *dolor* (dor); e *functio laesa* (perda de função) (Kumar *et al.*, 2013). Assim, o termo latim *tumor* pode, em termos clássicos, referir-se a qualquer tumefação no corpo:

- Tumefação associada à inflamação;
- Abscesso, acumulação de pus como resultado de uma infeção;
- Quisto, estrutura fechada em forma de saco preenchida com uma substância líquida ou semissólida;
- Nódulo ou uma protuberância relacionada com o cancro.

Estas definições estão corretas, mas ao longo do percurso da medicina, a palavra tumor aproximou-se do conceito de neoplasia. A neoplasia poderá ser classificada em duas categorias distintas: a neoplasia benigna e a neoplasia maligna. A neoplasia benigna representa um crescimento de tecidos confinados no seu local de origem, sendo limitados por uma cápsula fibrosa e não invadindo outras regiões do organismo. Normalmente esta classe de neoplasias não representa um perigo direto, sendo fácil e simples a sua remoção através de procedimentos cirúrgicos (Cooper, 1992). Em contrapartida, a neoplasia maligna é constituída, como atrás foi referido, por células cancerígenas, sendo consideradas “imortais” e possuem a capacidade de proliferar indefinidamente. Estas células adquiriram um fenótipo que promove a

autossuficiência em fatores de crescimento, são insensíveis aos sinais inibitórios de crescimento, isentas dos mecanismos de apoptose, promovem a angiogénese e têm a capacidade de invasão local e à distância, formando colónias secundárias (metastização) (Figura 1) (Hanahan e Weinberg, 2011). Logo, as células cancerígenas diferem das células normais, sofreram uma série de modificações, que conduziram a uma perda parcial ou completa da identidade do tecido. Assim sendo, as células malignas tornaram-se parte de um novo tecido diferente, podendo eventualmente promover a morte do indivíduo (Cooper, 1992; Bocchetta e Carbone, 2004).

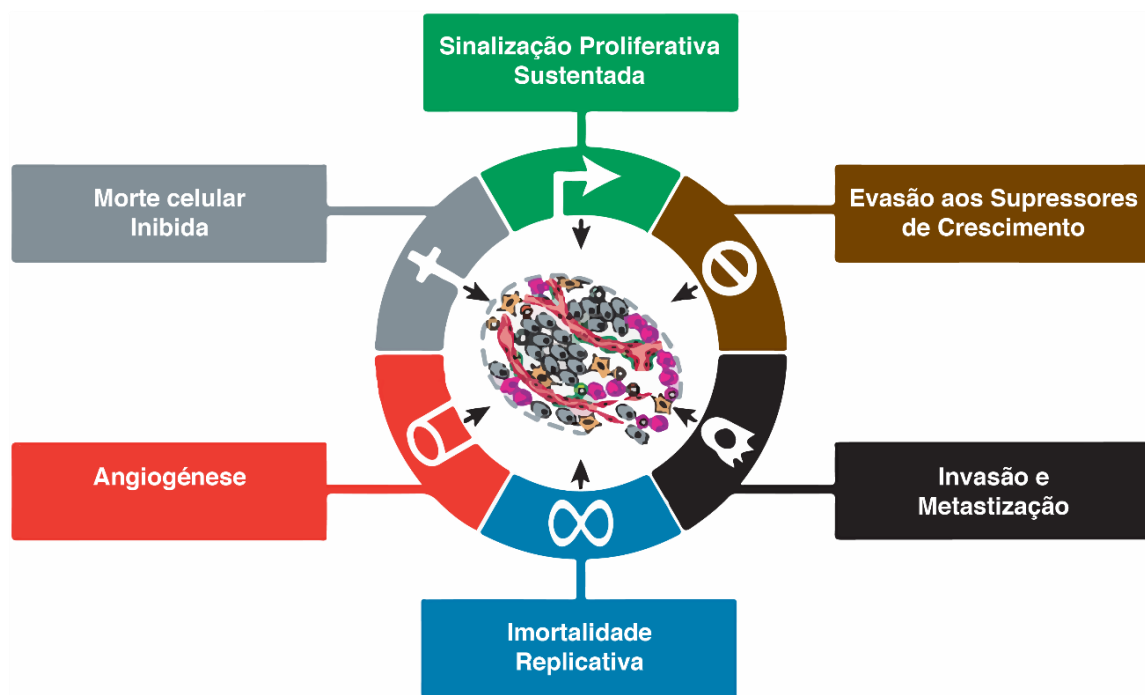


Figura 1. Os seis *hallmarks* do cancro propostos por Hanahan e Weinberg, em 2000 (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

1.2. Carcinogénese

A carcinogénese inclui todos os processos envolvidos na transformação de uma célula normal numa célula neoplásica. Este processo, em conformidade com a bibliografia, pode ser dividido em três etapas distintas: iniciação tumoral; promoção tumoral; e a progressão (Figura 2) (Yewei Liu *et al.*, 2015).

Um número de agentes carcinogénicos químicos, físicos (ionizantes e não ionizantes) e biológicos (vírus, bactérias) são conhecidos pela capacidade de provocar mutações ou alterar a expressão de genes específicos, resultando num dano inicial ao ácido desoxirribonucleico (ADN). Reconhece-se que certos agentes carcinogénicos não são, por si só, suficientes para induzir cancro. No entanto, a interação entre estes conseguiu ultrapassar essa limitação, já estando alguns bem documentados, como por exemplo a aflatoxina e o vírus da hepatite B no hepatocarcinoma. Este tipo de interação química-viral ilustra a etiologia multifatorial do cancro, apresentando assim novos desafios para a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na indução da doença (Wild e Kleihues, 1996).

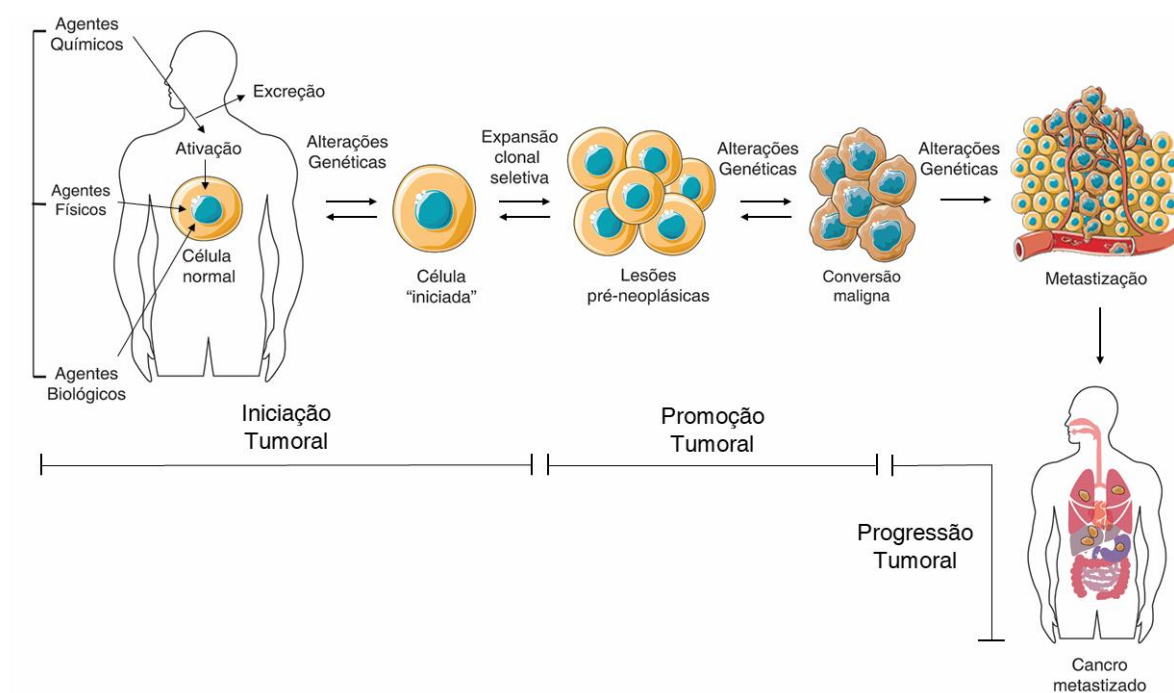


Figura 27. Etapas da carcinogénese, ilustração construída com elementos do Servier Medical Art (Kufe *et al.*, 2003; Baba e Câtoi, 2007; Yewei Liu *et al.*, 2015).

1.2.1. Iniciação tumoral

É a primeira fase de carcinogénese. Nesta etapa as células ficam suscetíveis a alterações na estrutura molecular do seu ADN, por um ou vários agentes carcinogénicos (Baba e Câtoi, 2007). Na maioria das vezes, isto é provocado pela formação de um aduto entre o carcinogénico, ou um dos seus grupos funcionais, e um nucleótido no ADN (Yuspa e Poirier, 1988). Estes

adutos entre ADN-carcinogénico são essenciais, mas não suficientes para a iniciação do tumor (Kufe *et al.*, 2003). Nesta fase, as células ficam sensibilizadas para a ação de agentes promotores. Do ponto de vista clínico ainda não se consegue identificar um tumor nesta fase.

1.2.2. Promoção tumoral

As células que anteriormente estiveram predispostas a alterações do seu genoma, se forem expostas à ação de agentes promotores, entram em multiplicação descontrolada. Os agentes promotores não são só por si agentes carcinogénicos, mas têm a capacidade de reduzir o período de latência na formação de um tumor num tecido, ou aumentar o número de tumores aí formados. Este agente promove a formação tumoral juntamente com uma dosagem de iniciador que é demasiado baixa para ser considerado carcinogénico só por si (Kufe *et al.*, 2003). Existem iniciadores carcinogénicos que em certas dosagens, e dependendo do modo e vias de administração, são classificados também como agentes promotores, sendo por essa razão denominados de agentes carcinogénicos completos (Baba e Câtoi, 2007).

Ao contrário dos iniciadores, os promotores não estabelecem ligações covalentes com as macromoléculas da célula ou com o seu ADN. Grande parte destes compostos ligam-se a recetores existentes na membrana da célula, afetando as vias intracelulares envolvidas na proliferação celular (Klaunig *et al.*, 2000). Os promotores poderão ser subdivididos em duas categorias: o promotor específico, o qual interage com recetores que se encontram na membrana plasmática ou no interior das células-alvo; e os promotores inespecíficos, que alteram a expressão genética, sem um envolvimento com um recetor conhecido (Yewei Liu *et al.*, 2015).

A promoção tumoral compreende assim, um aumento do número de células por expansão clonal seletiva das células iniciadas. Quanto mais rápida a multiplicação celular, maior a acumulação de erros genéticos e consequentemente maior a probabilidade de ocorrer a formação de um tumor. A ocorrência dessa conversão depende ainda da forma como é feita a administração do composto promotor, porque uma administração da dose total de um promotor é menos significativa em relação à frequência de administrações repetidas. Se essa administração contínua for interrompida antes de ocorrer a conversão maligna, as lesões induzidas provocadas pelos compostos iniciadores e promotores poderão ser reversíveis (Kufe *et al.*, 2003).

1.2.3. Progressão tumoral

Nesta fase ocorre um conjunto de transformações em série numa população de células pré-neoplásicas de forma que estas expressem um fenótipo maligno e gradualmente adquiram características mais agressivas (Kufe *et al.*, 2003). A progressão é associada à intensificação da instabilidade genómica (com alterações genéticas e epigenéticas) e ao crescimento descontrolado (Lengauer *et al.*, 1998). Esta instabilidade genómica resume-se na ativação de proto-oncogenes, na perda de função de genes de supressão tumoral e de genes reguladores da apoptose e na inativação de genes responsáveis pela reparação do ADN (Boyle e Levin, 2008). Nesta fase, as células adquirem a capacidade de proliferar de forma incontrolável, podendo invadir outros tecidos. Kufe (2003) refere que é a acumulação destas mutações o fator determinante na carcinogénese e não a ordem das suas fases.

Alguns modelos animais induzidos de doenças oncológicas, implicam a administração de um agente iniciador, seguida de um promotor para encurtar o período de desenvolvimento tumoral (Yewei Liu *et al.*, 2015).

1.3. Cancro da próstata

1.3.1. Epidemiologia

A incidência de cancro da próstata (CP) estimada em 2000 foi de 543 000 doentes, em 2012 aumentou para 1,1 milhão, sugerindo um aumento da incidência de CP na década passada (Parkin, 2001; WHO, 2012a). Segundo a *World Health Organization* (WHO), o CP assumiu a quarta posição ao nível de incidência global de neoplasias (WHO, 2012a), sendo esta a segunda principal causa de morte entre os homens nos países ocidentais (Corona *et al.*, 2011). A mortalidade e morbilidade associadas ao CP estão fortemente correlacionadas com a metastização óssea desta neoplasia. A metastização ocorre em cerca de 90% dos doentes que morrem com CP (Valkenburg e Williams, 2011).

O CP desenvolve-se predominantemente em homens com idade superior a 50 anos, tem geralmente um crescimento lento e é desprovido de sintomas (Tamburrino *et al.*, 2012).

O aumento na sua incidência poderá resultar de uma melhor acessibilidade aos exames de diagnóstico. Atualmente a difusão da análise que avalia o antígeno sérico prostático (abreviado para a sua sigla em inglês, PSA) tem permitido diagnosticar mais casos (Hassanipour-Azgomi *et al.*, 2016). Admite-se que 70% dos novos casos estimados em 2012 ocorreram nos países desenvolvidos (WHO, 2012a). Essa diferença na taxa de incidência, em relação aos países em desenvolvimento, está diretamente correlacionada com a diferença do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) existente entre países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento. Países desenvolvidos possuem um maior IDH, apresentando um sistema eficiente de vigilância, rastreio e registo que resulta na maior taxa de incidência desta doença (Hassanipour-Azgomi *et al.*, 2016). Em Portugal, em 2012, estima-se que a incidência terá sido de 6622 novos casos e a mortalidade de 1582 indivíduos (WHO, 2012b).

A incidência de tumores espontâneos na próstata em outras espécies é considerada rara, com a exceção do cão, e algumas estirpes de rato, como por exemplo a Lobund-Wistar, a ACI/Seg e a F344, ocorrendo entre eles diferentes taxas de incidência (Bosland, 1996; Shirai *et al.*, 2000).

1.3.2. Fatores de risco

Não é fácil estabelecer os fatores de risco para o desenvolvimento do CP. Em conformidade com a bibliografia consultada, os fatores de risco estabelecidos, incluem a idade, a etnia, a heritabilidade familiar e alterações nas concentrações séricas dos androgénios (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2011; Giri e Beebe-Dimmer, 2016). Outros fatores considerados relevantes para o desenvolvimento desta doença são modificáveis, nomeadamente o tipo de dieta, a obesidade e o estilo de vida (Markozannes *et al.*, 2016).

1.3.2.1. Idade

A idade é considerada o fator principal para o desenvolvimento do CP, havendo uma relação direta entre a idade avançada e o risco para desenvolver a doença. Ferrís-i-Tortajada (2011) indica que menos de 0,6% de todos os casos diagnosticados, são relativos a indivíduos com idade inferior a 45 anos, e entre os 62% a 85% após os 65 anos. Considera-se que a idade

também poderá afetar a dimensão da próstata. Os homens entre 50-60 anos apresentam uma próstata maior e esse aumento poderá corresponder a hiperplasia benigna da próstata (HPB) ou a adenocarcinomas prostáticos (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2011).

O envelhecimento está relacionado com o aparecimento de diversas alterações ao nível metabólico e molecular, como por exemplo a acumulação de espécies reativas de oxigénio no organismo (EROs). Khandrika (2009) refere que essa acumulação resulta da disfuncionalidade mitocondrial (por mutações), e à perda dos mecanismos de defesa antioxidantes. Como consequência, há uma exposição das células a um maior stresse oxidativo, promovendo mutações e transformações neoplásicas nas células prostáticas.

1.3.2.2. Etnia

Existem variações significativas na incidência anual do CP entre grupos étnicos e entre diferentes localizações geográficas (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2011). Rebbeck (2017) refere que indivíduos de descendência africana apresentam elevada mortalidade. Na qual afro-caribenhos e afro-subsarianos apresentam as maiores taxas de mortalidade, de 18,7-29,3 por 100 000 indivíduos. No período de 2008-2011, indivíduos afro-americanos (43 por 100 000) apresentaram uma elevada taxa de mortalidade em comparação com as outras etnias nos EUA. Em contrapartida, os homens das regiões do leste, do sudeste e do centro-sul asiático apresentam as menores taxas de mortalidade (2,9; 3,1; e 6,7 por 100 000, respetivamente), em conjunto com os norte-africanos (7 por 10 000). Esta diferença é consistente com os dados recolhidos de vários estudos de GWAS (do inglês, *genome-wide association study*) em relação aos *loci* de suscetibilidade do CP. Estes estudos demonstraram a existência de polimorfismos genéticos, em relação à presença e frequência de alelos de risco do CP entre etnias, na qual a descendência africana se encontra mais predisposta (Kheirandish e Chinegwundoh, 2011).

Rebbeck (2017) refere também que a suscetibilidade ao CP é auxiliada pela interação dos genes e dos fatores ambientais, que são variáveis entre populações.

1.3.2.3. Heritabilidade

Estima-se que entre 40-50% dos casos de CP têm uma componente hereditária. O risco de incidência para o seu desenvolvimento é proporcional ao número de familiares afetados e do grau de parentesco (Giri e Beebe-Dimmer, 2016).

Várias alterações genéticas hereditárias identificadas demonstram um aumento da probabilidade de desenvolver CP. Mutações hereditárias nos genes BRCA1 ou BRCA2 aumentam a probabilidade de desenvolvimento de alguns tipos de cancro, como o cancro da mama e do ovário. As mutações no gene BRCA2 predis põem alguns homens a desenvolver CP. Homens com a síndrome Lynch, doença hereditária com transmissão autossómica dominante, têm maior probabilidade de desenvolverem CP (Adjakly *et al.*, 2015; Giri e Beebe-Dimmer, 2016).

1.3.2.4. Influência hormonal

A testosterona e a dihidrotestosterona, compostos androgénicos, intervêm no desenvolvimento e maturação da próstata, afetando a sua proliferação e diferenciação celular (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2011). A testosterona é secretada principalmente nos testículos, e em menor quantidade nas glândulas adrenais (Kempná *et al.*, 2015), enquanto a dihidrotestosterona é um metabolito biologicamente ativo da testosterona, formado principalmente na próstata, testículos e glândulas adrenais pela enzima 5 α -redutase. A ação dos androgénios na próstata é mediada pelo recetor dos androgénios, que ao ser ativado, promove a transcrição de genes envolvidos na síntese do ADN e a proliferação celular (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2011). Os compostos androgénicos possuem diferentes afinidades na ligação ao recetor dos androgénios, a dihidrotestosterona tem mais afinidade do que a testosterona. Alterações na síntese, e/ou catabolismo, ou nas concentração dos androgénios poderão influenciar a ocorrência da HPB e do CP (Qin *et al.*, 2016).

1.4. Modelos animais

Os modelos animais são fundamentais para a investigação científica dos mecanismos fisiológicos/fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do cancro. Um modelo animal apropriado e válido para o estudo da carcinogénese prostática é aquele que para além de ser prático e de fácil execução, permite estudar o espectro de lesões prostáticas identificadas no homem do ponto de vista histológico e as suas características moleculares e genéticas (Bosland, 1992).

Devido à complexidade biológica entre o ser humano e os animais de laboratório pode afirmar-se que, não existe um modelo que represente na totalidade o padrão clínico da doença humana (Valkenburg e Williams, 2011). A escolha do modelo animal deverá incluir, em outros aspetos, a transposição da informação, a generalização dos resultados, as implicações éticas, as consequências ecológicas, a sua disponibilidade e os custos de implementação (Davidson *et al.*, 1987).

1.5. O rato como modelo animal

O rato (*Rattus norvegicus*) tem sido usado como um dos principais modelos para o estudo de vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, estando por isso bem documentado.

Durante várias décadas, o *R. norvegicus* foi submetido a uma reprodução seletiva e manipulação genética, desenvolvendo-se várias estirpes com características específicas para a investigação biomédica. O rato reúne outras características, fortalecedoras do seu uso como modelo animal, nomeadamente a simplicidade na realização de procedimentos experimentais (manipulação, administrações, cirurgia, etc.), tamanho, manutenção, comportamento dócil e tempo de gestação curto. Outros modelos mamíferos de maior porte, devido a implicações éticas, não podem ser usados, o que acentua a utilização do rato como modelo animal (Dwinell, 2010).

1.6. Anatomia e fisiologia da próstata do roedor e do homem

A próstata do roedor e do homem são anatomicamente distintas (Figura 3). A próstata do roedor subdivide-se em quatro lóbulos, relativamente à posição da bexiga: anterior (também conhecida como glândula de coagulação), ventral, dorsal e lateral (Valkenburg e Williams, 2011).

Cada lóbulo apresenta diferentes características morfológicas e histológicas. As células epiteliais e estromais das diferentes regiões da próstata respondem distintamente à privação e estimulação das hormonas androgénicas, o que sugere uma heterogeneidade funcional de cada um dos lóbulos (Gonçalves *et al.*, 2013). O lóbulo ventral da próstata consiste em duas regiões discretas adjacentes à bexiga, está conectado à uretra por um conjunto de ductos. Os lóbulos dorsal e lateral situam-se ao longo da uretra, formando uma massa macroscopicamente distinta, sendo por vezes denominado como próstata dorso-lateral. O lóbulo anterior é uma estrutura tubular fina e fixa à curvatura das vesículas seminais (Shirai *et al.*, 2000). Todos os lóbulos estão envolvidos por uma cápsula revestida de mesotélio, sendo separados entre si por tecido conjuntivo fibroso e adiposo (Oliveira *et al.*, 2016).

A próstata do homem, em oposição dos roedores, é uma estrutura sólida compacta, descapsulada, a qual contém 3 regiões glandulares distintas: periférica, central e transitória; e uma região do estroma fibromuscular anterior não glandular (Oliveira *et al.*, 2016).

Os lóbulos dorsal, lateral e anterior da próstata dos roedores são considerados homólogos a determinadas regiões da próstata do homem (Bosland, 1992). O lóbulo dorso-lateral é o mais semelhante à região periférica do homem, onde se desenvolvem 75-85% dos adenocarcinomas prostáticos. O lóbulo anterior do roedor é considerado o homólogo da região central da próstata do homem. O lóbulo ventral não apresenta homologia com qualquer região prostática no homem (Oliveira *et al.*, 2016).

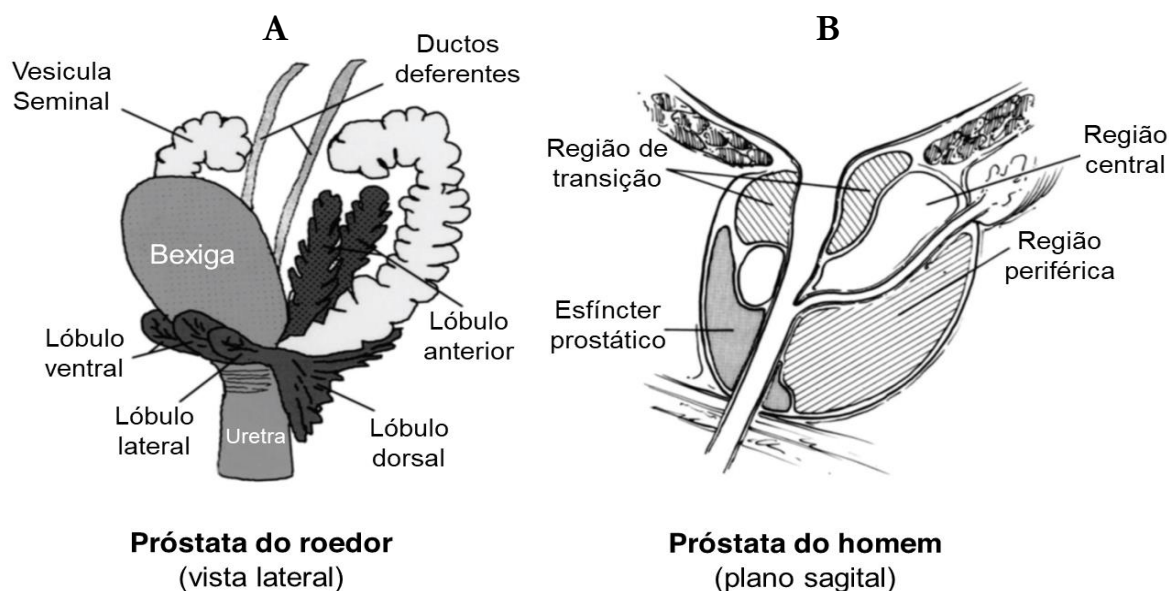


Figura 47. Ilustração esquemática da próstata do roedor (A) e do homem (B) (adaptado de Valkenburg e Williams, 2011).

No homem, a glândula prostática aumenta de tamanho ao longo da vida, com início a partir da terceira década de vida. O aumento significativo do tamanho da próstata e variação do seu contorno no homem devido à HPB resulta em complicações nas técnicas de imagiologia prostática e nos tratamentos do CP (Talab *et al.*, 2012).

1.7. Indução química e hormonal do CP no modelo animal

A indução química de tumores prostáticos em roedores tem sido usada para o estudo de desenvolvimento e o tratamento do CP. Foram desenvolvidos quatro componentes químicos genotóxicos que induzem carcinomas prostáticos em roedores: N-metil-N-nitrosureia (MNU); 3,2'-dimetil-4-aminobifenil (DMAB); N-nitrosobis(2-oxopropil)amina (BOP); e 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) (Bosland, 1992; Shirai *et al.*, 2000).

A MNU é um agente de metilação de ação direta, cuja administração leva à formação de adutos de O⁶-metilguanina, com propriedades recombinantes e citotóxicas. Estes adutos são removidos por ADN metiltransferases existentes nas células animais. A depleção dessas metiltransferases resulta na persistência de sítios de ADN metilados, que são potencialmente mutagénicos, promovendo o desenvolvimento de cancro no órgão alvo (Gonçalves *et al.*, 2013).

A administração da MNU em ratos machos Wistar Unilever, após a estimulação da proliferação celular prostática [conseguida pela administração sequencial de acetato de ciproterona (fármaco anti-androgénio esteroide) e propionato de testosterona] durante a exposição ao agente, resultou numa baixa incidência (5-25%) de adenocarcinomas nos lóbulos dorso-lateral e anterior. Estes adenocarcinomas partilham algumas características com os carcinomas da próstata humana: longo período de latência, diferenciação histológica perceptível, metastização pelas vias linfáticas e hematológicas e elevados níveis de fosfatase ácida prostática (Bosland, 1992). Uma elevada incidência do CP é, no entanto, necessária para estudar o seu processo de carcinogénese e sua inibição.

Bosland (1992) indica que uma elevada incidência de CP é conseguida apenas com um tratamento crónico de testosterona após a administração da MNU, através da colocação de implantes subcutâneos de testosterona cristalina. Este modelo de elevada incidência (75-85%) induz adenocarcinomas com as mesmas características do modelo de baixa incidência, descrito anteriormente, sendo ideal para estudar o CP. Este protocolo foi recentemente reformulado para a utilização de um fármaco anti-androgénio não esteroide, a flutamida, devido ao elevado custo do acetato de ciproterona (Bosland, 2014).

O DMAB e o BOP são carcinogénicos com um metabolismo seletivo para o lóbulo ventral da próstata do rato. A PhIP é uma amina heterocíclica cancerígena, produzida no processo de cozedura de carne e peixe, a sua exposição oral também induz o desenvolvimento de carcinomas no lóbulo ventral da próstata. Estes três carcinogénicos induzem neoplasias que não são comparáveis às identificadas no homem (Bosland, 1992; Shirai *et al.*, 2000).

1.8. A interferência do exercício físico no CP

A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelo músculo esquelético que requer gasto energético. O exercício físico é uma subcategoria da atividade física planeada, repetitiva e estruturada, de forma a atingir e manter a aptidão física (WHO, 2010).

Existe evidência incontestável que a atividade física desempenha uma função protetora na patogénese de vários distúrbios e doenças. Afeta vários mecanismos biológicos, melhorando a composição corporal, aprimora os perfis das lipoproteínas lipídicas, favorece a homeostasia

da glicose, reduz a pressão arterial, diminui a coagulação sanguínea, aumenta a função cardíaca e limita a inflamação sistémica (Warburton, 2006).

Mundialmente, calcula-se que 31,1% dos adultos são inativos, não cumprindo os níveis mínimos de 150 min/semana de atividade física moderada-rigorosa (AFMR), sugeridos pela WHO (WHO, 2010; Hallal *et al.*, 2012). Ruiz-Casado (2017) refere que uma AFMR regular está associada a um menor risco de desenvolver vários tipos de cancro, por exemplo do cancro do cólon proximal (-24%) e distal (-23%), da mama (-12%), do ovário (-11%), do rim (-12%), do pulmão (-24%), do pâncreas (-11%) e da próstata (-10%).

Até ao momento não foram totalmente definidos os mecanismos biológicos que correlacionam o risco de desenvolver CP com a atividade física. Admite-se que poderá influenciar os níveis das hormonas androgénicas, da insulina e dos fatores de crescimento semelhante à insulina, cujos valores anormais estão associados ao risco do CP. A AFMR previne a obesidade, a qual aumenta a probabilidade de desenvolver CP; auxilia a função imunitária e reforça os mecanismos de defesa antioxidante que poderão reduzir o risco de desenvolver CP (Yupeng Liu *et al.*, 2011).

Os tumores caracterizam-se por ter um sistema de vascularização desorganizado e uma perfusão/oxigenação anormal, promovendo a sua hipoxia e má infiltração de fármacos (Pedersen *et al.*, 2015). O decréscimo dos níveis de oxigénio no microambiente tumoral leva as células tumorais a alterarem o seu metabolismo assumindo vias anaeróbicas e favorecendo a resistência à apoptose. A hipoxia estimula a expressão do fator induzível por hipoxia (HIF) que, por sua vez, induz também a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), um dos fatores importantes na promoção de angiogénese (Verma *et al.*, 2009). No CP, verifica-se que o exercício físico proporciona uma sobreexpressão do HIF e do VEGF, mas detém um resultado funcional oposto: promove uma perfusão/oxigenação intratumoral e um menor índice de metastização (Jones *et al.*, 2012).

Um dos sintomas associados ao cancro é a fadiga, que por sua vez é também um dos efeitos colaterais das terapias disponíveis, como a privação dos androgénios. O exercício físico promove uma melhor condição física e mental dos doentes com CP, revelando-se uma terapia auxiliar que proporciona melhor qualidade de vida a doentes com cancro (Yang e Wang, 2017).

1.9. Diagnóstico do CP e ultrassonografia

As principais ferramentas usadas para o diagnóstico do CP incluem exame de toque retal, concentração do soro PSA e biopsia trans-retal ecoguiada (Aigner *et al.*, 2010). Antes do teste de PSA e a ultrassonografia trans-retal (TRUS) se tornarem amplamente disponíveis, os tumores diagnosticados por toque retal já se encontravam numa fase avançada, sendo estes palpáveis e confinados na glândula. Atualmente, mais de 90% dos casos são diagnosticados numa fase inicial assintomática (Harvey *et al.*, 2012).

A ultrassonografia (US) é uma modalidade de imagiologia bastante usada, de fácil aplicação para a avaliação estrutural da próstata (dimensão, volume, eco-textura, rigidez e elasticidade) e funcional (macro e micro vascularização) (Mitterberger *et al.*, 2010). A obtenção de uma imagem ótima do órgão é uma componente-chave para determinar o estado de desenvolvimento do CP e definir o seu plano de tratamento. Uma análise objetiva da ecogenicidade, através do cálculo da intensidade dos pixéis, usando um *software* adequado, permite detetar alterações na ecogenicidade que poderão não ser visíveis a olho nu (Moxon *et al.*, 2015).

A TRUS foi inicialmente descrita por Watanabe e seus colegas em 1968 (Talab *et al.*, 2012). A técnica sofreu evoluções com o decorrer dos anos através do desenvolvimento de sondas menores e introdução da ultrassonografia em tempo real (Ghai e Toi, 2012). A TRUS é atualmente considerada uma técnica de diagnóstico padrão do CP no homem e o seu uso em outros animais, como o cão, já foi concretizada (Mattoon e Nyland, 2015a).

A TRUS usa os modos de imagem B e *Doppler*. Normalmente, a glândula prostática é examinada no plano axial, desde o ápice até à base. As vesículas seminais são identificadas bilateralmente, usando um plano sagital oblíquo. A região periférica apresenta uma elevada ecogenicidade, relativamente às regiões central e de transição, que geralmente são hipoecóicas (Harvey *et al.*, 2012; Jung e Westphalen, 2012).

A TRUS fornece informação precisa sobre a existência e localização de focos de cancro. No homem, o CP é normalmente visualizado como uma massa hipoecóica, especialmente na região periférica, e no estado avançado da doença é possível observar uma assimetria entre as vesículas seminais (Talab *et al.*, 2012). É proposto que a aparência hipoecóica no TRUS se deve à substituição do tecido glandular normal, por uma massa de células tumorais, com

interfaces menos refletoras (Ghai e Toi, 2012). Contudo, apresenta uma baixa sensibilidade (44-90%) e especificidade (30-74%), por várias razões: é uma metodologia subjetiva e dependente da experiência do operador; 40% do CP é isoecóico (preservação das estruturas refletoras e da ecogenicidade); e as lesões de HPB e prostatite mimetizam as características do CP. Adicionalmente, a TRUS convencional apresenta um valor preditivo positivo de 45-91% e um valor preditivo negativo de 11-79%, revelando que este método de diagnóstico apresenta muitas limitações na deteção do CP (Aigner *et al.*, 2010; Talab *et al.*, 2012). A TRUS é usada como guia para a realização da biópsia, sujeita aos níveis de PSA e da informação obtida pelo toque retal, evitando o sobrediagnóstico ou a repetição desnecessária de biópsias (Ghai e Toi, 2012).

Contudo, a TRUS apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas de diagnóstico, devido ao seu baixo custo, não-invasiva, ausência de radiação ionizante e permite a obtenção de imagens em tempo-real (Mitterberger *et al.*, 2010; Talab *et al.*, 2012). Outros modos de imagem de ultrassom foram desenvolvidos de modo a visualizar e discriminar o fluxo sanguíneo, como o *Doppler*, contudo não melhoraram a taxa de deteção. A utilização de um agente de contraste, permitiu a visualização de microvasos, aumentando a sensibilidade na deteção (Mitterberger *et al.*, 2007).

A TRUS é usada para determinar o volume da próstata e essencial para definir estratégias terapêuticas. O volume da próstata pode ser determinado por vários processos, no entanto, a fórmula do volume do elipsoide prolato é o método mais utilizado devido à sua rapidez, reprodutibilidade e o facto de apresentar uma elevada correlação com o volume real da próstata (Mitterberger *et al.*, 2010). A fórmula é descrita como:

$$\text{Volume do elipsoide prolato (cm}^3\text{)} = (\text{altura} \times \text{comprimento} \times \text{largura}) \times \frac{\pi}{6}$$

A altura é definida como o diâmetro antero-posterior da próstata, o comprimento é definido como o diâmetro longitudinal (distância entre o esfíncter externo e a bexiga), enquanto a largura refere-se ao diâmetro transversal máximo, ao nível médio da glândula (Park *et al.*, 2000). Estas dimensões poderão ser obtidas através de duas seções perpendiculares no exame ultrassonográfico: a seção transversal e a seção longitudinal da próstata (Tyloch e Wieczorek, 2017). No entanto, na clínica, existe uma maior preferência em obter medições unidimensionais. Neste caso, a aplicação da fórmula de um esferoide prolato também demonstra ser precisa e reprodutível na determinação do volume real da próstata e sua medição

apenas necessita do plano transversal da próstata (Eri *et al.*, 2002; Mitterberger *et al.*, 2010). A fórmula é descrita como:

$$Volume\ do\ esferoide\ prolato\ (cm^3) = (altura \times largura^2) \times \frac{\pi}{6}$$

Singh *et al.* (2015) desenvolveram uma técnica de ultrassonografia de alta frequência que permitiu quantificar o volume da próstata em murganhos vivos, de forma precisa e reprodutível, através da reconstrução de imagens em duas dimensões para uma estrutura de três dimensões, através da utilização de um *software* próprio. Adicionalmente, conseguiram determinar o crescimento ou a regressão do órgão após uma manipulação hormonal.

1.9.1. Modo B

O modo B (modo brilho) permite visualizar a estrutura da próstata, baseando-se no princípio da emissão de ultrassons pela sonda e na recolha destes em forma de ecos, refletidos pelos tecidos subjacentes à sonda. Os ecos são revelados no visor como pontos brilhantes, que no seu conjunto forma uma imagem bidimensional numa escala em tons de cinza. O brilho de cada ponto é proporcional à amplitude de cada eco e a sua posição corresponde à profundidade na qual o eco teve origem, em relação ao eixo do feixe da sonda. As estruturas que não refletem os ultrassons aparecem com a cor preta no monitor e são denominadas hipoecóicas (Mattoon e Nyland, 2015b).

A imagem, neste modo, pode ser obtida em tempo diferido, movendo o transdutor ao longo de uma superfície de um indivíduo e promovendo a deslocação dos feixes de ultrassons nessa superfície, sendo a imagem posteriormente reconstituída. Atualmente, os transdutores emitem feixes sequenciais e permitem a obtenção imediata de imagens. Nestas condições, denomina-se modo B em tempo real. A qualidade de imagem é afetada por uma série de fatores incluindo as propriedades da sonda aplicada (frequência e comprimento de onda), a disposição e tipos de estruturas subjacentes (Mattoon e Nyland, 2015b).

1.9.2. Modo Doppler

O modo *Doppler* tem sido utilizado para detetar o aumento de vascularização que está associado ao cancro, especialmente nas neoplasias isoecogénicas (Ghai e Toi, 2012). Este modo demonstra a presença de vasos sanguíneos através da deteção de um sinal acústico modificado, refletido pelo sangue em movimento (Aigner *et al.*, 2010). A tecnologia *Doppler* subdivide-se em *Color Doppler* e *Power Doppler*. O *Color Doppler* é capaz de revelar um elevado número de vasos, incluindo o seu tamanho, fluxo e informações quanto à irregularidade dos vasos no CP. Porém, não conseguiu aumentar de forma significativa a especificidade e a sensibilidade, em relação ao modo B convencional (Pallwein *et al.*, 2007; Talab *et al.*, 2012). O *Power Doppler* reflete a amplitude do sinal *Doppler*, não demonstrando a direção do fluxo sanguíneo. É uma técnica mais sensível na deteção de pequenos vasos com um fluxo lento, sendo mais útil em relação ao *Color Doppler* na deteção de vascularização do CP. O uso das técnicas convencionais do modo *Doppler* apenas aumentou 5-10% na especificidade, sendo incapaz de substituir a necessidade da realização de uma biopsia para a monitorização do CP (Aigner *et al.*, 2010; Harvey *et al.*, 2012).

1.9.3. Modo Contraste

O cancro está associado ao aumento da densidade microvascular intratumoral, devido à promoção da síntese de fatores para a angiogénese. O aumento da neovascularização está fortemente correlacionada com o prognóstico e progressão do CP (Aigner *et al.*, 2010). O modo B possui a vantagem de produzir imagens em tempo real com uma excelente resolução espacial e temporal. No entanto, existem enormes dificuldades na deteção de pequenos vasos sanguíneos, devido ao facto de o sinal acústico do sangue ser 34 a 40 decibéis abaixo, em relação às paredes que o rodeiam. Adicionalmente, o fluxo de sangue nos tumores é inferior em relação ao fluxo nos tecidos normais, uma vez que, os vasos intratumorais apresentam um “trajeto” sinuoso e um aumento na resistência no fluxo (Pollard *et al.*, 2015). O *Doppler* também não se revelou capaz de detetar a neovascularização, dado que a vascularização tumoral apresenta um diâmetro na ordem dos 10 a 50 μm , o qual é bastante inferior ao limite de resolução de 1 mm das técnicas convencionais de *Doppler* (Ghai e Toi, 2012; Harvey *et al.*, 2012).

A utilização de meios de contraste na ultrassonografia permitiu a visualização de vasos que contêm um pequeno volume de sangue. O primeiro agente de contraste consistia numa solução salina agitada. As bolhas libertadas desta solução originavam ecos bastantes distintos e brilhantes na imagem ultrassonográfica (Pollard *et al.*, 2015). Posteriormente, foram desenvolvidos novos agentes que melhoraram a deteção de vasos com pouco volume de sangue, permitindo um melhor delineamento da estrutura neovascular através do aumento da relação sinal-ruído.

As microbolhas dos meios de contraste são pequenas o suficiente, de diâmetro entre 1 a 10 μm (tamanho similar a um eritrócito), para atravessar os microvasos no CP. Estas, apresentam um conteúdo de ar que é envolvido por uma cápsula externa de teor de albumina ou de um polímero de fosfolípidos. Após a administração do meio de contraste, as microbolhas atravessam a circulação pulmonar e alcançam os vasos de vários órgãos, incluindo a próstata. As microbolhas apresentam uma longevidade intravascular de vários minutos e, a sua exposição a um feixe de ultrassom, poderá provocar a sua destruição ou emissão de um eco (Kundavaram *et al.*, 2012).

Os agentes de contraste mais utilizados são o SonoVue[®] e o Levovist[®]. O Levovist[®] pertence à primeira geração dos meios de contraste, consistindo numa suspensão de micropartículas do monossacárido galactose (de 2 a 8 μm , de diâmetro). Este é capaz de passar pela circulação pulmonar, ao qual permite a sua recirculação, prolongando o período para a recolha de imagens. Contudo este agente não produz uma razão elevada de sinal-ruído (Plew *et al.*, 2000; Pollard *et al.*, 2015). O SonoVue[®] é um agente da segunda geração, constituído por microbolhas de hexafluoreto sulfúrico (SF_6), um gás inócuo de fraca solubilidade e altamente ecogénico. Estas microbolhas apresentam uma elevada estabilidade e são mais resistentes a pressões. O SonoVue[®] é isotónico em relação ao plasma humano, apresenta uma viscosidade semelhante ao sangue humano e não contém qualquer tipo de material proteico, minimizando uma resposta antigénica num paciente. Este agente de contraste não extravasa para o meio extravascular, mantendo-se nos vasos sanguíneos, até este ser eliminado pela expiração ou após rebentamento das microbolhas (Bokor, 2000; Pollard *et al.*, 2015).

A interpretação do sinal da ultrassonografia de contraste (USC), depende da experiência do operador. Foram desenvolvidas várias técnicas de quantificação dos parâmetros hemodinâmicos, de forma a avaliar a perfusão vascular numa região de interesse (ROI), com menor dependência do operador: uma delas é a formação de uma curva de tempo-intensidade

(TIC). As curvas TIC apresentam determinados parâmetros como: intensidade do pico (PI [%]); intensidade da linha de base; tempo de chegada (AT [s]) – definido como o tempo ao qual o primeiro ponto da curva fica claramente acima da intensidade da linha de base; tempo de chegada do meio de contraste, até ao PI (TTP [s]); o tempo de trânsito médio (MTT [s]) - que representa o intervalo de tempo entre a metade do PI ascendente (*wash-in*) e a outra metade descendente (*wash-out*) (Troisi *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016).

Página propositadamente deixada em branco

2. Objetivos

Este trabalho apresenta os seguintes objetivos:

- Indução química e hormonal de tumores prostáticos em ratos machos da estirpe Wistar Unilever e monitorização dos animais;
- Acompanhar e avaliar, ultrassonograficamente, a evolução dos tumores prostáticos (aspeto, dimensão e vascularização), entre animais sedentários e exercitados, utilizando dois modos de ultrassonografia: modo B e Contraste.

Página propositadamente deixada em branco

3. Materiais e métodos

3.1. Considerações prévias

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho encontram-se em conformidade com a legislação Portuguesa (Decreto-lei nº 113/2013) sobre a utilização de animais para fins experimentais, após aprovação pela comissão de ética da UTAD e pela Direção-Geral de Agricultura e Veterinária (licença nº 021326). O protocolo experimental desta dissertação de mestrado faz parte de um projeto intitulado “Exercício Físico para a prevenção do cancro da próstata: estudo das bases moleculares subjacentes”, financiado pelos: fundos de investimento europeu FEDER/COMPETE/POCI - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização, no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-016728; fundos nacionais da FCT – Fundação para Ciência e Tecnologia, no âmbito do projeto PTDC/DTP-DES/6077/2014.

3.2. Animais

Neste ensaio experimental, foram utilizados 41 ratos, do sexo masculino, da espécie *R. norvegicus*, da estirpe Wistar Unilever. Estes animais foram adquiridos à empresa Charles River Laboratories (França) e chegaram ao biotério da UTAD, Vila Real, com quatro semanas de idade. Após a sua chegada os animais foram distribuídos aleatoriamente pelas gaiolas e submetidos a um período de quarentena com duração de duas semanas, de forma a permitir a sua adaptação às condições do biotério.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo I (controlo sedentário, n=10); Grupo II (controlo exercitado, n=10); Grupo III (CP sedentário, n=10); Grupo IV (CP exercitado, n=11).

3.3. Protocolo experimental

Na figura 4 observa-se o delineamento experimental deste protocolo.

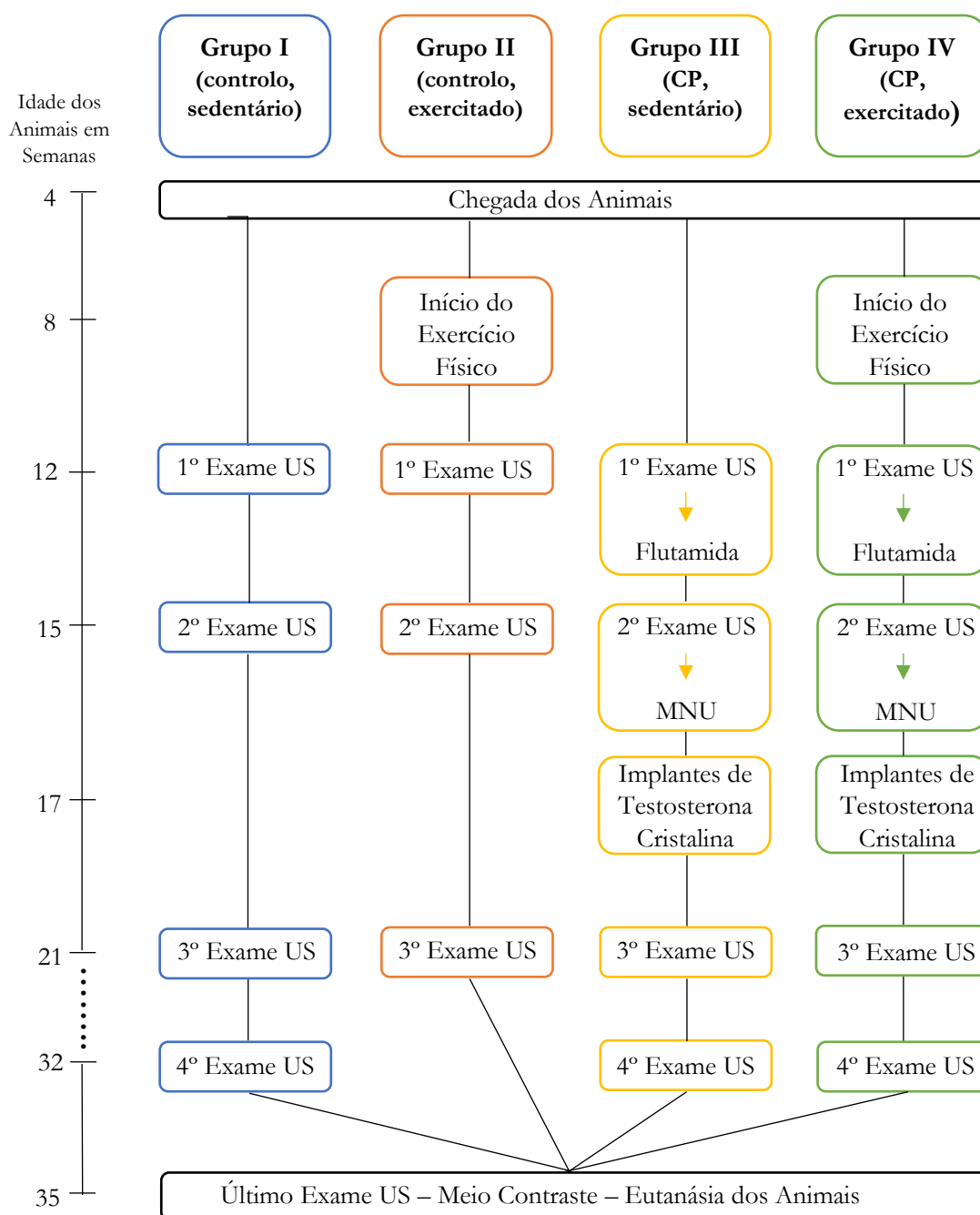


Figura 4. Esquema do protocolo experimental realizado (US- ultrassonografia).

3.4. Marcação dos animais

A marcação dos animais foi realizada, após o período de quarentena, de forma a diferenciá-los. Os animais foram identificados através de corte na orelha, representado na figura 5.

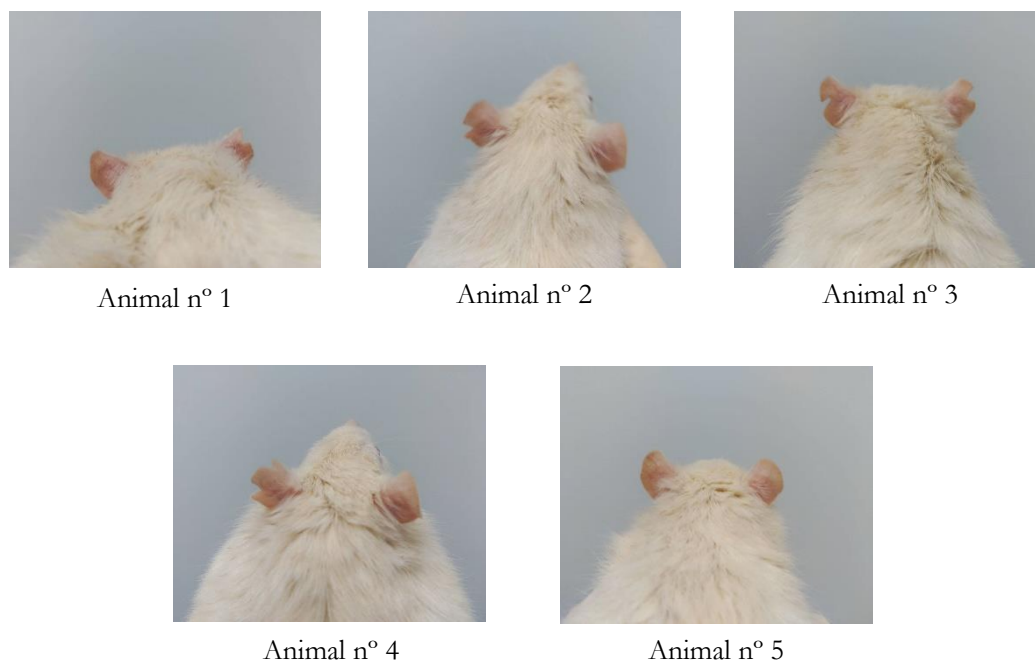


Figura 5. Identificação dos animais através do corte nas orelhas.

3.5. Condições de manutenção e monitorização dos animais

Durante o procedimento experimental, os animais foram mantidos numa sala do biotério da UTAD, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e de humidade relativa ($50 \pm 10\%$), um sistema de luz com temporizador de forma a garantir um ciclo de 12 horas de luz e 12h de escuridão por dia (período da noite das 08h00 até 20h00).

Os animais foram alojados em dois tipos de gaiolas de policarbonato (Eurostandard Tipo IV 1354G, Tecniplast, Itália; Eurostandard Tipo IV S 1500U, Tecniplast, Itália), as quais foram revestidas com carolo de milho, fornecido pela empresa Ultragene (Santa Comba Dão, Portugal) (Figura 6). Para enriquecer o ambiente foi colocado em cada gaiola um ou dois tubos de plástico duro. As gaiolas foram lavadas semanalmente de forma a manter uma adequada limpeza. Os animais tiveram à disposição em regime *ad libitum* a comida (ração Diet Standard 4RF21[®], Ultragene, Itália) e a água. A massa da ração e da água foi determinadas semanalmente, numa balança de precisão (KERN[®] PLT 6200-2A, Dias de Sousa S. A., Alcochete, Portugal) de forma a calcular o consumo médio diário de água e de alimento por animal.

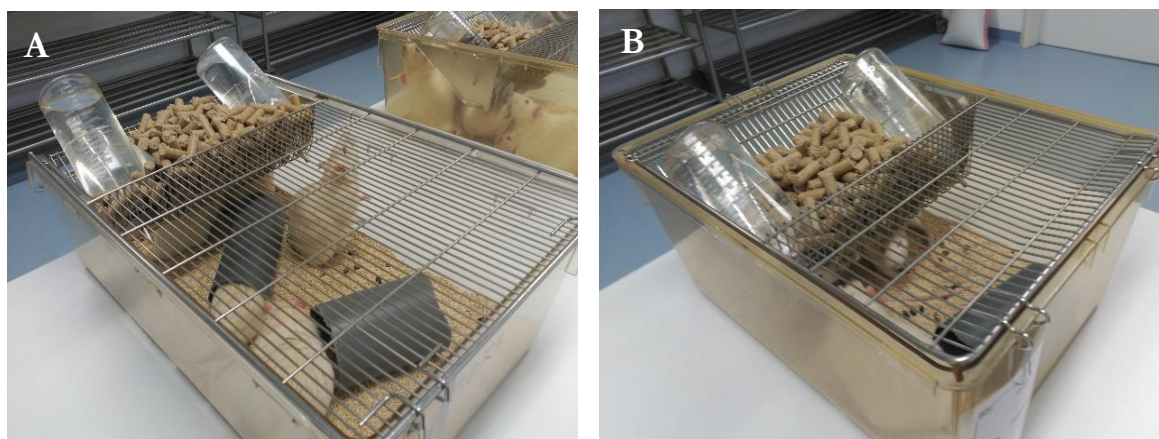


Figura 6. Representação das gaiolas (A- Eurostandard Tipo IV 1354G, Tecniplast, Itália; B- Eurostandard Tipo IV S 1500U, Tecniplast, Itália) utilizadas para o alojamento animal, com cama de carolo de milho, comida, água e enriquecimento ambiental.

3.6. Determinação da massa corporal

Ao longo do procedimento, a massa corporal dos animais foi determinada quinzenalmente, através do uso da balança descrita anteriormente para a medição da massa da ração e da água.

3.7. Plano de exercício dos animais

A partir da 8ª semana de vida, os animais dos grupos II e IV foram submetidos a um plano de exercício crónico. O plano de exercício consistiu na realização de corridas diárias, cinco vezes por semanas, em dois tapetes rolantes, cada um com cinco faixas (Treadmill Control 8710 da Panlab Harvard Apparatus). No final de cada faixa existe uma rede metálica que distribui choques de forma a promover o exercício dos animais que se recusam a correr. Cada tapete rolante apresenta uma unidade de controlo que permite ao operador controlar a velocidade do tapete e a intensidade do choque. Nessa unidade é ainda possível observar informações da atividade de cada animal como: distância percorrida, tempo que o animal permaneceu na rede metálica e o número de choques (Figura 7).

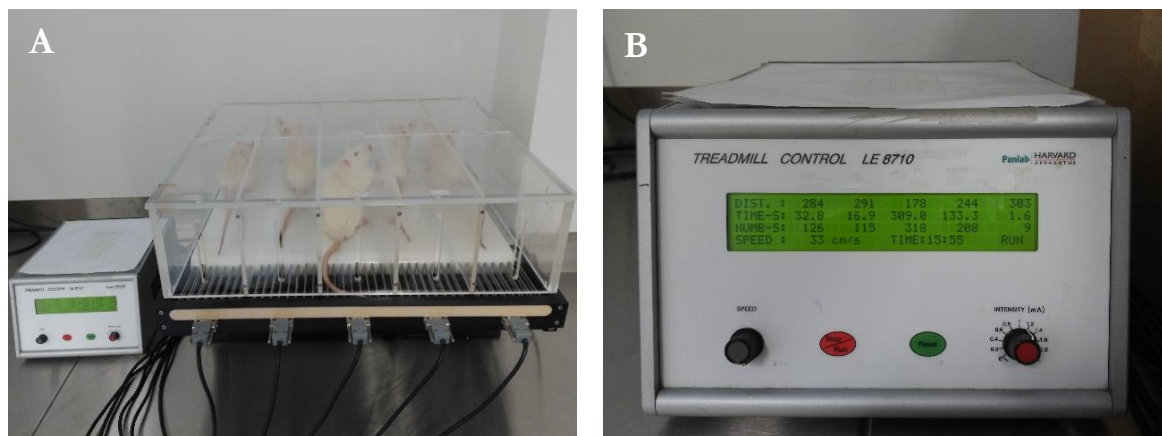


Figura 7. Representação do tapete rolante, com cada faixa ocupada pelos animais em estudo (A) e a unidade de controlo (B).

A atividade e a condição física dos animais foram sempre monitorizadas, pelo menos por um operador, de forma a permitir a aplicação de *endpoints* humanos pré-estabelecidos e a salvaguardar a qualidade de vida do animal durante o procedimento. O animal ao apresentar sinais concretos de fadiga ou de uma lesão acidental era retirado da sessão de exercício temporariamente e posteriormente avaliado por um médico veterinário, de forma a determinar e justificar se o animal poderia reentrar no estudo (após recuperar completamente, sem comprometer a fidelidade dos resultados) ou removê-lo completamente do procedimento experimental.

Inicialmente, no protocolo do exercício (Anexo A) os animais dos grupos II e IV foram aclimatizados ao tapete rolante durante 3 semanas, com uma velocidade de 15 m/min e um tempo de corrida com um aumento gradual do período de exercício de 20 para 60 min/dia. Após o período de aclimatização, os animais foram exercitados 60 min/dia com um aumento gradual da velocidade de 20 para 36 m/min, até à 17ª semana de protocolo do exercício (24ª semana de vida dos animais). Foram realizados três testes de esforço, mimetizando o protocolo de Bruce em humanos (Bruce, 1971), com aumentos de velocidade de corrida, de minuto a minuto, até à exaustão, no qual se avalia a aptidão cardiorrespiratória (com medição de gases respiratórios), o que permite obter, indiretamente, o VO_2 máx. (consumo máximo de oxigénio). Através dos dados descritos anteriormente, ajustou-se a intensidade de exercício para cada animal de forma a otimizar o protocolo. Contudo, estes resultados não vão ser abordados ou descritos no relatório desta dissertação, uma vez que não consta dos objetivos propostos. A intensidade de treino para cada animal, a partir da 17ª semana do protocolo de exercício encontra-se descrita em anexo.

O plano de exercício terminou na 28ª semana (35ª semana de vida dos animais), dois dias antes da eutanásia dos animais.

Os animais dos grupos não exercitados (grupo I e III) foram colocados, uma vez por semana, no tapete rolante, de forma a proporcionar as mesmas condições ambientais dos grupos exercitados.

3.8. Indução dos tumores prostáticos

A indução foi realizada de acordo o modelo de Bosland (1996) reformulado. Na 12ª semana de vida dos animais realizou-se uma administração sequencial da flutamida (fármaco anti-androgénio) (*Flutamide*, >98% de pureza, de registo CAS 13311-84-7, TCI) na dose de 20 mg/kg, por via subcutânea, durante 21 dias consecutivos. Posteriormente, pela mesma via, realizou-se uma única administração de 100 mg/kg de propionato de testosterona (*Testosterone Propionate*, >98,0% de pureza, TCI). No instante em que a proliferação celular máxima foi atingida (48h depois da administração do propionato de testosterona), promoveu-se o início do processo da carcinogénese pela administração do agente carcinogénico MNU (*N-methyl-N-nitrosourea*, 1g, de registo CAS 684-93-5, Carbosynth), com uma dosagem de 30 mg/kg, por via intraperitoneal. Para promover um tratamento crónico de testosterona, recorreu-se à cirurgia (na 17ª semana de vida dos animais) para colocar implantes de testosterona cristalina (tubos de 3,5 cm de comprimento) (*Testosterone*, >99% de pureza, de registo CAS 58-22-0, SIGMA), na região interescapular de cada animal induzido, sendo estes previamente sedados por ketamina, com uma concentração de 90 mg/kg (Imalgene® 1000, Merial S.A.S., Lyon, França) e xilazina com uma concentração de 9 mg/kg (Rompum® 2%, Bayer Healthcare S.A., Kiel, Alemanha).

3.9. Monitorização da próstata por ultrassonografia

A monitorização foi realizada através da ultrassonografia transabdominal. A próstata de cada animal foi avaliada nas semanas 12, 15, 21, 32 de vida, através do modo B com uma sonda linear na frequência 12 MHz (multi-frequência 3-12 MHz), do aparelho Logic P6® (General Electric Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, EUA) (Figura 8A). No final do protocolo experimental (35ª semana de vida, o 5º exame), as próstatas foram avaliadas no modo descrito

anteriormente e pelo modo de Contraste. Antes do estudo, procedeu-se à tricotomia da região abdominal do animal com uma máquina tosquiadora (AESCULAP® GT420 Isis, Aesculap Inc., Center Valley, Pensilvânia, EUA) e aplicou-se gel ultrassonográfico (Aquasonic®, Parker Laboratories Inc., Fairfield, Nova Jersey, EUA) para transmissão dos ultrassons sem interferência do ar.

As imagens ultrassonográficas obtidas nos quatro primeiros exames (12, 15, 21 e 32) foram obtidas num plano transversal, com os animais conscientes e contidos em decúbito por um operador, enquanto que outros dois operadores (com experiência na área da ultrassonografia) posicionavam o transdutor e gravavam as imagens no aparelho (Figura 8B).

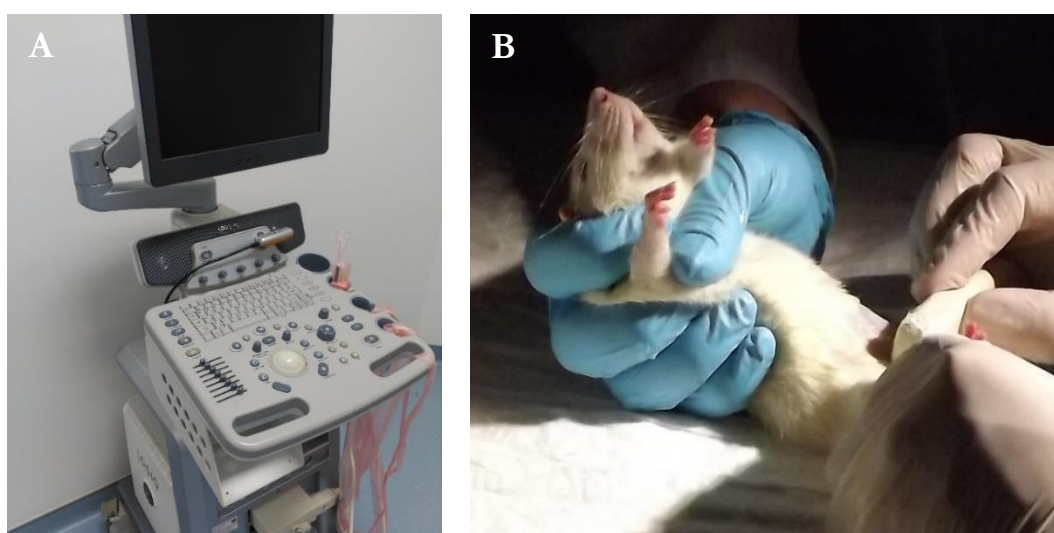


Figura 8. Representação do aparelho Logic P6® utilizado (A) e a obtenção de imagens ultrassonográficas num plano transversal (B).

Para a obtenção das imagens foram realizados varrimentos com pouca pressão de forma a evitar a distorção dos tecidos subjacentes e as dimensões da próstata. A localização e identificação dos lobos da próstata dorsal e ventral foram conseguidas usando a bexiga e a uretra como pontos de referência.

Na realização do último exame ultrassonográfico, os animais foram previamente anestesiados por uma administração, de ketamina com uma concentração de 75 mg/Kg (Imalgene® 1000, Merial S.A.S., Lyon, França) e xilazina com uma concentração de 10 mg/Kg (Rompum® 2%, Bayer Healthcare S.A., Kiel, Alemanha), por via intraperitoneal. Foram obtidas imagens no modo B com as condições descritas anteriormente. A USC foi realizada com uma

sonda linear de 10 MHz (com um índice mecânico baixo, no valor de 0,09, para evitar uma destruição precoce das bolhas de contraste), usando como meio de contraste o SonoVue® com uma concentração de 8 µl/ml (Bracco, Amesterdão, Holanda), suspenso em 5 ml de uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, conforme indicado na bula. Foi administrado em cada animal 0,1 ml da suspensão, por via intravenosa, através de um cateter de 24G (Introcan® SafetyBraun™, Braun, Bethlehem, Pensilvânia, EUA) colocado na veia caudal. A administração foi realizada pelo mesmo operador para evitar variações na técnica e obter resultados reprodutíveis.

3.9.1. Determinação da dimensão da próstata

Para cada animal foram obtidas imagens no plano transversal da próstata, nas datas descritas anteriormente. Foram selecionadas imagens representativas de cada animal, ou seja, as imagens em que a próstata surge com os diâmetros máximos para cada lobo e com as extremidades bem definidas. Recorreu-se aos cursores incorporados no aparelho ultrassonográfico utilizado para determinar o diâmetro maior (comprimento) e menor (largura) de cada lobo (Figura 9).

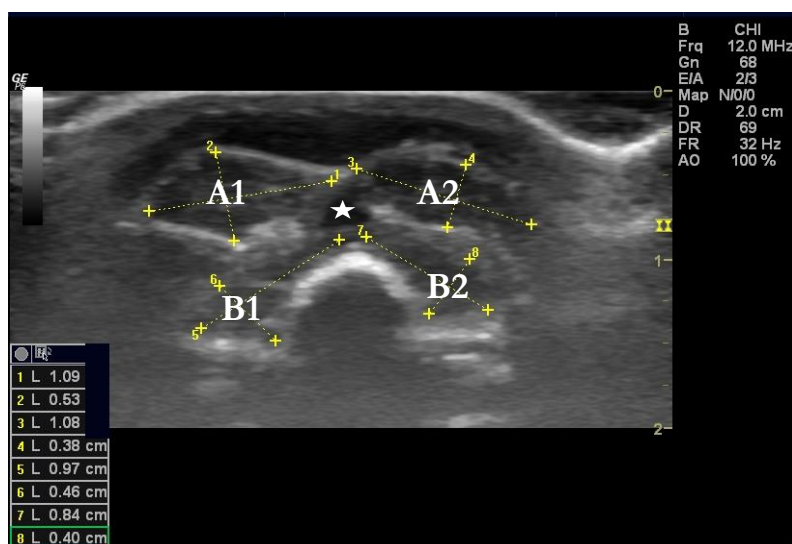


Figura 9. Imagem transversal dos lobos ventrais (A1: direita, A2: esquerda) e dorsais (B1: direita, B2: esquerda), usando a bexiga como ponto de referência (estrela). Apresentação dos valores dos eixos de cada lobo (canto inferior esquerdo) obtidos através dos cursores integrados no aparelho ultrassonográfico. No canto superior direito é possível visualizar as características utilizadas no exame (frequência da sonda, percentagem de ganho).

Aplicou-se a fórmula da área de uma elipse nos lobos de forma a calcular a área dos mesmos, sendo descrita como:

$$\text{Área da elipse (cm}^2\text{)} = \pi \times r \text{ do comprimento} \times r \text{ da largura}$$

A área total da próstata ventral ou dorsal resultou da soma das região esquerda e direita para cada lobo. Foi calculada a média da área da próstata ventral para cada grupo em todas as datas indicadas no protocolo experimental, com a exceção da semana 32, na qual não se realizou qualquer exame ultrassonográfico nos animais do grupo II. Relativamente à média da próstata dorsal, foi somente determinada, para cada grupo, nos dois últimos exames ultrassonográficos. A determinação do diâmetro dos lobos prostáticos e o cálculo da média para cada grupo foram sempre realizados pelo mesmo operador.

3.9.2. Quantificação da ecogenicidade no modo B

Como objetivo de averiguar a existência de uma heterogeneidade ecogénica nas glândulas prostáticas dos diferentes grupos, no decorrer do protocolo experimental, procedeu-se à quantificação da intensidade do eco (IE).

Foi definido uma região de interesse (ROI) quadrada constante de 25x25 pixéis, em cada lobo no modo B. Antes deste procedimento, a percentagem do ganho das imagens ultrassonográficos foi ajustado para o valor 62. Como já foi referido anteriormente, não existe qualquer informação referente ao grupo II no 4º exame ultrassonográfico (semana 32 de vida do protocolo experimental).

A média da IE na ROI foi obtida recorrendo à exibição do histograma e dos valores de pixéis num software de análise de imagens (Adobe Photoshop® CS6, versão 13.0), como é ilustrado na figura 10. A ROI foi sempre estabelecida, pelo mesmo operador de forma subjetiva, no centro de cada lobo ventral e dorsal (esquerda e direita).

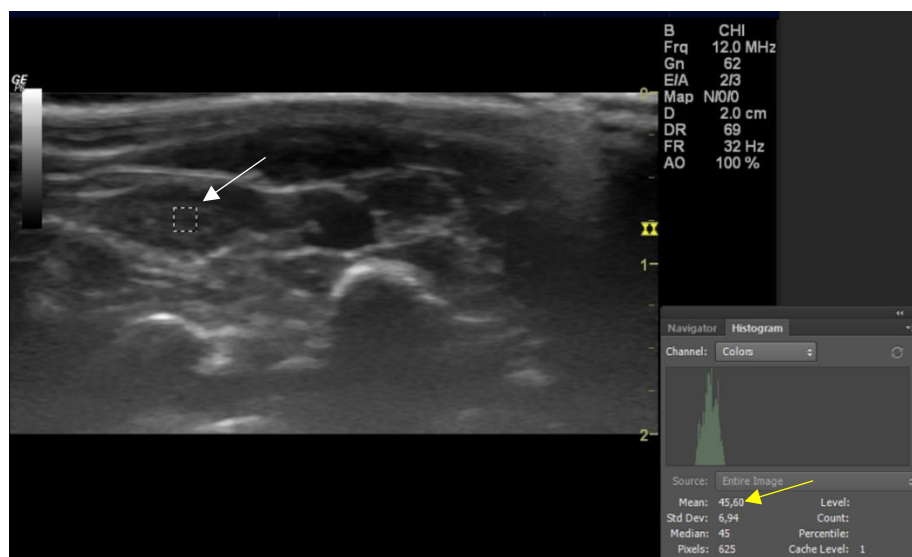


Figura 10. Representação ilustrativa da medição da IE (seta amarela) na ROI (25x25 pixels) do lobo ventral direito (seta branca) através dos recursos disponíveis pelo *software* utilizado.

3.9.3. Quantificação da ecogenicidade no modo Contraste

Baseado no mesmo princípio de avaliação quantitativa da textura descrito anteriormente, procedeu-se à determinação da média de IE, em duas ROIs constantes (25x25 pixels) e em tempos diferentes, no que diz respeito à distribuição do meio de contraste pelo tecido prostático.

Após a administração do meio de contraste procedeu-se à gravação de vídeo no modo Contraste. Na visualização do vídeo, efetuou-se o “congelamento” da imagem em dois tempos (no aparelho ultrassonográfico), sendo que: o tempo 0 (T0) - momento em que o meio de contraste foi administrado; e o tempo 1 (T1) - instante em que se observou, a olho nu, a maior intensidade de ecos, em duas ROIs (uma na periferia e outra no interior do tecido prostático). Antes de transferir as imagens para um *hardware* de armazenamento, foram ajustadas para uma percentagem de ganho no valor de 90. Posteriormente determinou-se a média de IE, através do *software* utilizado previamente, para cada ROI, no T0 e no T1. A marcação das ROIs nas imagens e sua medição da IE foi sempre realizada pelo mesmo operador (Figura 11).

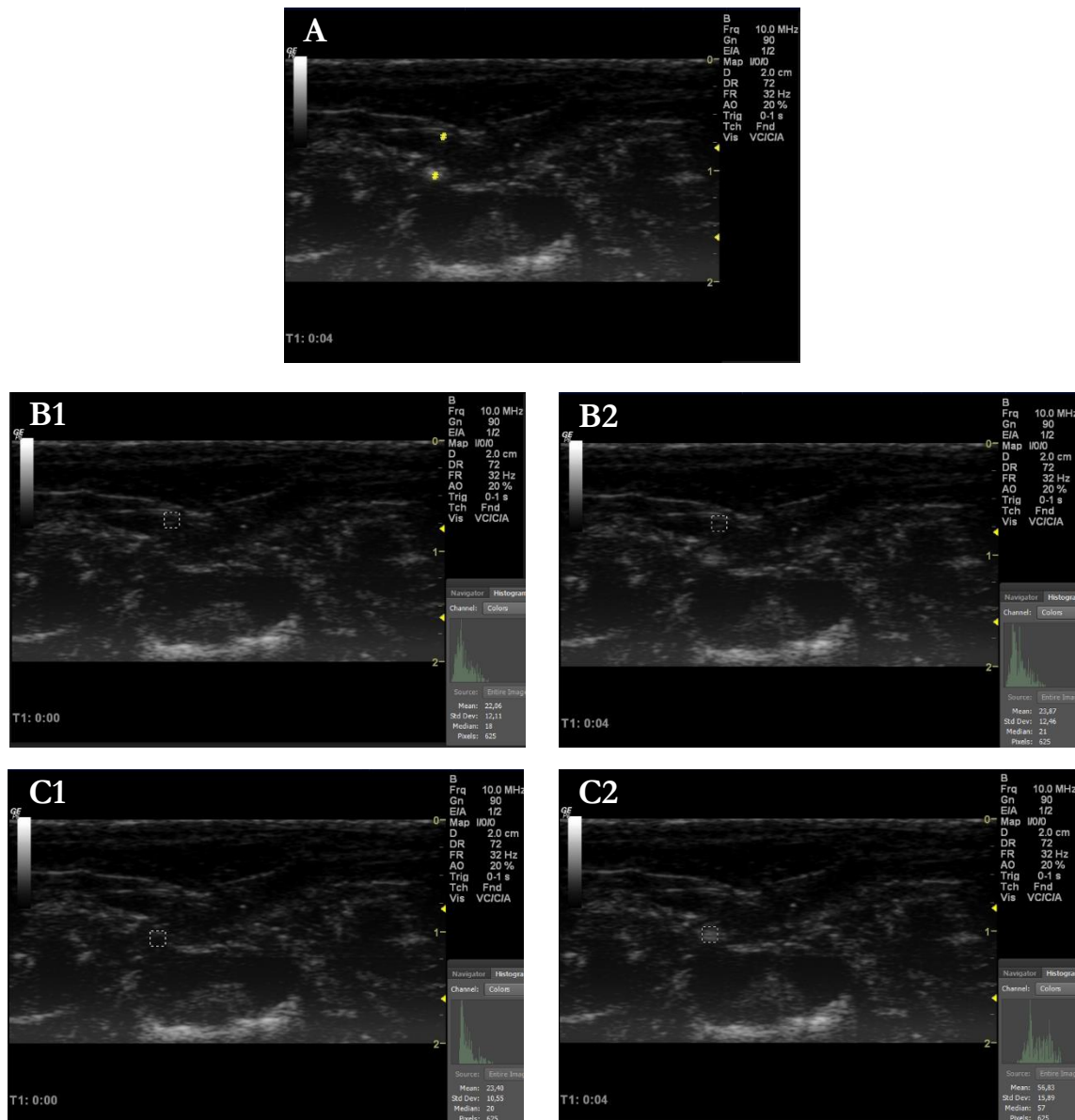


Figura 11. Representação ilustrativa da medição da IE nas duas ROIs (setas), em tempos diferentes. A- Visualização do vídeo, no aparelho Logic P6®, e congelamento das imagens no instante em que o meio de contraste foi administrado (T0, não ilustrado) e no momento em que foi observado um forte sinal ecogénico (T1, a 4s do vídeo) na passagem do meio de contraste pelos vasos (estabelecido a olho nu). As duas ROIs foram estabelecidas, através de um cursor do aparelho ultrassonográfico (cardinal amarelo), nos dois locais em que foram observados uma maior intensidade de eco (um no interior [cardinal superior] e outro na periferia da glândula [cardinal inferior]). B1 e C1- Leitura da média da IE no tempo T0 na ROI no interior (B1) e na periferia da glândula (C1); B2 e C2- Leitura da média da IE no tempo T1 na ROI no interior (B2) e na periferia da glândula (C2).

3.10. Eutanásia

Após a realização do último exame ultrassonográfico e aproveitando a anestesia administrada, procedeu-se à exsanguinação dos animais em estudo por punção cardíaca, sendo um método indicado pela FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Associations*), para proceder à eutanásia dos animais.

3.11. Recolha das amostras

Foi efetuada uma necrópsia completa aos animais sacrificados para este estudo. Os órgãos reprodutores (a próstata, testículo esquerdo e direito, a vesícula seminal e a glândula bulbouretral) e todos os outros órgãos (o coração, o pulmão, o timo, o fígado, o baço, a adrenal esquerda e direita, a bexiga e o rim esquerdo e direito) foram observados macroscopicamente e registadas todas as alterações observadas. As massas dos órgãos foram determinadas individualmente numa balança (KERN® PLJ 750-3N, KERN & SOHN GmbH, 72336 Balingen, Alemanha) e de seguida fixados em formaldeído a 4% (10% solução de formalina, tamponado a $7.0 \pm 0.2\text{pH}$, lote 16J244140, VWR Chemicals, 3001 Lovaina, Bélgica).

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS® (*Statistical Package for the Social Science*, versão 17 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Bonferroni*, foi utilizada para determinar as diferenças significativas na média inicial e final da massa corporal e no ganho ponderal de cada grupo, bem como no valor médio dos órgãos reprodutores. Calculou-se ainda o índice de homogeneidade ponderal e o índice de perdas.

Para o cálculo do índice de homogeneidade ponderal (HP), feito no início do protocolo experimental, tendo em conta o peso inferior (P_i) e o peso superior (P_s) dos animais, utilizou-se a seguinte fórmula (Faustino-Rocha, 2012):

$$HP = \frac{2Pi}{Pi + Ps}$$

A percentagem média do ganho ponderal (%Gp) foi calculada para cada grupo, tendo em conta o peso médio inicial (Pin) e o peso médio final dos animais (Pf), com base na seguinte fórmula (Faustino-Rocha, 2012):

$$\%Gp = \left(\frac{Pf - Pin}{Pf} \right) \times 100$$

O teste de *Bonferroni* foi ainda utilizado para comparar as médias da área e da intensidade do eco nos diferentes grupos e no decorrer do protocolo experimental. Foi utilizado o teste T de *Student* independente para determinar as diferenças existentes nas médias da área e da intensidade do eco na região dorsal da próstata, no mesmo grupo, entre os dois últimos exames ultrassonográficos. Usou-se o teste T de *Student* emparelhado para avaliar a existência de diferenças significativas na média da IE, no modo Contraste, para duas ROIs (periferia e no interior da glândula) em tempos diferentes (T0 e T1), em cada grupo. Adicionalmente, recorreu-se novamente ao ANOVA para comparar a média da massa absoluta e relativa dos órgãos entre os grupos experimentais. As diferenças são consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

No final do procedimento experimental calculou-se o índice de perdas (%IP) para cada grupo (Reis, 2013), que representa a percentagem dos animais que foram excluídos neste estudo.

$$\%IP = \frac{n^{\circ} \text{ de animais excluídos}}{n^{\circ} \text{ de animais no início do ensaio}} \times 100$$

Página propositadamente deixada em branco

4. Resultados

4.1. Comportamento dos animais e índice de perdas

Durante o procedimento experimental, os animais do grupo I mostraram uma atividade normal, no entanto um animal pertencente a esse grupo foi sacrificado (na 28ª semana de vida dos animais) por desenvolver um tumor espontâneo na região facial. Em conjunto com este animal, outro animal do grupo IV foi sacrificado, de forma a realizar um estudo prévio da anatomia e fisiologia dos animais. Um outro animal do grupo I morreu na semana 35 de vida (antes do fim do protocolo experimental), por não conseguir recuperar de uma anestesia necessária para a realização de um exame de tomografia axial computadorizada, no âmbito do projeto. Estes três animais foram excluídos do estudo. Em conformidade com os nossos parâmetros de *endpoints* avaliados, não foi necessário sacrificar nenhum animal. Na tabela 1 pode observar-se o índice de perdas (%IP) para cada grupo experimental.

Tabela 1. Número de animais na semana 5 e 35 de vida e o respetivo %IP, para cada grupo.

Grupos	Semana 5	Semana 35	%IP
I (controlo, sedentário)	10	8	20
II (controlo, exercitado)	10	10	0
III (CP, sedentário)	10	10	0
IV (CP, exercitado)	11	10	9,09

Os animais dos grupos em que a doença foi induzida, III e IV, no decorrer do protocolo, exibiram uma menor atividade dentro da gaiola, em relação aos restantes grupos. Relativamente ao exercício de esforço no tapete rolante, os animais do grupo IV revelaram um menor desempenho em comparação ao grupo II, na fase final do ensaio experimental.

4.2. Consumo de comida e de água

No final do protocolo experimental foi realizado uma comparação dos consumos médios diários de comida e água por animal, para a primeira (semana 5 de vida) e a última semana (semana 35 de vida) do ensaio (Tabela 2).

Tabela 2. Média ($\pm$ EP) do consumo médio diário de comida e água nos grupos I, II, III e IV nas semanas 5 e 35 de vida.

Grupo		Consumo de comida (g)		Consumo de água (g)	
		Semana 5	Semana 35	Semana 5	Semana 35
I (N=8)	Controlo sedentário	16,365 $\pm$ 0,135	19,060 $\pm$ 0,050	21,085 $\pm$ 1,055	18,070 $\pm$ 0,080
II (N=10)	Controlo exercitado	12,560 $\pm$ 4,910	16,350 $\pm$ 0,570	20,950 $\pm$ 0,300	23,840 $\pm$ 1,120
III (N=10)	CP sedentário	16,125 $\pm$ 0,155	23,825 $\pm$ 3,465	17,045 $\pm$ 0,865	22,785 $\pm$ 3,985
IV (N=10)	CP exercitado	16,187 $\pm$ 0,420	22,700 $\pm$ 2,625	19,613 $\pm$ 0,415	26,600 $\pm$ 4,042

4.3. Índice de homogeneidade ponderal

No início do protocolo experimental foi calculado o HP entre os animais dos quatro grupos. O grupo IV (CP, exercitado) foi o que teve maior HP, enquanto que o grupo III (CP, sedentário) apresentou o menor valor (Tabela 3).

Tabela 3. Peso inferior (Pin), Peso superior (Ps) e o índice de HP para os grupos I, II, III e IV.

Grupos	Pin (g)	Ps (g)	Índice de HP
I (controlo, sedentário)	148,320	185,230	0,889
II (controlo, exercitado)	129,960	176,020	0,849
III (CP, sedentário)	93,970	183,820	0,677
IV (CP, exercitado)	157,710	169,890	0,963

4.4. Média da massa corporal e média do ganho ponderal

A diferença da média da massa corporal no início do ensaio experimental não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos, enquanto que no final foi verificada uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o mesmo parâmetro. No final do protocolo foi também determinado a percentagem média do ganho ponderal para cada grupo, sendo que os grupos sedentários (I e III) apresentaram um maior ganho e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação aos grupos exercitados (II e IV) (Tabela 4).

Tabela 4. Média ($\pm$ EP) da massa corporal inicial e final e percentagem da média do ganho ponderal (%GP) para os grupos I, II, III, IV. CTR – controlo, CP – cancro da próstata, sed – sedentário e ex – exercitado.

Grupo	I	II	III	IV
	CTR sed (N=8)	CTR ex (N=10)	CP sed (N=10)	CP ex (N=10)
Média da massa corporal inicial (g)	164,921 $\pm$ 4,559	162,394 $\pm$ 4,187	147,703 $\pm$ 7,604	162,889 $\pm$ 1,259
Média da massa corporal final (g)	471,721 $\pm$ 9,816 ^a	404,174 $\pm$ 4,570 ^b	408,075 $\pm$ 7,421 ^c	366,780 $\pm$ 4,051
Média do %GP	64,963 ^d	59,820	63,879 ^e	55,529

^a Diferença estatisticamente significativa da média da massa corporal final entre o grupo I e os grupos II, III e IV ($p < 0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa da média da massa corporal final entre o grupo II e o grupo IV ($p < 0,05$);

^c Diferença estatisticamente significativa da média da massa corporal final entre o grupo III para o grupo IV ($p < 0,05$);

^d Diferença estatisticamente significativa da média do ganho ponderal entre o grupo I e os grupos II e IV ($p < 0,05$);

^e Diferença estatisticamente significativa da média do ganho ponderal entre o grupo III e o grupo IV ($p < 0,05$).

4.5. Análise ultrassonográfica

4.5.1. Dimensão da próstata

No que diz respeito à área ventral prostática entre os quatro grupos não se verificou uma diferença significativa nos dois primeiros exames ultrassonográficos (12 e 15 semanas de vida) ($p > 0,05$). Contudo, registou-se uma diferença significativa entre os grupos nos três últimos exames ($p < 0,05$). No último exame (35 semanas de vida), o grupo IV apresentou a maior área ventral da próstata.

No decurso dos exames ultrassonográficos, registou-se uma diferença significativa nos grupos III e IV ($p < 0,05$). Estes grupos apresentaram a maior área ventral no quarto exame em relação às áreas determinadas no decorrer do protocolo experimental. No entanto, a área prostática ventral dos animais induzidos ao CP sofreu um decréscimo significativo ($p < 0,05$), em apenas 2 semanas (decrécimo registado na semana 35 de vida) (Tabela 5).

Tabela 5. Média ($\pm$ DP) da área da próstata ventral: área lobo direito + área lobo esquerdo. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.

		Avaliação ecográfica / Área próstata ventral (cm ²)				
		Média $\pm$ Desvio Padrão				
Grupo		1ª US (12S) Antes da Flutamida	2ª US (15S) Antes da MNU	3ª US (21S) Após a MNU	4ª US (32S) Após a MNU	5ª US (35S) Após a MNU
I (N=8)	Controlo sedentário	0,328 $\pm$ 0,034	0,351 $\pm$ 0,081	0,478 $\pm$ 0,069 ^a	0,480 $\pm$ 0,116 ^b	0,336 $\pm$ 0,147 ^c
II (N=10)	Controlo exercitado	0,373 $\pm$ 0,089	0,398 $\pm$ 0,105	0,582 $\pm$ 0,096	-----	0,409 $\pm$ 0,188
III (N=10)	CP sedentário	0,376 $\pm$ 0,084	0,290 $\pm$ 0,079	0,637 $\pm$ 0,095	1,778 $\pm$ 0,935 ^d	0,450 $\pm$ 0,189
IV (N=10)	CP exercitado	0,379 $\pm$ 0,140	0,332 $\pm$ 0,141 ^e	0,574 $\pm$ 0,097	1,426 $\pm$ 0,284 ^f	0,657 $\pm$ 0,305

^a Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre o grupo I e o grupo III, na 3ª US ($p<0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre o grupo I e os grupos III e IV, na 4ª US ($p<0,05$);

^c Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre o grupo I e o grupo IV, na 5ª US ($p<0,05$);

^d Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre a 4ª US e a 1ª US, 2ª US, 3ª US e 5ª US, no grupo III ($p<0,05$);

^e Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre a 2ª US e a 5ª US, no grupo IV ($p<0,05$);

^f Diferença estatisticamente significativa da média da área ventral entre a 4ª US e a 1ª US, 2ª US, 3ª US e 5ª US, no grupo IV ($p<0,05$).

No quarto exame ultrassonográfico, os animais induzidos ao CP (III e IV) apresentaram a maior área dorsal prostática significativa ($p<0,05$), em relação ao grupo de controlo I. No entanto, duas semanas depois, foi registado um decréscimo significativo na área dorsal destes grupos ($p<0,05$), apresentando valores menores em relação ao grupo II. Nos exames apresentados na tabela 5, o grupo I apresentou sempre a menor média, sendo significativa ($p<0,05$) em comparação com os restantes grupos (Tabela 6).

Tabela 6. Média ($\pm$ DP) da área da próstata dorsal: área lobo direito + área lobo esquerdo. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.

Grupo		Avaliação ecográfica / Área próstata dorsal (cm ²)	
		Média $\pm$ Desvio padrão	
		4 ^a US (32S) Após a MNU	5 ^a US (35S) Após a MNU
I (N=8)	Controlo sedentário	0,280 $\pm$ 0,049 ^{a,c}	0,279 $\pm$ 0,075 ^b
II (N=10)	Controlo exercitado	-----	0,542 $\pm$ 0,233
III (N=10)	CP sedentário	1,152 $\pm$ 0,967 ^d	0,468 $\pm$ 0,182
IV (N=10)	CP exercitado	1,134 $\pm$ 0,681 ^e	0,493 $\pm$ 0,194

^a Diferença estatisticamente significativa da média da área dorsal entre o grupo I e os grupos III e IV, na 4^a US ($p < 0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa da média da área dorsal entre o grupo I e os grupos II, III e IV, na 5^a US ($p < 0,05$);

^c Diferença estatisticamente significativa da média da área dorsal entre a 4^a US e a 5^a US, no grupo I ($p < 0,05$);

^d Diferença estatisticamente significativa da média da área dorsal entre a 4^a US e a 5^a US, no grupo III ($p < 0,05$);

^e Diferença estatisticamente significativa da média da área dorsal entre a 4^a US e a 5^a US, no grupo IV ($p < 0,05$).

4.5.2. Quantificação da ecogenicidade no modo B

Na quantificação da IE na próstata ventral não se observou uma diferença considerável entre os grupos, nas semanas 12, 15 e 32 ($p > 0,05$). Só no terceiro e quinto exame ultrassonográfico foi registada uma diferença nos grupos, entre o grupo I com os grupos III e IV e entre o grupo I com os grupos II e IV, respetivamente ($p < 0,05$). Relativamente à variação da ecogenicidade no decorrer dos exames, registou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), nos grupos II e III, em que ocorreu um decréscimo considerável nos últimos exames (entre a 3^a US e 5^a US no grupo II e entre a 4^a US e 5^a US no grupo III). No grupo IV, registou-se uma variação de aumentos e diminuições ao longo dos exames, ocorrendo um acréscimo acentuado de ecogenicidade na 4^a US, seguido de um notório decréscimo ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Média ($\pm$ EP) da IE das ROIs, na próstata ventral. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.

		Avaliação ecográfica / Intensidade de eco na próstata ventral (pixels)				
		Média $\pm$ Erro Padrão				
Grupo		1ª US (12S) Antes da Flutamida	2ª US (15S) Antes da MNU	3ª US (21S) Após a MNU	4ª US (32S) Após a MNU	5ª US (35S) Após s MNU
I	Controlo sedentário	29,138 $\pm$ 3,537	32,515 $\pm$ 3,180	41,138 $\pm$ 5,419 ^a	48,195 $\pm$ 7,331	38,341 $\pm$ 7,933 ^b
II	Controlo exercitado	26,964 $\pm$ 3,544	34,272 $\pm$ 3,890	32,458 $\pm$ 2,895	-----	15,143 $\pm$ 3,031 ^c
III	CP sedentário	25,096 $\pm$ 3,017	38,912 $\pm$ 4,268	27,981 $\pm$ 2,080	40,154 $\pm$ 2,451 ^d	20,230 $\pm$ 4,248 ^e
IV	CP exercitado	29,634 $\pm$ 2,327	32,143 $\pm$ 2,669	24,907 $\pm$ 1,814	46,402 $\pm$ 4,882 ^f	10,496 $\pm$ 2,858 ^g

^a Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre o grupo I e os grupos III e IV, na 3ª US ($p < 0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre o grupo I e os grupos II e IV, na 5ª US ($p < 0,05$);

^c Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre a 5ª US e a 2ª US e 3ªUS, no grupo II ($p < 0,05$);

^d Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre a 4ª US e a 1ª US e 5ª US, no grupo III ($p < 0,05$);

^e Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre a 5ª US e a 2ª US, no grupo III ($p < 0,05$);

^f Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre a 4ª US e a 1ª US, 2ª US, 3ª US e 5ª US, no grupo IV ($p < 0,05$);

^g Diferença estatisticamente significativa da média da IE ventral entre a 5ª US e a 1ª US, 2ª US e 3ª US, no grupo IV ($p < 0,05$).

Na avaliação da média de IE na região dorsal da próstata dos animais em estudo, não se registou uma diferença estatisticamente considerável entre os grupos, nos dois exames em que foi avaliada ($p > 0,05$). No entanto, observou-se uma diminuição da ecogenicidade ($p < 0,05$) no grupo III e IV entre a 4ª US e 5ª US (Tabela 8).

Tabela 8. Média ($\pm$ EP) da IE das ROIs, na próstata dorsal. US – ultrassonografia e S – semanas de vida.

Grupo		Avaliação ecográfica / IE na próstata dorsal (pixels)	
		Média $\pm$ Erro padrão	
		4 ^a US (32S) Após o MNU	5 ^a US (35S) Após o MNU
I (N=8)	Controlo sedentário	72,460 $\pm$ 6,845	42,697 $\pm$ 10,104
II (N=10)	Controlo exercitado	-----	33,318 $\pm$ 2,706
III (N=10)	CP sedentário	56,793 $\pm$ 3,380 ^a	27,616 $\pm$ 3,675
IV (N=10)	CP exercitado	61,382 $\pm$ 4,517 ^b	23,737 $\pm$ 4,198

^a Diferença estatisticamente significativa da média IE dorsal entre a 4^a US e a 5^a US, no grupo III ($p < 0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa da média IE dorsal entre a 4^a US e a 5^a US, no grupo IV ($p < 0,05$).

4.5.3. Quantificação da ecogenicidade no modo Contraste

Na tabela 9 avaliou-se a existência de diferenças significativas na média da IE para duas ROIs (no interior e na periferia da próstata) em tempos diferentes (T0 e T1), para cada grupo. Não se registou qualquer tipo de diferença à exceção do grupo I, em que se registou uma diferença estatisticamente considerável entre o T0 e T1, no ROI que se localizava na periferia da glândula ($p < 0,05$).

Tabela 9. Média ($\pm$ EP) da IE nas duas ROIs selecionadas (um na periferia e outro no interior da glândula prostática).

		Avaliação ecográfica / IE no modo Contraste			
		Média $\pm$ Erro padrão			
Grupo		Interior da Próstata T0	Interior da Próstata T1	Periferia da Próstata T0	Periferia da Próstata T1
I (N=8)	Controlo sedentário	37,943 $\pm$ 6,487	40,647 $\pm$ 8,082	49,401 $\pm$ 8,975 ^a	60,573 $\pm$ 7,203
II (N=10)	Controlo exercitado	19,990 $\pm$ 1,550	20,644 $\pm$ 1,803	49,424 $\pm$ 2,775	52,416 $\pm$ 3,276
III (N=10)	CP sedentário	19,538 $\pm$ 2,416	19,738 $\pm$ 1,843	46,763 $\pm$ 6,437	52,504 $\pm$ 4,168
IV (N=10)	CP exercitado	20,849 $\pm$ 1,057	20,417 $\pm$ 1,057	43,378 $\pm$ 5,301	55,718 $\pm$ 5,272

^a Diferença estatisticamente significativa da média da IE na ROI que se encontra na periferia da próstata no T0 para o T1, no grupo I ($p < 0,05$).

4.6. Média da massa absoluta e relativa dos órgãos reprodutores

Na tabela 10 estão representadas as comparações das médias da massa absoluta e relativa dos órgãos reprodutores entre os grupos deste trabalho experimental, obtidas após a necrópsia. Registou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos não induzidos (I e II) em relação aos grupos com indução de CP (III e IV). Os grupos III e IV apresentaram uma maior massa na próstata e na vesícula seminal.

Tabela 10. Média ($\pm$ EP) da massa absoluta em gramas (g) e massa relativa (entre parênteses) dos órgãos reprodutores.

		Massa absoluta (g) e massa relativa dos órgãos		
		Média $\pm$ Erro padrão		
Grupo		Próstata	Testículo esquerdo	Testículo direito
I (N=8)	Controlo sedentário	1,016 $\pm$ 0,058 (0,002 $\pm$ 0,000) ^a	1,525 $\pm$ 0,177 (0,003 $\pm$ 0,000) ^{c,d}	1,773 $\pm$ 0,1540 (0,004 $\pm$ 0,000) ^g
II (N=10)	Controlo exercitado	1,138 $\pm$ 0,051 (0,003 $\pm$ 0,000) ^b	1,070 $\pm$ 0,087 (0,003 $\pm$ 0,000) ^{e,f}	1,152 $\pm$ 0,099 (0,003 $\pm$ 0,000) ^h
III (N=10)	CP sedentário	1,809 $\pm$ 0,039 (0,004 $\pm$ 0,000)	0,637 $\pm$ 0,017 (0,002 $\pm$ 0,000)	0,634 $\pm$ 0,019 (0,002 $\pm$ 0,000)

IV (N=10)	CP exercitado	1,681 ± 0,045 (0,005 ± 0,000)	0,6141 ± 0,017 (0,002 ± 0,000)	0,608 ± 0,021 (0,002 ± 0,000)
Grupo		Vesícula seminal	Glândula bulbouretral	
I (N=8)	Controlo sedentário	0,729 ± 0,037 (0,002 ± 0,000) ⁱ	0,963 ± 0,097 (0,002 ± 0,000)	
II (N=10)	Controlo exercitado	0,868 ± 0,048 (0,002 ± 0,000) ^j	1,202 ± 0,070 (0,003 ± 0,000)	
III (N=10)	CP sedentário	1,547 ± 0,121 (0,004 ± 0,000)	1,421 ± 0,188 (0,003 ± 0,001)	
IV (N=10)	CP exercitado	1,819 ± 0,187 (0,005 ± 0,000)	1,689 ± 0,042 (0,005 ± 0,000) ^{k,l}	

^a Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos III e IV, na massa absoluta e relativa da próstata ($p < 0,05$);

^b Diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e os grupos III e IV, na massa absoluta e relativa da próstata ($p < 0,05$);

^c Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos II, III e IV, na massa absoluta do testículo esquerdo ($p < 0,05$);

^d Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos III e IV, na massa relativa do testículo esquerdo ($p < 0,05$);

^e Diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e os grupos III e IV, na massa absoluta do testículo esquerdo ($p < 0,05$);

^f Diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e o grupo III, na massa relativa do testículo esquerdo ($p < 0,05$);

^g Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos II, III e IV, na massa absoluta e relativa do testículo direito ($p < 0,05$);

^h Diferença estatisticamente significativa entre o grupo II e os grupos III e IV, na massa absoluta e relativa do testículo direito ($p < 0,05$);

ⁱ Diferença estatisticamente significativa entre o grupo I e os grupos III e IV, na massa absoluta e relativa da vesícula seminal ($p < 0,05$);

^j Diferença estatisticamente significativa entre os grupos II e os grupos III e IV, na massa absoluta e relativa da vesícula seminal ($p < 0,05$);

^k Diferença estatisticamente significativa entre o grupo IV e os grupos I e II, na massa absoluta da glândula bulbouretral ($p < 0,05$);

^l Diferença estatisticamente significativa entre o grupo IV e os grupos I, II e III, na massa relativa da glândula bulbouretral ($p < 0,05$).

Página propositadamente deixada em branco

5. Discussão

O CP representa 27,6% de novos casos de cancro no homem e 10,7% das mortes provocadas por esta doença (Valkenburg e Williams, 2011). Estudos epidemiológicos sobre o processo de carcinogénese na próstata do homem revelaram ser difíceis de concretizar por várias razões, como a elevada idade na maioria dos doentes com CP, o elevado período de latência associado à doença e a complexidade da sua etiologia. Vários modelos animais foram desenvolvidos de forma a conseguir retratar, o mais próximo possível e de forma reprodutível, os processos envolvidos na carcinogénese prostática humana, sobretudo com roedores (Bosland, 1992).

Para este estudo, foi selecionado como animal de laboratório, o rato do sexo masculino da espécie *R. norvegicus*, da estirpe Wistar Unilever. A seleção deste animal como modelo e o procedimento envolvido na indução do CP (a seleção do agente carcinogénico e a concentração a administrar, a via de administração e a idade dos animais aquando da administração) foram definidos com base em trabalhos publicados anteriormente por Bosland (1996) e pela troca de informações entre o autor referido e pela orientadora desta dissertação. Este trabalho experimental é considerado um dos primeiros em que se avalia o efeito de exercício físico num modelo animal de CP em ratos do sexo masculino, sendo realizado ao longo do protocolo:

- uma monitorização ultrassonográfica, no modo B, sobre a estrutura e dimensão da próstata;
- uma análise objetiva da ecogenicidade numa ROI, para os lobos ventral e dorsal da glândula, permitindo avaliar as características dos tecidos;
- uma averiguação sobre a existência de neovascularização na próstata para duas ROIs, em tempo diferido, no modo Contraste.

A discussão revelou-se difícil, uma vez que existe pouca literatura que apresente uma metodologia semelhante à que foi aplicada neste trabalho.

No decurso do protocolo experimental, os animais foram observados diariamente de forma a verificar a possível existência de alterações na sua condição clínica e comportamental. O índice de perdas observado neste estudo, para o grupo I (índice de 20%, controlo e sedentário), resultou da morte prematura de um animal que não recuperou da anestesia necessária para a realização da TAC e, de outro animal que apresentou um tumor espontâneo

na região facial, precisamente na glândula de Zymbal (determinada após uma análise histológica). O índice de perdas registado no grupo IV (índice de 9,09%, CP e exercitado), resultou do sacrifício de um animal de forma a realizar um estudo prévio da sua anatomia e fisiologia. Como já foi referido anteriormente, estes animais foram retirados do estudo e não serão discutidos nesta dissertação.

No presente estudo, os resultados da análise histológica destes animais não se encontravam disponíveis à data de entrega deste trabalho, não podendo assim determinar a taxa de incidência de CP por grupo, o número de tumores por cada animal e o tipo de lesões que surgiram (pré-neoplásicas ou neoplásicas). Pollard e Luckert (1986) referiram que o tempo médio de latência tumoral é de 8 meses (~32 semanas após MNU) para ratos Wistar que foram submetidos a um tratamento de MNU e testosterona. Apesar das diferenças existentes no protocolo de indução de CP e na estirpe utilizada (*Lobund-Wistar*) nesta dissertação, é possível aferir que o método aplicado apresenta também um elevado período de latência, podendo de momento só existir lesões pré-neoplásicas. Narayanan *et al.* (2009), demonstraram uma incidência de 71,33% de neoplasias intraepiteliais prostáticas seguida por um aumento moderado do número de adenocarcinomas (61,7%) na próstata dorsal. Utilizaram o mesmo protocolo de indução de CP na estirpe utilizada no estudo atual, com a exceção do uso de 2 implantes de testosterona cristalina (3 cm de tubo, 40 mg/kg) e com uma duração de 52 semanas após a administração do MNU. Num trabalho publicado por Bosland (2014), com um protocolo de indução de CP semelhante (terminou 72 semanas após a administração do MNU, recorreu a uma administração continua de 21 dias, por *gavage*, de 50 mg/kg de acetato de ciproterona como anti-androgénio e 1 administração subcutânea, durante 3 dias, de 100 mg/kg de propionato de testosterona) ao protocolo experimental desta dissertação (reformulado pelo autor referido), provocou uma taxa de incidência de 57% nos animais que apenas receberam um implante de testosterona cristalina, produzindo adenocarcinomas que se localizavam predominantemente na região dorso-lateral (43%) das próstatas dos roedores (análoga à região periférica da próstata do homem). Adicionalmente, não houve registo de qualquer tipo de alteração nos níveis de concentração sérica de testosterona nestes animais. Neste momento ainda não temos os valores séricos de testosterona relativos ao nosso trabalho.

Em relação ao consumo de alimento, pode-se referir que a ingestão de comida aumentou ao longo do protocolo experimental, uma vez que os animais estavam em crescimento. Na última semana (semana 35), todos os grupos apresentaram valores semelhantes no consumo de

comida, não se evidenciando qualquer tipo de resposta influenciada por uma atividade física crónica ou pela doença. No consumo de água, registou-se também um aumento ao longo do ensaio, com a exceção do grupo I. Para o mesmo parâmetro observou-se, para a semana 35, uma diferença na média de consumo entre o grupo I (controlo, sedentário) e o grupo II (controlo, exercitado), sendo que o último referido apresenta o maior valor, que poderá ser justificada pela necessidade de uma maior ingestão hídrica provocada pela prática de exercício físico, como também a uma maior manipulação das gaiolas e consequentes perdas de água dos biberões desse grupo.

No que diz respeito à evolução da média das massas corporais dos grupos, pode-se concluir que os animais apresentaram um aumento da média da massa corporal no decorrer do protocolo experimental. O ganho ponderal (%GP) é uma medida que representa o aumento real da massa dos animais ao longo do estudo (Faustino-Rocha, 2012). Os grupos I e III exibiram um %GP superior e estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado com os grupos II e IV, respetivamente, que poderá ser explicado pelo efeito do exercício físico, que está associado à perda de massa corporal. A indução de CP não resultou em diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na %GP, entre os grupos induzidos (III e IV) e não induzidos (I e II), o mesmo não ocorreu em publicações anteriores em que foi utilizado o mesmo agente carcinogénico em ratos Wistar (Senthilkumar *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2012; Sharmila *et al.*, 2014).

Atualmente, a ultrassonografia revela-se como uma das principais técnicas para a monitorização da indução e do crescimento tumoral, em modelos animais (Körbel *et al.*, 2015). A determinação das dimensões da próstata, através da ultrassonografia, fornece uma informação precisa da cinética da resposta tumoral induzida, a qual é variável de organismo para organismo. As vias alternativas, como um sacrifício seriado ou a medição do tamanho dos tumores no final de um estudo, revelam-se ser menos precisas, informativas e requerem um maior número de animais, comprometendo o poder estatístico para estudos pré-clínicos (Singh *et al.*, 2015). Apesar das próstatas do roedor e do homem serem funcionalmente equivalentes, a primeira é de tamanho bastante reduzido ($\sim 25 \text{ mm}^3$), multilobular e intercalada com os órgãos geniturinários circundantes. Nos roedores, os lóbulos existem em pares (esquerdo e direito) e a forma de cada lobo é distinta entre si, devido às diferenças na morfogénese de ramificação para cada lobo em específico (Singh *et al.*, 2015; Aaron *et al.*, 2016). Todas estas características dificultam o cálculo do volume da próstata do roedor e não possibilitando a utilização de uma

única fórmula para a sua determinação, num único plano de imagem ultrassonográfica. Contudo, esta aplicação verificou-se possível na próstata do homem, apresentando uma correlação positiva com o volume real do órgão (Eri *et al.*, 2002; Mitterberger *et al.*, 2010).

Neste estudo, procurou-se um método simples, rápido e reproduzível para a determinação das alterações induzidas na próstata, ao longo do protocolo, pelo método de indução do CP usado e pelo efeito do exercício físico. Com base na visualização da forma geométrica dos lobos ventrais e dorsais (esquerdo e direito), obtidas num plano transversal na região mediana para cada lobo, propôs-se a aplicação da fórmula da área de uma elipse para estimar o espaço ocupado pela dimensão dos mesmos. Os exames ultrassonográficos foram realizados de forma seriada no protocolo experimental, possibilitando a visualização de regressões e expansões do tecido prostático provocadas por cada etapa do método de indução de CP e pelo efeito do exercício físico.

Entre o primeiro (antes da flutamida, 12S) e o segundo (antes da MNU, 15S) exame ultrassonográfico, ocorreu uma descida da área da próstata ventral nos grupos de animais induzidos (III e IV), não sendo esta regressão significativa ($p > 0,05$). Esta regressão é justificada pela atividade anti-androgénica da flutamida que inibe competitivamente a ligação dos androgénios aos seus recetores presentes nos órgãos reprodutores do animal. Estudos revelaram que este fármaco não inibiu os níveis circulatório de testosterona (Neri, 1989; Wirth *et al.*, 2007). Na terceira ultrassonografia (após a MNU, 21S) registou-se um aumento não significativo ($p > 0,05$) da dimensão ventral prostática nos grupos induzidos (III e IV), podendo ser o resultado de um estímulo da proliferação de células epiteliais prostáticas após uma sensibilização da próstata ao agente carcinogénico, descrito por McCormick (1998). Na quarta ultrassonografia (após a MNU, 32S) registou-se o pico da área ventral ($p < 0,05$) nos grupos III e IV. Este efeito está de acordo com os resultados obtidos por Gonçalves *et al.* (2010) na indução da carcinogénese prostática em gerbilos. Um dos grupos nesse estudo recebeu um tratamento de MNU e testosterona, e após 6 meses (~24 semanas) foi registado uma proliferação significativa das lesões prostáticas nos lobos ventrais. Estes autores associaram estes resultados a uma instabilidade de homeostasia das células epiteliais (maior atividade mitótica nestas células e decréscimo do volume ocupado pelo lúmen acinar) e a uma elevada inflamação prostática (desencadeada pelo aumento da resposta imunitária aos agentes carcinogénicos). No último exame ultrassonográfico registou-se uma diminuição na dimensão dos lobos ventrais e dorsais dos animais induzidos (III e IV) ($p < 0,05$), estes achados não se

encontraram descritos em outros trabalhos prévios e com base na metodologia aplicada não é possível descrever a origem desta diminuição.

O exercício físico não causou diferenças significativas ($p>0,05$) na dimensão do lobo ventral e dorsal entre os grupos não induzidos (I e II) e induzidos (III e IV), com a exceção do último exame ultrassonográfico (após o MNU, 35S) em que foi registado uma diferença considerável ($p<0,05$) entre o grupo I e o grupo II no lobo dorsal. Em oposição, Teixeira (2012) demonstrou que uma atividade física de resistência, em ratos *Wistar*, estava associado a uma rutura do equilíbrio entre a apoptose e a proliferação celular na próstata ventral do rato, sugerindo a presença de uma atrofia na glândula, promoveu uma maior concentração de corticosterona, dihidrotestosterona e testosterona. No entanto, registou uma menor expressão do recetor de androgénio e uma maior expressão dos recetores de estrogénio α e β (anti-proliferativa para o epitélio prostático), que no seu conjunto levou a uma menor atividade proliferativa das células prostáticas nos animais exercitados.

Ao nível da IE numa ROI da próstata, os valores de cada grupo apresentam uma tendência de subida e descida ao longo do protocolo. Por não haver muita literatura neste tópico, esta tendência poderá ser explicada devido ao método aplicado não ter em consideração que a ecogenicidade do tecido poderá ser influenciada pela atenuação dos ultrassons que por sua vez é causada pelos tecidos subcutâneos e pela profundidade (Moxon *et al.*, 2015), como também pela sua subjetividade. Em algumas situações foi registado uma diferença significativa ($p<0,05$) entre os animais saudáveis (I e II) e induzidos (III e IV), mas em geral houve um decréscimo na IE, na qual os grupos III e IV apresentam o menor valor. Evidencia-se assim uma alteração nas características no tecido pelo protocolo de indução de CP, cuja baixa ecogenicidade poderá ser explicada pela substituição de tecido glandular normal por um conjunto de células tumorais com menos interfaces refletivas (Ghai e Toi, 2012). Contudo, não foi possível verificar esta hipótese devido à ausência da análise histológica do órgão em questão.

O CP apresenta uma maior densidade de microvasos em comparação com o tecido prostático saudável, e esse aumento está fortemente correlacionada com o prognóstico e progressão do CP (Aigner *et al.*, 2010; Mitterberger *et al.*, 2010). O objetivo do modo contraste é averiguar a existência de um sinal mais pronunciado após a administração de um meio de contraste, para uma ROI no tecido prostático, sugerindo a presença de neovascularização. Com base nos resultados obtidos, não se observou uma diferença significativa ($p>0,05$) na IE após a administração do meio de contraste, para as duas ROIs selecionadas (um no interior da glândula,

outro na periferia), com a exceção do grupo I em que se registou uma diferença significativa ($p<0,05$) na ROI da periferia da glândula. Observou-se uma subida muito subtil da IE, nos grupos I, II e III, na ROI do interior da próstata, devido à passagem do agente de contraste. No grupo IV observou-se antes uma ligeira descida que poderá ser devido à subjetividade da metodologia. Em relação à ROI na periferia destacou-se uma maior subida da IE, em todos os grupos, em relação à ROI do interior da glândula, sugerindo a presença de uma maior vascularização nesta região. Com base na informação obtida não ocorreu neovascularização na glândula, em qualquer dos grupos, para o intervalo de tempo em que o protocolo de indução foi aplicado.

Analisando a massa relativa dos órgãos reprodutores, foram registadas diferenças estaticamente significativas entre os grupos experimentais. Os grupos não induzidos (I e II) apresentaram uma massa prostática inferior ($p<0,05$) em relação aos animais induzidos (III e IV). Este resultado está em concordância com o efeito da indução do CP, já descrito na literatura (Senthilkumar *et al.*, 2006; Sharmila *et al.*, 2014). Analogamente, o mesmo ocorreu na vesícula seminal e na glândula bulbouretral. Em oposição, os testículos dos animais dos grupos I e II apresentaram uma maior massa ($p<0,05$) em relação aos restantes. Todos estes resultados são justificados pelo protocolo usado.

6. Conclusão e perspectivas futuras

É possível concluir que a administração sequencial dos compostos químicos referidos para induzir CP em ratos machos Wistar Unilever, provoca alterações na glândula prostática, nomeadamente na sua dimensão, nas células constituintes e na massa relativa do órgão. A aplicação da ultrassonografia permitiu quantificar a dimensão dos lobos ventral e dorsal, permitindo determinar o crescimento ou a regressão do órgão após uma manipulação hormonal e após a administração da MNU, encontrando-se já descrita por outros investigadores. Através da visualização da IE no modo B foi possível observar uma diminuição da ecogenicidade no tecido prostático dos animais doentes, o que sugere a existência de lesões induzidas pelos compostos químicos e a proliferação de células alteradas no tecido prostático. No modo Contraste, não foi possível observar qualquer indício de neovascularização para o intervalo de tempo em que o protocolo de indução foi aplicado, sugerindo que este apresenta um elevado período de latência tumoral, presumindo somente a existência de lesões pré-neoplásicas. Não se registou qualquer efeito do exercício físico na glândula, através dos resultados obtidos.

A principal limitação desta dissertação foi a ausência da análise histológica, não sendo possível comparar e confirmar os resultados obtidos pela ultrassonografia, determinar a incidência de CP e averiguar o efeito de exercício físico nas lesões induzidas. Outros fatores como a subjetividade e outras limitações na aplicação da metodologia ultrassonográfica (referidos no capítulo anterior) poderão afetar os resultados obtidos. Uma reformulação dos métodos aplicados para trabalhos futuros, como uma análise com um maior número de ROIs atribuídos de forma automática por um *software* próprio e a consideração da influência da atenuação dos ultrassons, são necessários para ultrapassar a dependência do operador na aplicação da metodologia. A aplicação de uma técnica de ultrassonografia de alta frequência para reconstrução de imagens em duas dimensões para uma estrutura de três dimensões poderá ser um objetivo em trabalhos futuros para a determinação do volume da glândula, permitindo determinar o volume mais próximo ao volume real da próstata, sendo já descrita por um investigador, em gerbilos.

Em suma, este estudo revela a importância da ultrassonografia na caracterização da próstata e das lesões induzidas pela manipulação hormonal e pela administração de um agente carcinogénico, sendo uma excelente ferramenta para a monitorização da doença na área de investigação animal.

Página propositadamente deixada em branco

7. Referências bibliográficas

- Aaron, L., Franco, O. E., e Hayward, S. W. (2016) Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288.
- Adjakly, M., Ngollo, M., Dagdemir, A., Judes, G., Pajon, A., Karsli-Ceppiloglu, S., Penault-Llorca, F., Boiteux, J.-P., Bignon, Y.-J., Guy, L., e Bernard-Gallon, D. (2015) Prostate cancer: The main risk and protective factors – Epigenetic modifications. *Annales d'Endocrinologie*, 76(1), 25–41.
- Aigner, F., Mitterberger, M., Rehder, P., Pallwein, L., Junker, D., Horninger, W., e Frauscher, F. (2010) Status of Transrectal Ultrasound Imaging of the Prostate. *Journal of Endourology*, 24(5), 685–691.
- Baba, A. I., e Câtoi, C. (2007) *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest.
- Bocchetta, M., e Carbone, M. (2004) Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation. *Oncogene*, 23(38), 6484–6491.
- Bokor, D. (2000) Diagnostic efficacy of sonoVue. *The American Journal of Cardiology*, 86(4), 19–24.
- Bosland, M. C. (1992) Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 16H, 89–98.
- Bosland, M. C. (1996) Chemical and hormonal induction of prostate cancer in animal models. *Urologic oncology*, 2(4), 103–10.
- Bosland, M. C. (2014) Testosterone Treatment Is a Potent Tumor Promoter for the Rat Prostate. *Endocrinology*, 155(12), 4629–4633.
- Boyle, P., e Levin, B. (2008) *World Cancer report 2008. Cancer Control*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon.
- Bruce, R. A. (1971) Exercise testing of patients with coronary heart disease. Principles and normal standards for evaluation. *Annals of clinical research*, 3(6), 323–32.
- Cooper, G. M. (1992) *Elements of Human Cancer*. (illustrated.). Jones and Bartlett Learning.
- Corona, G., Baldi, E., e Maggi, M. (2011) Androgen regulation of prostate cancer : Where are we now ? *Journal of Endocrinological Investigation*, 34, 232–243.
- Davidson, M. K., Lindsey, J. R., e Davis, J. K. (1987) Requirements and selection of an animal model. *Israel journal of medical sciences*, 23(6), 551–5.
- Dwinell, M. R. (2010) Online tools for understanding rat physiology. *Briefings in Bioinformatics*, 11(4), 431–439.
- Eri, L. M., Thomassen, H., Brennhovd, B., e Håheim, L. L. (2002) Accuracy and repeatability of prostate volume measurements by transrectal ultrasound. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 5(4), 273–278.

- Faustino-Rocha, A. I. (2012) *Avaliação ultrassonográfica dos tumores da mama induzidos quimicamente em ratos fêmea Sprague-Dawley*. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária Ciências Veterinárias - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 65 pp.
- Ferrís-i-Tortajada, J., García-i-Castell, J., Berbel-Tornero, O., e Ortega-García, J. A. (2011) Constitutional risk factors in prostate cancer. *Actas urológicas españolas*, 35(5), 282–8.
- Ghai, S., e Toi, A. (2012) Role of Transrectal Ultrasonography in Prostate Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 50(6), 1061–1073.
- Giri, V. N., e Beebe-Dimmer, J. L. (2016) Familial prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 43(5), 560–565.
- Gonçalves, B. F., de Campos, S. G. P., Zanetoni, C., Scarano, W. R., Falleiros, L. R., Amorim, R. L., Góes, R. M., e Taboga, S. R. (2013) A New Proposed Rodent Model of Chemically Induced Prostate Carcinogenesis: Distinct Time-Course Prostate Cancer Progression in the Dorsolateral and Ventral Lobes. *The Prostate*, 73(11), 1202–1213.
- Gonçalves, B. F., Zanetoni, C., Scarano, W. R., Góes, R. M., Vilamaior, P. S. L., Taboga, S. R., e Campos, S. G. P. (2010) Prostate carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea (mnu) in gerbils: Histopathological diagnosis and potential invasiveness mediated by extracellular matrix components. *Experimental and Molecular Pathology*, 88(1), 96–106.
- Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R., Haskell, W., e Ekelund, U. (2012) Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *The Lancet*, 380(9838), 247–257.
- Hanahan, D., e Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Harvey, C. J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U., e Frauscher, F. (2012) Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*, 85(special_issue_1), S3–S17.
- Hassanipour-Azgomi, S., Mohammadian-Hafshejani, A., Ghoncheh, M., Towhidi, F., Jamehshorani, S., e Salehiniya, H. (2016) Incidence and mortality of prostate cancer and their relationship with the Human Development Index worldwide. *Prostate International*, 4(3), 118–124.
- Huang, H., Zhu, Z.-Q., Zhou, Z.-G., Chen, L.-S., Zhao, M., Zhang, Y., Li, H.-B., e Yin, L.-P. (2016) Contrast-enhanced transrectal ultrasound for prediction of prostate cancer aggressiveness: The role of normal peripheral zone time-intensity curves. *Scientific Reports*, 6(1), 38643.
- Jones, L. W., Antonelli, J., Masko, E. M., Broadwater, G., Lascola, C. D., Fels, D., Dewhirst, M. W., Dyck, J. R. B., Nagendran, J., Flores, C. T., Betof, A. S., Nelson, E. R., Pollak, M., Dash, R. C., Young, M. E., e Freedland, S. J. (2012) Exercise modulation of the host-tumor interaction in an orthotopic model of murine prostate cancer. *Journal of Applied Physiology*, 113(2), 263–272.
- Jung, A. J., e Westphalen, A. C. (2012) Imaging Prostate Cancer. *Radiologic Clinics of North America*, 50(6), 1043–1059.
- Kempná, P., Marti, N., Udhane, S., e Flück, C. E. (2015) Regulation of androgen biosynthesis

- A short review and preliminary results from the hyperandrogenic starvation NCI-H295R cell model. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 408, 124–132.
- Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., e Koul, H. K. (2009) Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters*, 282(2), 125–136.
- Kheirandish, P., e Chinegwundoh, F. (2011) Ethnic differences in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 105(4), 481–485.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., e Xu, Y. (2000) Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology*, 19(10), 543–555.
- Körbel, C., Jung, V., Kamradt, J., Stöckle, M., Unteregger, G., Menger, M. D., e Saar, M. (2015) High-Resolution Ultrasound Allows Percutaneous Initiation and Surveillance of Prostate Cancer in an Orthotopic Murine Model. *Urologia Internationalis*, 94(3), 347–353.
- Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Gansler, T. S., Holland, J. F., e Frei, E. (2003) *Holland-Frei Cancer Medicine*. (6th ed). BC Decker, Hamilton (ON).
- Kumar, D. G., Deepa, P., Rathi, M. A., Meenakshi, P., e Gopalakrishnan, V. K. (2012) Protective effect of Crataeva nurvala bark against MNU and testosterone induced oxidative stress in liver of male albino rats. *Biomedicine & Aging Pathology*, 2(3), 94–98.
- Kumar, V., Aster, J. C., e Abbas, A. (2013) *Robbins Patologia Básica* (9th ed). Elsevier.
- Kundavaram, C. R., Halpern, E. J., e Trabulsi, E. J. (2012) Value of contrast-enhanced ultrasonography in prostate cancer. *Current Opinion in Urology*, 22(4), 303–309.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., e Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–9.
- Liu, Y., Hu, F., Li, D., Wang, F., Zhu, L., Chen, W., Ge, J., An, R., e Zhao, Y. (2011) Does Physical Activity Reduce the Risk of Prostate Cancer? A Systematic Review and Meta-analysis. *European Urology*, 60(5), 1029–1044.
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., Song, S., Jiang, Y., Xia, Q., Swinnen, J. V., Bormans, G., Himmelreich, U., Oyen, R., e Ni, Y. (2015) Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 5(5), 708–29.
- Markozannes, G., Tzoulaki, I., Karli, D., Evangelou, E., Ntzani, E., Gunter, M. J., Norat, T., Ioannidis, J. P., e Tsilidis, K. K. (2016) Diet, body size, physical activity and risk of prostate cancer: An umbrella review of the evidence. *European Journal of Cancer*, 69, 61–69.
- Mattoon, J. S., e Nyland, T. G. (2015a) Prostate and Testes. *Small Animal Diagnostic Ultrasound* (3rd ed, p. 608–633). Elsevier.
- Mattoon, J. S., e Nyland, T. G. (2015b) Fundamentals of Diagnostic Ultrasound. *Small Animal Diagnostic Ultrasound* (3rd ed, p. 1–49). Elsevier.
- Mccormick, D. L., Rao, K. V. N., Dooley, L., Steele, V. E., Lubet, R. A., Kelloff, G. J., e Bosland, M. C. (1998) Influence of N-Methyl-N-Nitrosourea, testosterone, and N-(4-Hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide on Prostate Cancer Induction in Wistar-Unilever

- Rats¹. *Cancer Research*, 58(15), 3282–3288.
- Mitterberger, M., Horninger, W., Aigner, F., Pinggera, G. M., Steppan, I., Rehder, P., e Frauscher, F. (2010) Ultrasound of the prostate. *Cancer Imaging*, 10(1), 30–48.
- Mitterberger, M., Pelzer, A., Colleselli, D., Bartsch, G., Strasser, H., Pallwein, L., Aigner, F., Gradl, J., e Frauscher, F. (2007) Contrast-enhanced ultrasound for diagnosis of prostate cancer and kidney lesions. *European Journal of Radiology*, 64(2), 231–238.
- Moxon, R., Bright, L., Pritchard, B., Bowen, I. M., Souza, M. B. de, Silva, L. D. M. da, e England, G. C. W. (2015) Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. *Animal Reproduction Science*, 160, 112–119.
- Narayanan, N. K., Nargi, D., Horton, L., Reddy, B. S., Bosland, M. C., e Narayanan, B. A. (2009) Inflammatory processes of prostate tissue microenvironment drive rat prostate carcinogenesis: Preventive effects of celecoxib. *Prostate*, 69(2), 133–141.
- Neri, R. (1989) Pharmacology and pharmacokinetics of flutamide. *Urology*, 34(4 Suppl), 19–21-56.
- Oliveira, D. S. M., Dzinic, S., Bonfil, A. I., Saliganan, A. D., Sheng, S., e Bonfil, R. D. (2016) The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), 8–13.
- Pallwein, L., Mitterberger, M., Gradl, J., Aigner, F., Horninger, W., Strasser, H., Bartsch, G., Nedden, D. zur, e Frauscher, F. (2007) Value of contrast-enhanced ultrasound and elastography in imaging of prostate cancer. *Current Opinion in Urology*, 17(1), 39–47.
- Park, S. Bin, Kim, J. K., Choi, S. H., Noh, H. N., Ji, E. K., e Cho, K. S. (2000) Prostate Volume Measurement by TRUS Using Heights Obtained by Transaxial and Midsagittal Scanning: Comparison with Specimen Volume Following Radical Prostatectomy. *Korean Journal of Radiology*, 1(2), 110.
- Parkin, D. M. (2001) Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet Oncology*, 2(9), 533–543.
- Pedersen, L., Christensen, J. F., e Hojman, P. (2015) Effects of Exercise on Tumor Physiology and Metabolism. *The Cancer Journal*, 21(2), 111–116.
- Plew, J., Sanki, J., Young, N., Gruenewald, S., Dwyer, R., e Brancatisano, R. (2000) Early experience in the use of Levovist ultrasound contrast in the evaluation of liver masses. *Australasian Radiology*, 44(1), 28–31.
- Pollard, M., e Luckert, P. H. (1986) Production of Autochthonous Prostate Cancer in Lobund-Wistar Rats by Treatments with N-Nitroso-N-methylurea and Testosterone. *Journal of the National Cancer Institute*, 77(2), 583–587.
- Pollard, R., Nyland, T. G., Berry, C. R., e Mattoon, J. S. (2015) Advanced Ultrasound Techniques. *Small Animal Diagnostic Ultrasound* (3rd ed, p. 78–93). Elsevier.
- Qin, X., Liu, M., e Wang, X. (2016) New insights into the androgen biotransformation in prostate cancer: A regulatory network among androgen, androgen receptors and UGTs. *Pharmacological Research*, 106, 114–122.
- Rebbeck, T. R. (2017) Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography.

Seminars in Radiation Oncology, 27(1), 3–10.

- Reis, V. M. S. (2013) *Resposta biológica à implantação subcutânea de nanopartículas de hidroxiapatite em ratos diabéticos*. Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial -Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 66 pp.
- Ruiz-Casado, A., Martín-Ruiz, A., Pérez, L. M., Provencio, M., Fiuza-Luces, C., e Lucia, A. (2017) Exercise and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer*, 3(6), 423–441.
- Senthilkumar, K., Arunkumar, A., Sridevi, N., Vijayababu, M. R., Kanagaraj, P., Venkataraman, P., Aruldas, M. M., Srinivasan, N., e Arunakaran, J. (2006) Chemoprevention of MNU and Testosterone induced prostate carcinogenesis by Calcitriol (vitamin D3) in adult male albino Wistar rats. *Annals of Cancer Research and Therapy*, 14(1), 12–18.
- Sharmila, G., Athirai, T., Kiruthiga, B., Senthilkumar, K., Elumalai, P., Arunkumar, R., e Arunakaran, J. (2014) Chemopreventive Effect of Quercetin in MNU and Testosterone Induced Prostate Cancer of Sprague-Dawley Rats. *Nutrition and Cancer*, 66(1), 38–46.
- Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., e Imaida, K. (2000) Experimental prostate carcinogenesis — rodent models. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(2–3), 219–226.
- Singh, S., Pan, C., Wood, R., Yeh, C.-R., Yeh, S., Sha, K., Krolewski, J. J., e Nastiuk, K. L. (2015) Quantitative volumetric imaging of normal, neoplastic and hyperplastic mouse prostate using ultrasound. *BMC Urology*, 15(1), 97.
- Talab, S. S., Preston, M. A., Elmi, A., e Tabatabaei, S. (2012) Prostate Cancer Imaging. *Radiologic Clinics of North America*, 50(6), 1015–1041.
- Tamburrino, L., Salvianti, F., Marchiani, S., Pinzani, P., Nesi, G., Serni, S., Forti, G., e Baldi, E. (2012) Androgen receptor (AR) expression in prostate cancer and progression of the tumor : Lessons from cell lines, animal models and human specimens. *Steroids*, 77(10), 996–1001.
- Teixeira, G. R., Fávaro, W. J., Pinheiro, P. F. F., Chuffa, L. G. A., Amorim, J. P. A., Mendes, L. O., Fioruci, B. A., Oba, E., Martins, O. A., Martinez, M., e Martinez, F. E. (2012) Physical exercise on the rat ventral prostate: Steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 22(5), e86–e92.
- Troisi, A., Orlandi, R., Bargellini, P., Menchetti, L., Borges, P., Zelli, R., e Polisca, A. (2015) Contrast-enhanced ultrasonographic characteristics of the diseased canine prostate gland. *Theriogenology*, 84(8), 1423–1430.
- Tyloch, J. F., e Wieczorek, A. P. (2017) The standards of an ultrasound examination of the prostate gland. Part 2. *Journal of Ultrasonography*, 17(68), 43–58.
- Valkenburg, K. C., e Williams, B. O. (2011) Mouse Models of Prostate Cancer. *Prostate Cancer*, 2011, 1–22.
- Verma, V. K., Singh, V., Singh, M. P., e Singh, S. M. (2009) Effect of physical exercise on tumor growth regulating factors of tumor microenvironment: Implications in exercise-dependent tumor growth retardation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(2), 274–282.

- Warburton, D. E. R. (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *Canadian Medical Association Journal*, 174(6), 801–809.
- WHO. (2010) *Global recommendations on physical activity for health*. World Health Organization. Geneva.
- WHO. (2012a) Cancer Fact Sheets: Prostate cancer. Acedido em: 25 de junho de 2017, em: <https://gco.iarc.fr/today/data/pdf/fact-sheets/cancers/cancer-fact-sheets-19.pdf>
- WHO. (2012b) Population Fact Sheets: Portugal - Estimated Incident, Mortality and 5 year Prevalence: Males. Acedido em: 25 de junho de 2017, em: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations?population=620&sex=1#collapse1>
- Wild, C. P., e Kleihues, P. (1996) Etiology of cancer in humans and animals. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 48(2–3), 95–100.
- Wirth, M. P., Hakenberg, O. W., e Froehner, M. (2007) Antiandrogens in the Treatment of Prostate Cancer. *European Urology*, 51(2), 306–314.
- Yang, B., e Wang, J. (2017) Effects of Exercise on Cancer-related Fatigue and Quality of Life in Prostate Cancer Patients Undergoing Androgen Deprivation Therapy: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Chinese Medical Sciences Journal*, 32(1), 13–21.
- Yuspa, S. H., e Poirier, M. C. (1988) Chemical Carcinogenesis: From Animal Models To Molecular Models In One Decade. *Advances in Cancer Research* (Vol. 50, p. 25–70).

Anexos

Página propositadamente deixada em branco

Anexo A – Protocolo de exercício

Anexo A. Protocolo de exercício. O protocolo de exercício teve início na oitava semana de vida, terminando na trigésima quinta semana de vida, dois dias antes do sacrifício dos animais em estudo. Os animais estavam distribuídos por gaiolas, sendo que cada uma contém 5 animais. Gaiola 1 e 2 – grupo II, controlo exercitados; gaiola 3, 4 e 5R1 (este animal fazia parte de outra gaiola de CP exercitado que não entrou neste estudo) – grupo IV, CP exercitados (G – gaiola; Rn – identificação do animal pelo corte de orelha).

Protocolo de exercício										
Semana	1ª de exercício					2ª de exercício				
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Tempo (min)	----	20	30	40	40	40	40	50	50	50
Velocidade (m/min)	----	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Semana	3ª de exercício					4ª de exercício				
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Tempo (min)	50	50	60	60	60	60	60	60	60	60
Velocidade (m/min)	18	18	18	18	18	20	20	20	20	20
Semana	5ª de exercício					6ª de exercício				
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Tempo (min)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Velocidade (m/min)	23	23	23	23	23	25	25	25	25	25
Semana	7ª de exercício					8ª, 9ª, 10ª, 11ª e 12ª de exercício				
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
Tempo (min)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Velocidade (m/min)	28	28	28	28	28	30	30	30	30	30

Semana	13ª de exercício					14ª de exercício					
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	
Tempo (min)	60	60	60	60	1º teste de esforço	60	60	60	60	60	
Velocidade (m/min)	30	30	30	30		30	30	30	30	30	
Semana	15ª de exercício					16ª de exercício					
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	
Tempo (min)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
Velocidade (m/min)	32	32	32	32	32	34	34	34	34	34	
Semana	17ª de exercício					18ª, 19ª de exercício					
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	
Tempo (min)	60	60	60	60	60	0 – 30 min a 30 m/min					
Velocidade (m/min)						30 – 45 min a 32 m/min					
	36	36	36	36	36	45 – 60 min a 34 m/min					
Semana	20ª de exercício					21ª, 22ª e 23ª de exercício					
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	
Tempo (min) e velocidade (m/min)	2º teste de esforço	G1 – 36 m/min, G1R3 – 26 m/min				G1 – 36 m/min, G1R3 – 26 m/min					
		G2 – 32 m/min, G3 – 34 m/min				G2 – 32 m/min, G3 – 34 m/min					
		G4 – 35 m/min, G5R1 – 32 m/min				G4 – 35 m/min, G5R1 – 32 m/min					
		60 min				60 min					
Semana	24ª e 25ª de exercício					26ª de exercício					
Dia	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	
Tempo (min) e velocidade (m/min)	G1 – 36 m/min, G1R3 – 26 m/min, G2 – 32 m/min					3º teste de esforço	G1 – 30 m/min, G1R3 20m/min				
	60 min						G2 – 26 m/min, G3 – 28 m/min				
	G3, G4, G1R4, G2R5, G5R1						G4 – 39 m/min, G5R1 – 26 m/min				
	0 – 15 min a 20m/min, 15 - 30 min a 25 m/min						30 min				
	30 - 45 min a 30 m/min, 45 - 60 min a 25 m/min										

Semana	27 ^a de exercício					28 ^a de exercício		
Dia	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Tempo (min) e velocidade (m/min)	G1 – 30 m/min, G1R3 20m/min G2 – 26 m/min, G3 – 28 m/min G4 – 39 m/min, G5R1 – 26 m/min 30 min					G1 – 30 m/min, G1R3 20m/min G2 – 26 m/min, G3 – 28 m/min G4 – 39 m/min, G5R1 – 26 m/min 30 min		