

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

*Caquexia muscular associada ao desenvolvimento de cancro
da bexiga em ratos machos Wistar*

Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR:

Andreia Patrícia Teixeira Andrade

SOB ORIENTAÇÃO DE:

Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira;

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira;



Vila Real, 2014

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

*Caquexia muscular associada ao desenvolvimento de cancro
da bexiga em ratos machos Wistar*

Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR:

Andreia Patrícia Teixeira Andrade

Orientadora:

-Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira -

Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Co-orientadora:

-Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira -

Departamento de Química, Aveiro

Composição do Júri:

**As doutrinas apresentadas são da exclusiva
responsabilidade da autora.**

Agradecimentos

Não poderia terminar a presente dissertação de mestrado sem prestar reconhecimento a todas as pessoas e instituições que me ensinaram, ajudaram e acompanharam ao longo da realização deste trabalho. Apesar de serem muitas apenas aqui citarei algumas, desde já, os meus cumprimentos:

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do seu Magnífico Reitor, Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, manifesto o meu reconhecimento por toda a disponibilidade e facilidades concebidas durante a realização desta dissertação de mestrado;

À Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, na pessoa do seu Presidente Professor Luís Herculano Melo de Carvalho e à Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, na pessoa do seu Presidente Vicente Seixas e Sousa, pelas facilidades concebidas na realização deste trabalho;

À Professora Doutora Paula Alexandra Martins de Oliveira, orientadora da presente dissertação. Por todo o apoio prestado, disponibilidade, dedicação, pela leitura crítica da presente dissertação e interpretação dos resultados. Não posso também deixar de referir a transmissão de conhecimento, o entusiasmo, o incentivo e a amizade, que foram muito importantes;

À Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, co-orientadora da presente dissertação por todo o apoio prestado, incentivo, motivação e entusiasmo;

À Professora Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio e Ana Margarida de Oliveira M. G. Calado, diretora e vice-diretora, respetivamente, do Mestrado de Biologia Clínica e Laboratorial, por todo o apoio prestado no decorrer deste segundo ciclo;

A todos os professores que ao longo do curso transmitiram os seus conhecimentos;

À Ana, à Catarina, à Daniela, por toda a ajuda e colaboração ao longo de todo este trabalho e pelos conselhos;

Ao Miguel por toda a compreensão, incentivo e carinho dados nos momentos mais difíceis do percurso acadêmico;

À minha avó Teresa por contar juntamente comigo todos os anos, meses, semanas, que faltavam para concluir cada etapa acadêmica;

Aos meus pais, Ana e Fernando, e ao meu irmão, Bruno, aqui vai um obrigado muito especial por toda a luta e apoio para que tudo isto fosse possível;

A toda a minha família e amigos que sempre me apoiaram neste caminho, nem sempre fácil.

Muito obrigada...

Apoio financeiro da FCT ao projeto PDTC/DES/114122/2009, financiado no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE) e Comparticipado pelo Fundo Comunitário Europeu (FEDER; FCOMP-01-0124-FEDER-014707).



Resumo

A caquexia muscular associada ao cancro é uma condição paraneoplásica preocupante.

Caquexia, etimologicamente significa “mau estado”, é uma síndrome complexa e multifatorial, que se caracteriza pela perda de tecido adiposo e posterior consumo do músculo-esquelético. Sendo o cancro, só por si, uma doença muito grave, quando associado à caquexia a situação complica-se porque a piorar o estado geral dos doentes.

Apesar dos mecanismos subjacentes à caquexia ainda não estarem completamente esclarecidos, julga-se que esta síndrome paraneoplásica está associada a alterações metabólicas, imunológicas e inflamatórias. No presente trabalho, pretendemos avaliar as alterações de parâmetros bioquímicos no soro potencialmente sugestivos de caquexia e relacionar com alterações de massa corporal, massa muscular e características histológicas do tumor, utilizando um modelo de cancerização urotelial pela administração oral da N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina (BBN), a ratos machos da estirpe Wistar. Neste sentido, constituíram-se dois grupos experimentais: grupo BBN: (animais expostos à BBN durante 20 semanas) e grupo controlo. No final do protocolo animal, os animais foram anestesiados e procedeu-se à sua necropsia. Nas amostras de soro obtidas, a partir do sangue colhido no momento do sacrifício, foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatina cinase, fosfatase alcalina, albumina, proteína total, colesterol, triglicéridos e glucose. Paralelamente, procedeu-se à avaliação das lesões uroteliais em seções de tumor coradas com hematoxilina-eosina.

No grupo BBN, 50% dos animais apresentaram uma perda de massa corporal superior a 5%. Destes, 50% apresentaram perda de massa do músculo *gastrocnemius* superior a 5%. Relativamente à percentagem das lesões uroteliais, no grupo BBN identificaram-se 83,3% de hiperplasia simples, 50% de hiperplasia nodular, 8,3% de hiperplasia papilar, 50% de papiloma, 41,7% de tumor papilar de baixo potencial maligno, 91,7% de carcinoma papilar de baixo grau, 66,7% de carcinoma papilar de alto grau, 8,3% de carcinoma invasor e 50% de metaplasia epidermoide com queratinização. No grupo controlo não se identificou quaisquer alterações histológicas. O estado de caquexia dos animais expostos à BBN foi corroborado pela diminuição dos níveis séricos da albumina, da proteína total, da atividade da CK, da ALT, da ALP e da AST. Os resultados sugerem que os animais com tumores da bexiga são suscetíveis ao desenvolvimento de caquexia devida à perda de massa muscular o que, nos estádios iniciais se traduz bioquimicamente na alteração de parâmetros séricos.

Palavras chave: Carcinogênese química, lesões uroteliais, massa corporal, músculo esquelético.

Abstract

Cancer-related muscle wasting associated is a paraneoplastic condition that worsens disease prognosis and clinical outcomes.

Cachexia, etymologically means "bad state", is a complex and multifactorial syndrome characterized by the loss of fat tissue and skeletal muscle. Although the mechanisms underlying cachexia still not completely understood, it is believed that this cancer cachexia is associated with metabolic, immunological and inflammatory alterations.

In this work, we intend to evaluate the changes in serum biochemical parameters potentially suggestive of cachexia and correlate with changes in body weight, muscle mass and histological features of the tumor, using a model of urothelial cancerization by oral administration of N - butyl- N - (4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in male rats of the Wistar strain. In this study, two experimental groups were formed: BBN (animals exposed to BBN for 20 weeks) and control groups. At the end of the protocol, the animals were anesthetized and proceeded to their necropsy. Serum samples obtained from the blood collected at the time of sacrifice were used for the assay of the following biochemical parameters: alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine kinase, alkaline phosphatase, albumin, total protein, cholesterol, triglycerides and glucose. In parallel, we proceeded to the evaluation of urothelial lesions in tumor sections stained with hematoxylin-eosin. In the BBN group, 50% of the animals showed a loss of body mass over 5%. Of these, 50% presented more than 5% of *gastrocnemius* mass loss. Regarding the percentage of urothelial lesions in the BBN group we identified 83.3 % of simple hyperplasia, 50 % of nodular hyperplasia, 8.3% of papillary hyperplasia, papilloma 50 %, 41.7 % of papillary tumor of low potential malignant, 91.7 % of low-grade papillary carcinoma, 66.7 % of high-grade papillary carcinoma, carcinoma of 8.3% and 50 % of squamous metaplasia with keratinization . In the control group, no histological changes were identified. The decrease in serum albumin, total protein and in the activity of CK, ALT, ALP and AST observed in BBN animals seem to corroborate cachexia. The results suggest that animals with bladder tumors are susceptible to the development of cancer cachexia reflected in changes of biochemical serum parameters in disease initial stages.

Keywords: chemical carcinogenesis, urothelial lesions, body weight, skeletal muscle

Índice Geral

| | |
|--|-----------|
| 1. Revisão Bibliográfica..... | 1 |
| 1.1. Caquexia associada ao cancro..... | 1 |
| 1.2. Etiologia da caquexia..... | 2 |
| 1.3. Classificação da caquexia | 2 |
| 1.4. Fisiopatologia da caquexia associada ao cancro | 2 |
| 1.5. Alterações metabólicas e inflamatórias subjacentes à caquexia associada ao cancro..... | 3 |
| 2. Cancro da Bexiga..... | 4 |
| 2.1. Classificação dos tumores da bexiga | 4 |
| 2.2. Modelo animal de cancro da bexiga | 5 |
| 2.3. Indução experimental de tumores da bexiga..... | 5 |
| 3. Objetivos..... | 7 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 7 |
| 4.1. Considerações | 7 |
| 4.2. Animais..... | 7 |
| 4.3. Condições experimentais | 7 |
| 4.4. Marcação, determinação da massa corporal e ganho ponderal..... | 8 |
| 4.5. Grupos experimentais | 8 |
| 4.6. Indução experimental de tumores da bexiga..... | 8 |
| 4.7. Colheita de urina e sangue | 9 |
| 4.8. Sacrifício dos animais | 10 |
| 4.9. Análises séricas..... | 10 |
| 4.10. Análise histológica das bexigas | 11 |
| 4.11. Análise estatística | 11 |
| 5. Resultados..... | 11 |
| 5.1. Comportamento dos animais e primeiros sinais clínicos..... | 11 |
| 5.2. Massa corporal dos animais | 12 |
| 5.3. Avaliação do consumo de água e de ração | 13 |
| 5.4. Evolução do número de ratos com hematúria..... | 14 |
| 5.5. Massas e massas relativas dos órgãos dos animais | 14 |
| 5.6. Percentagem das lesões uroteliais identificadas entre os dois grupos experimentais..... | 15 |
| 5.7. Análise do hematócrito | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 5.8. Análise dos parâmetros bioquímicos determinados no soro..... | 17 |
| 6. Discussão..... | 18 |
| 7. Conclusão..... | 22 |
| 8. Referências Bibliográficas..... | 23 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Vias de evolução das lesões uroteliais papilares e invasoras | 5 |
| Figura 2: Identificação dos animais | 8 |
| Figura 3: Preparação da solução de BBN | 9 |
| Figura 4a: Método de colheita de urina – metabólica | 9 |
| Figura 4b: Método de colheita de sangue | 9 |
| Figura 5: Protocolo experimental | 10 |
| Figura 6a: Bexigas dos ratos do grupo controle | 15 |
| Figura 6b: Lesões uroteliais das bexigas dos ratos do grupo BBN | 16 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Média da massa corporal dos animais | 12 |
| Tabela 2: Comparação da massa corporal dos animais do grupo BBN com a média da massa corporal do grupo controle | 13 |
| Tabela 3: Média da massa dos consumos de água e ração | 13 |
| Tabela 4: Evolução do número de ratos com hematúria | 14 |
| Tabela 5: Média das massas (g) e massas relativas dos órgãos dos animais | 14 |
| Tabela 6: Comparação da massa muscular dos animais do grupo BBN, que perderam mais de 5% de massa corporal, com a média da massa muscular do grupo controle | 15 |
| Tabela 7: Percentagem das lesões uroteliais identificadas entre os dois grupos experimentais | 16 |
| Tabela 8: Média dos valores do hematócrito | 17 |
| Tabela 9: Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos | 17 |
| Tabela 10: Valores de CRP e IL-6 determinadas no soro (apresentadas como média ± desvio padrão | 18 |

Abreviaturas e siglas

IMC – índice de massa corporal;

TNF α – fator de necrose tumoral;

IL-1 – interleucina 1;

IL-6 – interleucina 6;

CRP – proteína C-reativa;

BBN – *N-butyl-N*-(4-hidroxibutil) nitrosamina;

BCPN – *N-butyl-N*- (3-carboxipropil) nitrosamina;

rpm – rotações por minuto;

CK – creatina cinase;

ALT - alanina aminotransferase;

ALP – fosfatase alcalina;

AST - aspartato aminotransferase;

H&E – hematoxilina e eosina;

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences;

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Caquexia associada ao cancro

A caquexia é uma síndrome paraneoplásica complexa cujo diagnóstico exige um metuculoso exame clínico do doente. O controlo da perda de massa corporal constitui um desafio para os médicos e é feito com o objetivo de melhorar o estado geral do doente oncológico (Muliawati, et al., 2012).

A caquexia associada ao cancro caracteriza-se por um índice de massa corporal (IMC) <20, o que corresponde a uma perda de massa corporal superior a 5%. A diminuição da massa corporal está associada a um processo de inflamação sistémica que induz perda da massa muscular e do tecido adiposo. Esta situação condiciona a qualidade de vida do doente oncológico, diminui a resposta à terapia antineoplásica e, conseqüentemente reduz a sua sobrevivência (Argilés, et al., 2011).

Na caquexia as alterações metabólicas são diferentes das observadas no jejum prolongado, no primeiro caso há interferência simultânea em todas as vias metabólicas. No indivíduo normal, mesmo que a ingestão calórica esteja diminuída, observa-se uma redução na produção de energia ou na taxa metabólica. Já num doente oncológico esta adaptação fisiológica não ocorre, pois com a redução na ingestão calórica, por perda de apetite, o organismo mantém ou aumenta a produção de energia e a taxa metabólica, em função do metabolismo das células tumorais, contribuindo para diminuir as reservas energéticas (Argiles, et al., 2005; Fearon, et al., 2011). Recentemente foi sugerido que a disfunção mitocondrial no músculo-esquelético de doentes com cancro contribui para a perda de massa muscular (Shum, et al., 2012). Em resposta à diferenciação das células tumorais, são libertadas determinadas citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF α). A ação do TNF α , além de outras funções, induz o aumento dos níveis de triglicéridos circulantes, através da inibição da lipoproteína lípase. Este aumento de triglicéridos vai levar a que as mitocôndrias aumentem a oxidação lipídica, levando a um aumento, exagerado, de espécies reativas de oxigénio. Estas, por sua vez, podem causar danos irreversíveis ao DNA da mitocôndria e, posteriormente, morte celular. Estas modificações podem ser a base não só da perda da qualidade do músculo-esquelético como também de outras patologias (Zhou, et al., 2000; Peterson, et al., 2012).

1.2. Etiologia da caquexia

A caquexia pode estar associada ao cancro, à presença de doenças que provocam infeção crónica, à SIDA, à insuficiência cardíaca, à artrite reumatoide, à doença pulmonar obstrutiva crónica, à doença renal crónica, à fibrose cística e à doença de Alzheimer (Von Haehling, et al., 2010).

1.3. Classificação da caquexia

A caquexia tumoral é classificada em dois tipos: caquexia primária e secundária (Matignoni, et al., 2003; Hopkinson, et al., 2008).

A caquexia primária é provocada pelas alterações metabólicas induzidas pelo tumor em crescimento. As células tumorais sintetizam substâncias que perturbam a reparação normal dos tecidos. No doente oncológico, o catabolismo fica acelerado, enquanto o anabolismo abranda, favorecendo a perda de tecido muscular. O cancro provoca ainda uma resposta inflamatória sistémica, que induz uma taxa metabólica elevada e a libertação de determinados compostos (citocinas, por exemplo), que suprimem o apetite e causam uma sensação de saciedade precoce, resultando numa fase inicial em anorexia, seguindo-se a degradação dos tecidos adiposo e muscular (Hopkinson, et al., 2008).

A caquexia secundária é causada por diversos fatores associados à utilização de fármacos antineoplásicos e que comprometem a ingestão de alimento, favorecendo a desnutrição, de entre os quais se destacam as náuseas, os vómitos, a estomatite e as alterações do paladar e do olfato. Quanto ao grau de desenvolvimento, a caquexia pode ser classificada em: pré-caquexia, quando o doente tem uma perda de massa corporal inferior a 5% mas sem complicações sérias; caquexia, quando a síndrome é progressiva, com perda de massa corporal superior a 5% mas reversível; caquexia refratária, quando o organismo já não responde ao tratamento ou quando os benefícios do tratamento são superados pelos efeitos negativos e riscos (Fearon, et al., 2011).

1.4. Fisiopatologia da caquexia associada ao cancro

A regulação da massa muscular esquelética envolve um equilíbrio dinâmico entre as reações de síntese e de degradação proteica (proteólise). O desequilíbrio entre estas vias a favor da proteólise, ou seja, da degradação proteica do músculo-esquelético culmina na perda de massa e diminuição da força muscular (Stevenson, et al., 2003).

As condições de elevada proteólise muscular, estão associadas à disfunção mitocondrial (Julienne, et al., 2012). A ativação do fator nuclear kappa B, pela citocina pró-inflamatória

TNF- α induz a diminuição da expressão de fatores que regulam a biogénese mitocondrial com consequente compromisso da capacidade oxidativa do músculo-esquelético (Wang, et al., 2012; Julienne, et al., 2012). Segundo Lundholm e os seus colaboradores (1982), a perda de massa muscular em doentes com cancro da bexiga não é dependente do aumento da degradação das proteínas do músculo-esquelético mas, parece estar associada a uma diminuição da síntese proteica.

As alterações metabólicas descritas em doentes com caquexia associada ao cancro ocorrem ao nível do metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas (Escott-Stump, et al., 2004; Van Cutsem, et al., 2005; Caro, et al., 2007).

1.5. Alterações metabólicas e inflamatórias subjacentes à caquexia associada ao cancro

Em função do grau de malignidade, o consumo de glucose pelo tumor, varia. A glucose é o principal substrato energético das células tumorais, consumindo as mesmas 10 a 50 vezes mais do que as células normais (Seelaender, et al., 1994). Este consumo excessivo de glucose por parte do tumor estimula a gluconeogénese, no fígado, a partir do lactato e dos aminoácidos resultantes da proteólise muscular (Van Cutsem, et al., 2005; Marin Caro, et al., 2007; Caro, et al., 2007).

Num indivíduo saudável, 90% das reservas energéticas encontram-se no tecido adiposo. No entanto, num doente com caquexia associada ao cancro, ocorre perda de tecido adiposo com consequente perda de massa corporal. A lipólise parece ser induzida por citocinas pró-inflamatórias ou catabólicas (Tisdale, 2003).

As citocinas que desempenham um papel importante na caquexia incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e a proteína C-reativa (CRP) (Escott-Stump, et al., 2004; Van Cutsem, et al., 2005; Fauci, et al., 2008).

O TNF- α , também conhecido por caquexina, é uma das citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta à diferenciação tumoral das células. Esta citocina inibe a síntese da lipoproteína lípase, levando a uma menor captação de lípidos exógenos e a um aumento os níveis de triacilglicerídeos circulantes (Tisdale, 1997; Younes, et al., 2000; Tisdale, 2003).

A IL-1 é uma citocina inflamatória secretada pelos macrófagos, com capacidade de induzir caquexia. Atua diretamente sobre o centro de regulação do apetite, induzindo saciedade, o que provoca uma menor ingestão de alimentos e de água (Tisdale, 2003). Também induz a síntese de IL-6 que aumenta a lipólise contribuindo para a perda de massa corporal (Tijerina, 2004).

A IL-6 é sintetizada pelos macrófagos, monócitos e fibroblastos, exercendo várias atividades biológicas, algumas das quais semelhantes ao TNF- α e à IL-1.

Juntamente com outras citocinas reduz a ingestão de alimento e interfere no balanço energético (Younes, et al., 2000).

A CRP é uma proteína de fase aguda cujos níveis plasmáticos são indicadores de inflamação. O aumento da resposta inflamatória associada ao cancro tem sido relacionado com o aumento da perda de massa corporal nos doentes oncológicos (Fearon, et al., 1999; Argilés, et al., 2009).

2. Cancro da Bexiga

O cancro é uma doença conhecida há milénios e caracteriza-se pelo crescimento celular descontrolado com origem em alterações na normal expressão genética. Estas alterações genéticas surgem por interação de vários fatores intrínsecos e/ou extrínsecos ao indivíduo com o DNA, que favorecem o risco de desenvolvimento do tumor (Gutierrez, et al., 2001; Fauci, et al., 2008).

A incidência do cancro da bexiga é cada vez mais elevada. Estima-se que terão ocorrido em 2008, em todo o mundo, 386300 novos casos e 150200 mortes por cancro da bexiga (Jemal, et al., 2011), tendo sido a incidência mais alta identificada no Egito, com 37 casos por 100000 habitantes. No Egito a elevada incidência de cancro da bexiga está associada à infeção pelo parasita *Shistosoma haematobium*, ao contrário dos casos observados nos países desenvolvidos onde esta doença está associada, para além dos fatores genéticos, à exposição a compostos químicos existentes no meio ambiente, no local de trabalho e no tabaco, bem como a exposição ao fármaco antineoplásico ciclofosfamida (Pelucchi, et al., 2006; Rathkopf, et al., 2007).

O cancro da bexiga tem uma prevalência superior nos homens tendo uma relação género masculino/feminino de 3:1, representando, desta forma, o sétimo cancro mais comum nos homens (Jemal, et al., 2011).

Trabalhos desenvolvidos por Koebnick e seus colaboradores (2012), na tentativa de encontrarem uma associação entre a obsessividade e o desenvolvimento de cancro da bexiga foram inconclusivos.

2.1. Classificação dos tumores da bexiga

A maioria dos casos de tumores de bexiga em humanos (90%) tem origem nas células uroteliais, conhecidas também como células de transição, sendo por essa razão classificados como carcinomas das células de transição (Eble, et al., 2004).

Existem duas vias biológicas diferentes no desenvolvimento do cancro da bexiga humano, conduzindo a dois subtipos principais de cancro: carcinomas papilares e carcinomas invasores (McConkey, et al., 2010).

O carcinoma papilar é diagnosticado em mais de 70% dos doentes (Knowles, 2006). Em contrapartida, o carcinoma invasor surge apenas em 20% dos doentes com cancro da bexiga e está associado à metastização (Parkin, et al., 2005). A sequência de lesões uroteliais identificadas durante o desenvolvimento dos tumores papilares e dos tumores invasores é variável (figura 1) (Knowles, 2006; Vasconcelos-Nóbrega, et al., 2012).

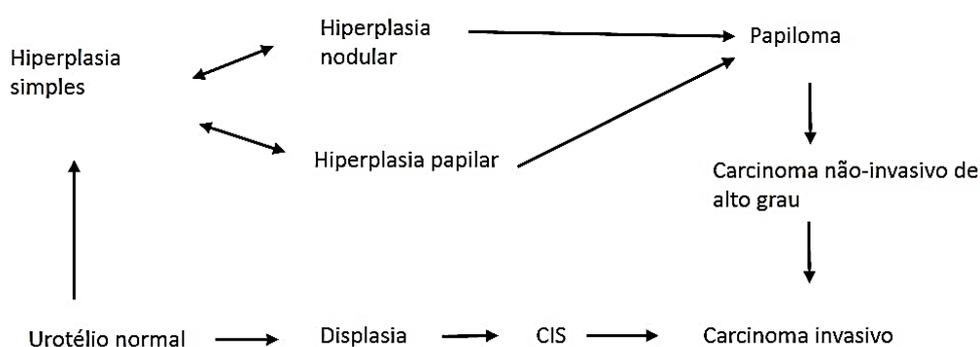


Figura 1: Vias de evolução das lesões uroteliais papilares e invasoras (adaptado de (Oliveira, 2006))

2.2. Modelo animal de cancro da bexiga

Em experimentação animal, os animais são utilizados para substituir o Homem e, por essa razão, denominam-se de modelos animais. Com os modelos animais é possível estudar e investigar os mecanismos patológicos associados ao desenvolvimento da doença e avaliar a eficácia de diversos tipos de tratamentos. Os modelos animais podem classificar-se em vários tipos nomeadamente: modelos espontâneos, induzidos, negativos e órfãos. Para o estudo do cancro da bexiga utilizam-se os modelos induzidos, com recurso a vários agentes carcinogénicos químicos, e roedores de laboratório (Van Zutphen, et al., 1993).

2.3. Indução experimental de tumores da bexiga

A carcinogénese química consiste na indução, por compostos químicos, do desenvolvimento de neoplasias que não são normalmente observadas na espécie animal utilizada, num período de tempo curto (Butterworth, et al., 1992).

Os estudos já realizados em modelos animais permitiram concluir, de entre outros factos, que o desenvolvimento neoplásico decorre através de um processo complexo que, pode ser dividido

em três etapas distintas: iniciação, promoção e progressão (Fould, 1954; Cohen, 1991; Hasegawa, et al., 1998).

Na iniciação e na progressão tumoral ocorrem alterações na estrutura do genoma enquanto na promoção ocorre uma alteração na expressão dos genes, com a proliferação seletiva das células iniciadas pelo agente carcinogénico e o aparecimento de células pré-neoplásicas. A apoptose e a proliferação celular, nas duas etapas iniciais, mantêm-se em equilíbrio, por sua vez na última etapa esse equilíbrio é alterado a favor da proliferação celular e surge a neoplasia (Simons, 1995; Pilot, 2001; Kanojia, et al., 2006).

Para estudar a carcinogénese química experimental do urotélio podem utilizar-se cães, coelhos, cobaias, hamsters, ratos e murganhos (Oliveira, 2006). No entanto, pela facilidade de manipulação e características biológicas, na maioria dos trabalhos são utilizados ratos ou murganhos. Estes animais são os escolhidos devido às suas características: tamanho reduzido, custo, ciclo reprodutivo curto, adaptação às condições de biotério, manipulação fácil, sociabilidade e semelhança fisiológica com o Homem (Maronpot, 1996).

Vários compostos químicos podem ser utilizados para, induzir o desenvolvimento de cancro da bexiga em animais de laboratório, nomeadamente: a *N*-[4-(5-nitro-2-furil)-2-tiazolil]formamida, a *N*-butil-*N*-(4-hidroxipropil) nitrosamina (BBN) e a *N*-metil-*N*-nitrosureia (Butterworth, et al., 1992; Vasconcelos-Nóbrega, et al., 2012).

Tendo em consideração que dos três compostos atrás referidos o mais utilizado é a BBN, apenas iremos aprofundar a descrição da BBN.

A BBN apenas induz o desenvolvimento neoplásico na bexiga (Shirai, et al., 1977; Tsujihashi, et al., 1990). É uma substância oleosa, de cor amarela, pouco volátil e devido à sua hidroxilação terminal é solúvel na água, também é uma substância fotossensível (Kunze, et al., 1976).

A via de administração mais frequente da BBN e também a mais eficaz é a oral (na água de bebida ou por gavagem), contudo também pode ser administrada por instilação intravesical ou por via subcutânea. O tempo de exposição dos animais à BBN determina o espectro de lesões uroteliais induzidas (Cohen, et al., 1982; Kunze, et al., 1990).

Depois de ser absorvida, a BBN é biotransformada pelas desidrogenases hepáticas em *N*-butil-*N*-(3-carboxibutil) nitrosamina (BCPN), este composto, por sua vez, é um forte carcinogénico e é eliminado exclusivamente pela urina. Desta forma, devido ao armazenamento da BCPN na urina é induzido o desenvolvimento de neoplasias uroteliais (Airoldi, et al., 1990). O espectro de lesões uroteliais induzidas pela BBN é idêntico às identificadas no Homem, dependendo da espécie de animal de laboratório utilizado. Caso sejam utilizados ratos desenvolvem-se tumores

do tipo papilar e no caso de serem os murganhos desenvolvem-se carcinomas invasores. Assim a escolha do modelo animal está dependente dos objetivos propostos para o trabalho (Kunze, et al., 1976; Cohen, et al., 1982)

3. Objetivos

Tendo em conta que o desenvolvimento tumoral está associado à ocorrência de caquexia, o nosso trabalho teve como objetivo estudar a caquexia associada ao desenvolvimento de tumores papilares uroteliais quimicamente induzidos em ratos machos da estirpe Wistar.

4. Materiais e Métodos

4.1. Considerações

Neste trabalho experimental foram seguidas as indicações da Diretiva n. 86/609/CEE, no que diz respeito ao bem-estar animal. Os animais foram colocados no biotério do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás os Montes e Alto Douro (UTAD), com controlo do fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidade relativa de 60% e sistema de renovação e filtração de ar e de odores de 75 ventilações por hora.

4.2. Animais

Neste estudo foram utilizados 21 ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, da estirpe Wistar. Os animais foram adquiridos à empresa Harlan (Interfauna, Iberica, S.L.Barcelona) com 4 semanas de idade. Após a chegada, foram distribuídos, aleatoriamente, por gaiolas de policarbonato duro e submetidos a um período de quarentena de uma semana.

4.3. Condições experimentais

Durante o ensaio experimental, os animais foram colocados em gaiolas de policarbonato duro revestidas com cama de carolo de milho e foi feito enriquecimento ambiental com tubos de plástico duro e pedaços de madeira.

Todas as gaiolas foram identificadas com o grupo e o número de animais. A limpeza das gaiolas e a substituição da cama foi feita uma vez por semana.

A água e a comida foram disponibilizadas *ad libitum*, sendo contabilizado o consumo semanal por grupo e por rato. A ração utilizada foi adquirida à empresa Teklad Global Diet® (Espanha).

4.4. Marcação, determinação da massa corporal e ganho ponderal

De maneira a poderem identificar-se os animais facilmente, os mesmos foram marcados nas orelhas com pequenos cortes (figura 2).

A massa corporal dos animais foi determinada mensalmente e foi calculado o ganho ponderal, no final do trabalho experimental, segundo a fórmula: $\text{Ganho ponderal} = \frac{(\text{massa final} - \text{massa inicial})}{\text{massa final}} \times 100$.

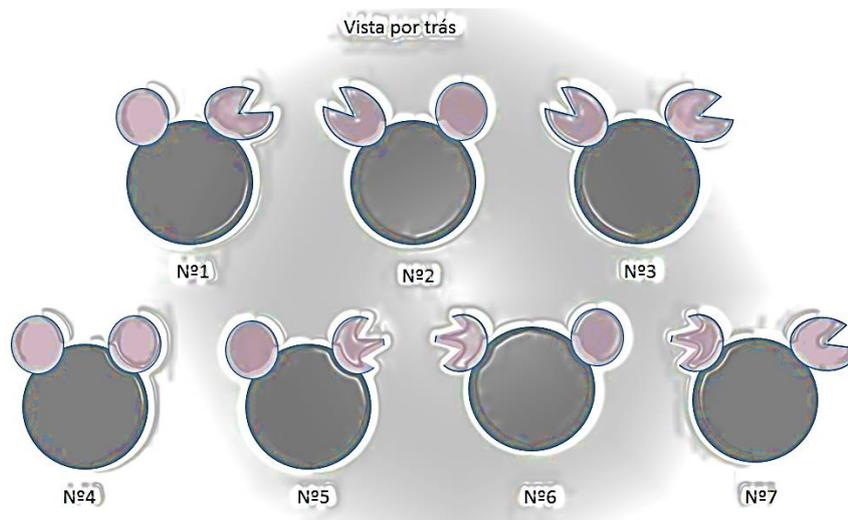


Figura 2: Identificação dos animais

4.5. Grupos experimentais

Imediatamente após a chegada dos animais foi efetuada a sua distribuição, de forma aleatória, em 2 grupos experimentais como mencionado a seguir:

- ✓ Grupo BBN - ratos que foram expostos à BBN (n=12);
- ✓ Grupo controlo - ratos controlo (n=9);

4.6. Indução experimental de tumores da bexiga

A concentração de BBN (0,05%) foi selecionada de acordo com estudos realizados anteriormente (Oliveira, 2006).

O carcinogénico foi misturado com a água de bebida e administrado semanalmente de acordo com a água ingerida diariamente, ao longo de 20 semanas. Devido à fotossensibilidade deste agente carcinogénico, a solução foi preparada em biberões opacos (figura 3).



Figura 3: Preparação da solução de BBN

4.7. Colheita de urina e sangue

A colheita de urina foi efetuada no estado basal e, posteriormente, mensalmente. Por estado basal entende-se o estado inicial dos ratos, nos diversos parâmetros, antes de começar a ser feita qualquer administração ou tratamento.

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas durante 24 horas e, posteriormente, recolhida a urina (figura 4a). Nesta foi medido o seu volume e depois procedeu-se à sua centrifugação a 3000 rpm durante vinte minutos a 4°C. Após a centrifugação mediu-se a densidade.

Tal como na colheita de urina, foi efetuada a colheita de sangue no estado basal, com o objetivo de avaliar o estado geral dos animais, e posteriormente foi efetuada mensalmente. Os animais foram enrolados numa toalha (figura 4b). Em seguida com uma tesoura cortou-se a extremidade da cauda e recolheu-se o sangue para tubos capilares de vidro heparinizados, num total de 8 tubos por animal. No final, as caudas dos animais foram devidamente limpas e desinfetadas. Após a colheita, os tubos capilares foram centrifugados a 9000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos, para obter os valores do hematócrito. O plasma colhido foi transferido para um eppendorf devidamente identificado e congelado a -20°C, para estudos posteriores.



Figura 4a: Método de colheita de urina - metabólica



Figura 4b: Método de colheita de sangue

4.8.Sacrifício dos animais

No final do período experimental, ou seja ao fim de 35 semanas, os animais foram eutanasiados (figura 5) pela administração intraperitoneal de uma overdose de pentobarbital sódico (Eutasil®, BAYER). Foi efetuada uma necropsia completa a todos os animais sacrificados. No momento do sacrifício dos animais foi recolhido sangue por punção intracardíaca, técnica permitida pela FELASA. Logo de seguida, uma pequena parte do sangue, foi colocada em microtubos para se proceder à sua centrifugação a 9000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos, de forma a obter os valores do hematócrito. O soro foi utilizado para determinar os vários parâmetros bioquímicos.

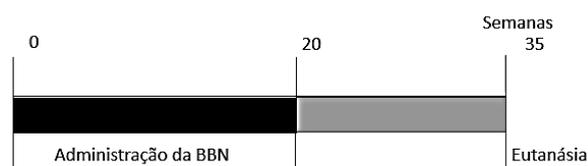


Figura 5: Protocolo experimental

4.9.Análises séricas

A determinação da concentração sérica de albumina, proteína total, colesterol, glucose, triglicerídeos, creatina cinase (CK), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e aspartato aminotransferase (AST) foi efetuada em duplicado no Autoanalisador PRESTIGE 24i (Cormay PZ). Os níveis de IL-6 e CRP foram determinados por imunoblotting. As amostras de soro (n=4) foram diluídas 30 vezes em TBS (100 mM Tris, 1,5 mM NaCl, pH 8.0), tendo-se aplicado 100 µL numa membrana de nitrocelulose (Millipore, Irlanda), previamente ativada em solução de metanol 10%, sob vácuo. Para o efeito utilizou-se um sistema de slot blot (Hybri-Slot™, Life Technologies, USA). A membrana foi posteriormente incubada com uma solução de bloqueamento contendo 5% leite em pó magro em TBS-T (TBS com 0,05% Tween 20) durante 1 hora com agitação. Posteriormente incubou-se a membrana com anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (*rabbit monoclonal* anti-CRP antibody (ab32412) ou *rabbit polyclonal* anti-IL-6 (ab6672) da Abcam) durante 1 hora em agitação constante. Após três lavagens de 10 minutos cada com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário diluído 1:1000 em solução de bloqueamento (anti-rabbit, GE Healthcare, UK). Após 1 hora, a membrana foi lavada com TBS-T, ao que se seguiu a deteção das proteínas ligadas aos anticorpos por quimiluminescência com ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare, Japão).

Após a exposição da membrana a um filme Raio-X (GE Healthcare), procedeu-se à revelação do mesmo. O filme obtido foi digitalizado no Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) e analisado com o software Image Lab (Bio-Rad, versão 3.0). Paralelamente corou-se a membrana com Ponceaus para controlo da quantidade de proteína aplicada.

4.10. Análise histológica das bexigas

A bexiga foi fixada e distendida *in situ* de acordo com a técnica descrita por Teixeira *et al.* (2013). De seguida, todos os órgãos foram recolhidos, pesados e fixados em formol tamponado a 10%, durante 24h, para posteriores estudos histológicos.

As bexigas foram seccionadas longitudinalmente e os tumores desenvolvidos foram avaliados macroscopicamente, fotografados e contabilizados.

Após este processo, as amostras foram embebidas em parafina, realizaram-se vários cortes de 2 µm de espessura e foram coradas com a coloração de rotina, hematoxilina e eosina (H&E). As lesões uroteliais foram classificadas de acordo com a classificação de Epstein (1998).

4.11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences, versão 17 para Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Foram calculadas as médias e os desvios padrão da massa corporal, da massa dos consumos de água e comida, dos valores de hematócrito, das massas e massas relativos dos órgãos dos animais e dos parâmetros bioquímicos. Para as lesões do urotélio foram calculadas as suas percentagens. Para detetarmos as diferenças estatisticamente significativas utilizamos o teste t-independente de Student.

Os valores obtidos foram considerados como significativos para valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Comportamento dos animais e primeiros sinais clínicos

Ao longo do ensaio, os animais foram observados diariamente de forma a avaliar o seu comportamento e a sua condição clínica. Não se observaram comportamentos de agressividade ou qualquer outro comportamento menos comum nesta estirpe. O primeiro sinal clínico da doença foi a hematúria visível na urina. Os animais do grupo BBN manifestaram hematúria 15 semanas após o início do protocolo experimental que se agravou com o decorrer do tempo. Os animais do grupo controlo tiveram atividade física normal e não manifestaram sinais clínicos de doença durante todo o protocolo experimental.

5.2. Massa corporal dos animais

Na tabela 1 está representada a média dos valores da massa corporal dos dois grupos experimentais no início e no final do trabalho. A massa corporal inicial foi homogénea entre os dois grupos. Ao longo do trabalho experimental, os animais foram aumentando gradualmente de massa corporal embora esta tenha sido mais heterogénea entre os animais do grupo BBN (tabela 1).

| Grupo | BBN | Controlo |
|--|------------------|------------------|
| Média da massa corporal inicial (g) | 134,967 ± 7,206 | 136,467 ± 6,232 |
| Média da massa corporal final (g) | 473,515 ± 48,898 | 477,238 ± 39,894 |
| Ganho ponderal de massa corporal (%) | 71,241 | 71,269 |
| Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p>0,05$) | | |

A comparação da massa corporal dos animais do grupo BBN com a média da massa corporal do grupo controlo evidenciou que 50% (6/12) dos animais apresentaram mais de 5% de perda de massa corporal (tabela 2).

Tabela 2: Comparação da massa corporal dos animais do grupo BBN com a média da massa corporal do grupo controlo

| Nº de animais do grupo BBN | Massa corporal final dos animais do grupo BBN (g) | Diferença de massas corporais (g) | Perda de massa corporal (%) |
|----------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 525,96 | 48,72 | 0 |
| 2 | 427,4 | - 49,84 | 10,4 |
| 3 | 472,36 | - 4,88 | 1,0 |
| 4 | 436,5 | - 40,74 | 8,5 |
| 5 | 466,7 | - 10,54 | 2,2 |
| 6 | 562,7 | 85,46 | 0 |
| 7 | 454,16 | - 23,08 | 4,8 |
| 8 | 513,18 | +35,94 | 0 |
| 9 | 454,76 | - 22,48 | 4,7 |
| 10 | 411,34 | - 65,9 | 13,8 |
| 11 | 424,54 | - 52,7 | 11,0 |
| 12 | 532,58 | 55,34 | 0 |

Média da massa corporal do grupo controlo: 477,24g

5.3.Avaliação do consumo de água e de ração

A média das massas dos consumos de água e ração, no início e no final do trabalho, está sumariada na tabela 3. O consumo de ração, nos dois grupos, foi semelhante tanto no início como no final do trabalho. O consumo de água inicial foi semelhante, para os dois grupos. No entanto, no final do trabalho, o grupo controlo teve um consumo ligeiramente inferior em comparação com o grupo exposto à BBN. Contudo, estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Tabela 3: Média da massa dos consumos de água e ração

| Grupo | Consumo de comida (g) | | Consumo de água (g) | |
|-----------------|-----------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | Semana 1 | Semana 35 | Semana 1 | Semana 35 |
| BBN | 16,885 ± 0,898 | 21,950 ± 0,368 | 25,655 ± 1,506 | 40,745 ± 1,520 |
| Controlo | 17,105 ± 0,318 | 22,020 ± 2,814 | 28,270 ± 2,715 | 34,075 ± 5,141 |

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p>0,05$)

5.4. Evolução do número de ratos com hematúria

O número de ratos com hematúria, que foram aparecendo ao longo do trabalho experimental, está descrito na tabela 4. O primeiro animal com hematúria apareceu à décima quinta semana e, no final do protocolo experimental, todos os animais apresentavam hematúria.

| Semanas após o início do trabalho experimental | Número de animais com hematúria | Número de animais sem hematúria |
|---|--|--|
| 1-14 | 0 (Nenhum) | 12 |
| 15 | 1 | 11 |
| 20 | 5 | 7 |
| 23 | 11 | 1 |
| 35 | 12 (Todos) | 0 |

5.5. Massas e massas relativas dos órgãos dos animais

Na tabela 5 encontram-se descritos as massas e massas relativas dos órgãos dos animais. Os animais do grupo BBN não apresentaram diferenças estatisticamente significativas da massa média dos órgãos comparativamente com o grupo controlo, exceto a bexiga. A massa média das bexigas dos animais pertencentes ao grupo BBN foram significativamente superiores às do grupo controlo.

| | BBN (n=12) | Controlo (n=9) |
|---------------------|-------------------|-----------------------|
| Pulmão | 2,158±0,499 | 2,022±0,341 |
| Coração | 1,388±0,195 | 1,257±0,189 |
| Fígado | 13,543±1,894 | 13,095±1,401 |
| Baço | 1,436±0,742 | 1,250±0,189 |
| Rim esquerdo | 1,403±0,195 | 1,372±0,158 |
| Rim direito | 1,423±0,216 | 1,363±0,194 |
| Bexiga | 2,972±2,730* | 1,120±0,449 |

* $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa

A comparação da massa muscular dos animais do grupo BBN, que perderam mais de 5% de massa corporal, com a média da massa muscular do grupo controlo evidenciou que 83,3% (5/6) dos animais apresentaram perda de massa muscular (tabela 6).

| Tabela 6: Comparação da massa muscular dos animais do grupo BBN que perderam mais de 5% de massa corporal com a média da massa muscular do grupo controlo | | | |
|--|--|---|------------------------------------|
| Nº dos animais que perderam mais de 5% de massa corporal | Massa muscular final dos animais do grupo BBN (g) | Diferença de massas muscular (g) | Perda de massa muscular (%) |
| 2 | 4,587 | - 0,266 | 5,5 |
| 4 | 4,840 | - 0,013 | 0,3 |
| 7 | 4,648 | - 0,205 | 4,2 |
| 9 | 5,233 | + 0,380 | 0 |
| 10 | 4,267 | - 0,586 | 12,1 |
| 11 | 4,296 | - 0,557 | 11,5 |

Média da massa muscular do grupo controlo: 4,853

5.6. Percentagem das lesões uroteliais identificadas entre os dois grupos experimentais

As lesões uroteliais macroscópicas identificadas nos dois grupos estão representadas na figura 6 (a e b). Macroscopicamente observaram-se massas branco-acinzentadas pedunculadas, com superfícies irregulares, áreas de necrose, hemorragias e ulcerações focais. A sua dimensão era variável, as mais pequenas com cerca de 1mm e as maiores preenchendo o lúmen da bexiga. Não foram identificados urólitos em nenhum dos ratos.

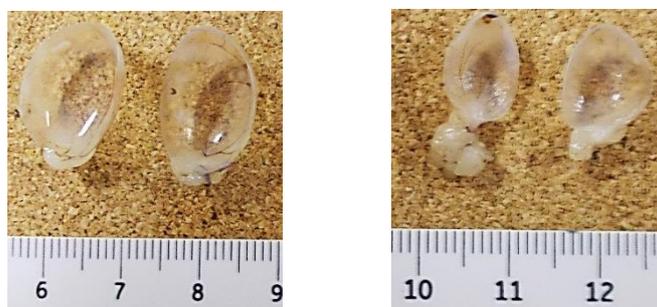


Figura 6a: Bexigas dos ratos do grupo controlo

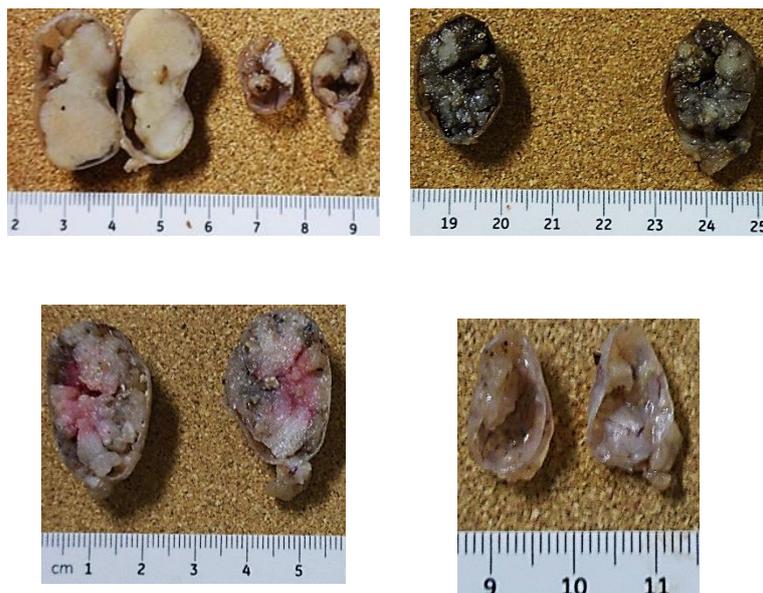


Figura 6b: Lesões uroteliais das bexigas dos ratos do grupo BBN

A incidência de lesões histopatológicas, em cada grupo, pode ser consultada na tabela 7. No grupo controle não foram identificadas alterações uroteliais. A lesão urotelial mais frequente foi o carcinoma papilar de baixo grau (91,7%).

| Tabela 7: Percentagem das lesões uroteliais identificadas entre os dois grupos experimentais | | |
|---|-------------------------|-----------------------------|
| | Grupo BBN (n=12) | Grupo controle (n=9) |
| Urotélio normal | 0 | 100% |
| Hiperplasia simples | 83,3% (10/12) | 0 |
| Hiperplasia nodular | 50%(6/12) | 0 |
| Hiperplasia papilar | 8,3%(1/12) | 0 |
| Papiloma | 50%(6/12) | 0 |
| Tumor papilar de baixo potencial maligno | 41,7%(5/12) | 0 |
| Carcinoma papilar de baixo grau | 91,7%(11/12) | 0 |
| Carcinoma papilar de alto grau | 66,7%(8/12) | 0 |
| Carcinoma invasor | 8,3%(1/12) | 0 |
| Metaplasia epidermoide com queratinização | 50% (6/12) | 0 |

5.7. Análise do hematócrito

Os valores médios do hematócrito estão apresentados na tabela 8. O grupo BBN evidenciou valores de hematócrito estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, no início e no final do trabalho.

| Grupo | Hematócrito (%) | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Semana 1 | Semana 35 |
| BBN | 47,6 ± 2,9^a | 48,9 ± 2,6^b |
| Controle | 43,3 ± 2,3 | 51,6 ± 1,6 |

^a Estatisticamente significativo do grupo controle na semana 1 ($p < 0,05$); ^b Estatisticamente significativo do grupo controle na semana 35 ($p < 0,05$).

5.8. Análise dos parâmetros bioquímicos determinados no soro

Os valores dos parâmetros bioquímicos determinados no soro estão apresentados na tabela 9. Os animais dos diferentes grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e da aspartato aminotransferase (AST).

| | Grupo BBN | Grupo Controle |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| Albumina (g/l) | 19,291±4,153 | 23,869±6,349 |
| Proteínas totais (g/l) | 29,643±6,948 | 36,814±9,259 |
| Colesterol (mg/dl) | 38,922±13,094 | 37,211±11,942 |
| Glucose (mg/dl) | 101,344±30,238 | 120,700±33,607 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 75,411±29,411 | 77,711±38,555 |
| ALT (U/L) | 26,533±7,991 | 42,856±26,514 |
| ALP (U/L) | 23,556*±8,601 | 49,322±29,074 |
| AST (U/L) | 47,411*±12,460 | 111,100±74,318 |
| CK (U/L) | 339,378±237,243 | 493,911±215,693 |

* $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa

Os valores séricos da Proteína C-reativa e da Interleucina 6 obtidos por imunoblotting encontram-se apresentados na tabela 10.

| | Grupo BBN | Grupo Controlo |
|------|------------------|-----------------------|
| CRP | 1980,699±259,589 | 2207,376±384,648 |
| IL-6 | 263,145±26,564 | 273,816±28,992 |

Como se pode constatar pela análise da tabela, os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para estes dois marcadores inflamatórios doseados no soro.

6. Discussão

A utilização de modelos animais é de enorme importância para o estudo dos tumores da bexiga, uma vez que, permite estudar os mecanismos fisiopatológicos e desenvolver novas estratégias terapêuticas. O animal escolhido para este estudo foi o rato macho Wistar, uma vez que as características fisiopatológicas dos tumores da bexiga, induzidos quimicamente, são muito semelhantes às humanas, após a exposição ao agente carcinogénico BBN estes animais desenvolvem tumores do tipo papilar morfológicamente semelhantes aos identificados no Homem (Kunze, 1979; Fukushima, et al., 1982). Por outro lado, nesta estirpe de animais de laboratório, o cancro da bexiga não se desenvolve de forma espontânea. Outra vantagem é a grande disponibilidade de informação científica sobre as características biológicas desta espécie (Clayson, et al., 1995; Oliveira, et al., 2006; Arentsen, et al., 2009).

Neste trabalho experimental, o cancro da bexiga foi induzido através da administração da BBN na água de bebida, durante 20 semanas consecutivas, a ratos machos da estirpe Wistar, com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de caquexia muscular associada ao crescimento tumoral. A aplicabilidade deste modelo animal de cancro da bexiga ao estudo da caquexia foi demonstrada previamente por Padrão e colaboradores (2013). Efetivamente, no presente estudo 50% dos animais do grupo BBN manifestaram uma massa corporal 5% mais baixa do que os animais controlo ao fim de 20 semanas de exposição à BBN, o que sugere a ocorrência de caquexia. Esta perda de massa corporal foi acompanhada por perda de massa muscular em

83,3% dos animais do grupo exposto à BBN, apesar de não se terem observado alterações do consumo de alimento nem de água.

No nosso trabalho, a partir da décima quinta semana de administração oral da BBN surgiram os primeiros ratos com hematúria. Até ao final do ensaio experimental o número de casos de hematúria foi aumentando. No final do ensaio experimental, obtivemos um valor de hematócritos significativamente inferior no grupo BBN. O cancro da bexiga está associado ao desenvolvimento de anemia, sendo a sua etiologia, o crescimento do tumor. Shephard e os seus colaboradores (2012) estudaram as características clínicas dos doentes com cancro da bexiga e uma delas era hematúria, o que suporta os nossos resultados.

A massa dos órgãos pode dizer muito sobre o bem-estar dos animais, porque em função do seu estado fisiológico ou patológico a mesma poder ter variações. No nosso trabalho, todos os órgãos, exceto a bexiga e o músculo *gastrocnemius*, tiveram a mesma massa corporal, entre os dois grupos. As alterações observadas ao nível da massa dos órgãos são idênticas ao descrito por Okajima e os seus colaboradores (1997), num estudo do efeito quimiopreventivo do Piroxicam, Licopeno e do β -Caroteno em animais com cancro da bexiga induzido quimicamente pela BBN. As bexigas dos animais do grupo expostos à BBN apresentaram uma maior massa, explicada através dos tumores nelas existentes, demonstrado também por Wanibuchi e colaboradores (1996) num estudo realizado para perceber o efeito do ácido dimetilarsínico na evolução dos cancros induzidos pela BBN em ratos. Alguns animais do grupo BBN apresentaram uma diminuição de massa muscular, explicada pelo estado caquético dos animais tal como demonstra White e os seus colaboradores (2011) num estudo efetuado para perceber a regulação do músculo-esquelético durante a progressão da caquexia associada ao cancro. A resposta dos animais ao BBN não foi uniforme em termos de perda de massa corporal, em que 33,3% não manifestou perda de massa mas tal pode ser justificado por fatores genéticos inerentes a cada sujeito (Fearon, et al., 2012). O menor número de animais com evidências de caquexia associada ao cancro da bexiga comparativamente ao estudo de Padrão e colaboradores (2013) pode ser explicado pelo fato de termos analisado estadios mais iniciais da doença.

Com as amostras de soro recolhidas no final do ensaio experimental foram determinados vários parâmetros bioquímicos para avaliar o estado geral e o potencial grau de caquexia dos animais com tumores da bexiga. Para tal procedeu-se à determinação dos níveis de albumina, da proteína total, da alanina aminotransferase, da creatina cinase, da fosfatase alcalina e da aspartato aminotransferase.

A albumina é uma proteína sintetizada exclusivamente no fígado, tem uma semivida de cerca de 20 dias e é a principal constituinte das proteínas do plasma. Esta proteína é um importante transportador de triglicéridos que afeta a cinética de muitos fármacos. A albumina constitui um biomarcador importante de muitas doenças, incluindo o cancro, a artrite reumatoide, a isquemia e a obesidade pós-menopausa. Os baixos níveis plasmáticos desta proteína têm sido relacionados com a manifestação de inflamação e tem sido associada à caquexia (Yang, et al., 2007; Ascenzi, et al., 2010; Sbarouni, et al., 2011). Neste trabalho experimental, os níveis de albumina foram tendencialmente menores nos animais expostos à BBN em comparação com o grupo controlo. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Padrão e colaboradores (2013). Os resultados do colesterol e dos triglicéridos observados entre os grupos experimentais não sugerem a ocorrência da sua degradação, um evento geralmente subjacente à caquexia associada ao cancro (Tisdale, 2003).

A AST apresenta uma elevada atividade não só no fígado, mas também no músculo-esquelético, no músculo cardíaco, células cerebrais, rins e nos eritrócitos, localiza-se no citoplasma e nas mitocôndrias do hepatócito, sendo no rato 80% mitocondrial. A atividade da AST pode aumentar em quase todos os tipos de doenças hepáticas, no enfarte do miocárdio, na pancreatite aguda, na anemia hemolítica aguda, queimaduras graves, doença renal aguda e doenças do músculo-esquelético (Pratt, et al., 2000). Segundo Warnock e os seus colaboradores (1974), os níveis de AST podem estar diminuídos em doentes urémicos. No nosso trabalho experimental obtivemos valores de AST significativamente mais baixos no grupo exposto à BBN do que no grupo controlo. Este resultado pode sugerir que os rins dos animais estavam com o funcionamento comprometido mas também pode ser devido à contribuição do músculo-esquelético, devido ao catabolismo celular.

A ALT é uma enzima encontrada principalmente no fígado, mas também nos rins, no coração, nos músculos e no pâncreas, em menores quantidades. Pode estar aumentada na obesidade e leucemia linfoblástica aguda, em contrapartida, pode estar diminuída na infeção do trato génito-urinário e em várias doenças malignas (Ramaiah, 2007). No nosso protocolo experimental obtivemos valores de ALT tendencialmente mais baixos no grupo exposto à BBN em comparação com o grupo controlo. Estes resultados são sugestivos de alterações no trato génito-urinário.

A CK é uma enzima presente em vários tecidos e tipos de células, como por exemplo, no coração, no cérebro e no músculo, intervindo no processo de produção de energia a nível muscular. Níveis altos de CK podem ser um importante biomarcador de lesão do músculo-

esquelético, de enfarte do miocárdio e de acidente vascular cerebral. Níveis baixos de CK no soro podem indicar redução da atividade física, causada por doença ou idade avançada, por massa muscular reduzida acompanhada de perda de massa muscular ou estado caquético (Nanji, et al., 1981; Barnert, et al., 1985). No nosso trabalho obtivemos valores tendencialmente mais baixos de CK no grupo exposto à BBN, o que sugere predisposição destes animais à caquexia. Os valores de AST, ALT e CK foram inferiores no grupo exposto à BBN em comparação com o grupo controlo. Sendo que, para a AST os valores foram estatisticamente significativos. Os níveis baixos de AST, ALT e CK, obtidos no nosso trabalho experimental, estão de acordo com os resultados obtidos também por Fouladiun e os seus colaboradores (2007), num estudo para avaliar o metabolismo do organismo e a qualidade de vida em pacientes com cancro e com uma evolução progressiva de caquexia. De uma forma geral, valores de AST, ALT e CK mais baixo no grupo BBN sugerem perda de músculo e evolução do estado caquético dos animais. Os resultados obtidos através da análise da perda de massa corporal e da perda de massa muscular, de cada animal exposto à BBN, também confirmam a evolução do estado de caquexia destes animais. Verificamos que 66,6% dos animais expostos à BBN apresentaram perda de massa corporal, sendo que 50% teve uma perda superior a 5%, o que é sugestivo de caquexia. Relativamente à perda de massa muscular, obtivemos que 83,3% dos animais, que perderam mais de 5% de massa corporal, apresentaram perda de massa muscular, sendo que 50% destes animais perderam mais de 5% de massa muscular.

A ALP é um grupo de enzimas encontradas principalmente no fígado e no osso e em menor quantidade no intestino, placenta e rim. O aumento da ALP no soro pode ter muitas causas como doenças do fígado ou ossos enquanto o seu decréscimo pode ser devido a deficiência de zinco, hipotireoidismo, deficiência de vitamina C, deficiência de ácido fólico, excesso de ingestão de vitamina D, baixos níveis de fósforo, doença celíaca, desnutrição, anemia perniciosa, insuficiência de vitamina B6 (Bolean, et al., 2011).

Estudos anteriores sugerem que os níveis de ALP se correlacionam com a massa corporal. No nosso trabalho experimental obtivemos valores de ALP significativamente mais baixos no grupo exposto à BBN, comparativamente ao grupo controlo. Estes resultados, analisados em conjunto com o hematócrito, sugerem que os animais estavam anémicos devido ao avançado estado do cancro da bexiga.

A CRP é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado, em resposta a fatores libertados por macrófagos e pelos adipócitos. O aumento dos níveis deste marcador inflamatório está associado a uma menor sobrevida dos doentes oncológicos (McMillan, et al., 2003; Saito, et

al., 2007). Yoshida e os seus colaboradores (2007) verificaram que a CRP poderia ser um marcador útil para doentes com cancro da bexiga músculo-invasivo apesar de apenas 11% dos doentes ter apresentado níveis altos de CRP. No presente estudo, a associação da CRP ao cancro da bexiga e, particularmente, à caquexia não foi evidente o que pode ser justificado, em parte, pelo reduzido número de animais analisados (n=4), que se espera aumentar no futuro. O mesmo se verificou para a IL-6, uma citocina multifuncional sintetizada pelos macrófagos, monócitos e fibroblastos. Vários estudos sugerem que a IL-6 está associada à proliferação celular e à inflamação no cancro da bexiga (Li, et al., 2010). Tsui e os seus colaboradores (2013) relacionaram os níveis mais elevados de IL-6 nos doentes oncológicos com a tumorigénese em células de cancro da bexiga em Humanos.

7. Conclusão

No presente trabalho induziram-se lesões uroteliais, por exposição à BBN durante 20 semanas, o que foi demonstrado pela análise macroscópica e histológica das bexigas. No grupo controlo 100% dos animais apresentaram urotélio normal. Nos animais expostos à BBN obtivemos 83,3% de hiperplasia simples, 50% de hiperplasia nodular, 8,3% de hiperplasia papilar, 50% de papiloma, 41,7% de tumor papilar de baixo potencial maligno, 91,7% de carcinoma papilar de baixo grau, 66,7% de carcinoma papilar de alto grau, 8,3% de carcinoma invasor e 50% e metaplasia epidermoide com queratinização.

O estado de caquexia associada ao cancro, dos animais expostos à BBN, foi demonstrado pela perda de mais de 5% de massa corporal em 50% dos animais. Os animais deste grupo evidenciaram diminuição dos níveis séricos da albumina, da proteína total, da CK, da ALT, da ALP e da AST. No entanto, não se observaram alterações sugestivas de lipólise, nem dos marcadores inflamatórios, CRP e IL-6.

Neste trabalho experimental demonstrou-se que os animais com cancro da bexiga, induzido por exposição à BBN são suscetíveis a desenvolverem caquexia, que nos estadios iniciais da doença se relaciona com a alteração de parâmetros séricos sugestivos de catabolismo muscular.

O modelo animal de cancro da bexiga induzido quimicamente pela exposição a BBN parece ser adequado ao estudo da caquexia associada ao cancro podendo, no futuro ser aplicado ao estudo dos mecanismos moleculares subjacentes e a abordagens terapêuticas que permitam tratar este síndrome paraneoplásico.

8. Referências Bibliográficas

-A-

Airoidi L., Magagnotti C., Bonfanti M., Fanelli R., 1990. Alpha-oxidative metabolism of the bladder carcinogens N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine and N-nitrosobutyl(3-carboxypropyl) amine within the rat isolated bladder. *Carcinogenesis*, Vol. 11, pp. 1437-1440;

Arentsen H.C., Hendricken K., Witjes J.A., 2009. Experimental rat bladder urothelial cell carcinoma models. *World Journal of Urology*, Vol. 27, pp. 313-317;

Argilés J.M., López-Soriano F.J., Toledo M., Betancourt A., Serpe R., Busquets S., 2011. The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle*, Vol. 2, pp. 87-93;

Argilés J.M., Busquets S., Toledo M., López-Soriano F.J., 2009. The role of cytokines in cancer cachexia. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, Vol. 3, pp. 263-268;

Ascenzi P. e Fasano M., 2010. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophysical Chemistry*, Vol. 148, pp. 16-22;

-B-

Barnert J. e Behr W., 1985. Acute viral hepatitis and low values for serum creatine kinase. *Clinical Chemistry*, Vol. 31, pp. 1909-1910;

Bolean M., Simão A.M., Favarin B.Z., Millán J.L., Ciancaglini P., 2011. Thermodynamic Properties and Characterization of Proteoliposomes Rich in Microdomains Carrying Alkaline Phosphatase. *Biophysical Chemistry*, Vol. 158, pp. 111-118;

Butterworth B.E., Popp J.A., Conolly R.B., Goldsworthy T.L., 1992. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *International Agency for Research on Cancer*, Vol. 116, pp. 279-305;

-C-

Caro M.M., Laviano A., Pichard C., Candela C.G., 2007. Relationship between nutritional intervention and quality of life in cancer patients. *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 22, pp. 337-350;

Clayson D.B., Fishbein L. e Cohen S.M., 1995. Effects of stones and physical factors on the induction of rodent bladder cancer. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 33, pp. 771-784;

Cohen S.M., 1991. Analysis of modifying factors in chemical carcinogenesis. *Progress in Experimental Tumor Research*, Vol. 33, pp. 21-40;

Cohen S.M. e Friedell G.H., 1982. The mouse in biomedical research: Neoplasms of the urinary system. New York : Academic press;

-E-

Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A., 2004. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon : IARC Press;

Epstein J.I., Amin M.B., Reuter V.R., Mostofi F.K., 1998. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. American Journal of Surgical Pathology, Vol. 22, pp. 1435-1448;

Escott-Stump S. e Mahan L.K., 2004. Krause's food, nutrition & diet therapy. Universidade de Michigan: Saunders;

-F-

Fauci A.S., Braunwald E., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L., Joseph L., 2008. Harrison's Principles of Internal Medicine. Boston, McGraw-Hill Medical;

Fearon K., Strasser F., Anker S.D., Bosaeus I., Bruera E., Fainsinger R.L., Jatoi A., Loprinzi C., MacDonald N., Mantovani G., Davis M., Muscaritoli M., Ottery F., Radbruch L., Ravasco P., Walsh D., Wilcock A., Kaasa S., Baracos V.E., 2011. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus framework. Lancet Oncology, Vol. 12, pp. 489-495;

Fearon K.C., Glass D.J. e Guttridge C.C., 2012. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. Cell metabolism, Vol. 16, pp. 153-166;

Fearon K.C., Barber M.D., Falconer J.S., McMillan D.C., Ross J.A., Preston T., 1999. Pancreatic cancer as a model: inflammatory mediators, acute phase response, and cancer cachexia. World Journal of Surgery, Vol. 23, pp. 584-588;

Fouladiun M., Korner U., Gunnebo L., Sixt-Ammilon P., Bosaeus I., Lundholm K., 2007. Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. Clinical Cancer Research, Vol. 13, pp. 6379-6385;

Fould L., 1954. The experimental study of tumor progression: a review. Cancer Research, Vol. 14, pp. 327-339.

Fukushima S., Murasaki G., Hirose M., Nakanishi K., Hasegawa R., Ito N., 1982. Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. Acta Pathology, Vol. 32, pp. 243-250;

-G-

Gutierrez J.B. e Salsamendi A.L., 2001. Fundamentos de ciência toxicológica: Carcinogenesis química. Madrid, Santos Diaz;

-H-

Hasegawa R., Futakuchi M., Mizoguchi Y., Yamaguchi T., Shirai T., Ito N., Lijinsky W., 1998. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. Cancer Letters, Vol. 123, pp. 185-191;

Hopkinson J.B., Wright D.N.M. e Foster C., 2008. Management of weight loss and anorexia. Annals of Oncology, Vol. 19, pp. 289-293;

-J-

Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., 2011. Global cancer statistics. Cancer Journal for Clinicians, Vol. 61, pp. 69-90;

Julienne C.M., Dumas J.F., Goupille C., Pinault M., Berr C., Collin A., Tesseraud S., Couet C., Servais S., 2012. Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle, Vol. 3, pp. 265-275;

-K-

Kanojia D. e Vaidya M.M., 2006. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. Oral Oncology, Vol. 42, pp. 1-13;

Knowles M.A., 2006. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese. Advance Access publication, Vol. 27, pp. 361-373;

Koebnick C., Michaud D., Moore S.C., Park Y., Hollenbeck A., Ballard-Barbash R., Schatzkin A., Leitzmann M.F., 2012. Body Mass Index, Physical Activity, and Bladder Cancer in a Large Prospective Study. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, Vol. 17, pp. 1213-1221;

Kunze E., 1979. Development of urinary bladder cancer in the rat. Current Diagnostic Pathology, Vol. 67, pp. 145-232;

Kunze E. e Chowanec J., 1990. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. International Agency for Research on Cancer, Vol. 99, pp. 345-397;

Kunze E., Schauer A. e Schatt S., 1976. Stages of transformation in the development of N-butyltransitional cell carcinomas in the urinary bladder of rats. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Vol. 87, pp. 139-160;

-L-

Lundholm K., Bennegard K., Edén E., Svaninger G., Emery P.W., Rennie M.J., 1982. Efflux of 3-methylhistidine from the leg in cancer patients who experience weight loss. *Cancer Research*, Vol. 42, pp. 4807-4811;

-M-

Marin Caro M.M., Laviano A. e Pichard C., 2007. Nutritional intervention and quality of life in adult oncology patients. *Clinical Nutrition*, Vol. 26, pp. 289-301;

McConkey D.J., Lee S., Choi W., Tran M., Majewski T., Lee S., Siefker-Radtke A., Dinney C., Czerniak B., 2010. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology*, Vol. 28, pp. 429-40;

McMillan D.C., Canna K. e McArdle C.S., 2003. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, Vol. 90, pp. 215-219;

Muliawati Y., Haroen H. e Rotty L.W.A., 2012. Cancer Anorexia - Cachexia Syndrome. *Journal of Internal Medicine*, Vol. 44, pp. 154-162;

-N-

Nanji A.A. e Blank D., 1981. Low serum creatine kinase activity in patients with alcoholic liver disease. *Clinical Chemistry*, Vol. 27, pp. 1949-1954;

-O-

Okajima E., Ozono S., Endo T., Majima T., Tsutsumi M., Fukuda T., Akai H., Denda A., Hirao Y., Okajima E., Nishino H., Nir Z., Konishi Y., 1997. Chemopreventive efficacy of Piroxicam administered alone or in combination with Lycopene and B- Carotene on the development of rat urinary bladder carcinoma after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine treatment. *Journal of Cancer Research*, Vol. 88, pp. 543-552;

Oliveira P. A., 2006. Revisão bibliográfica: Cancerização experimental do urotélio do rato. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro;

Oliveira P.A., Palmeira C., Colaço A., De la Cruz L.F., Lopes C., 2006. DNA Content Analysis, Expression of KI-67 and P53 in Rat Urothelial Lesions Induced by N-BUTYL-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine and Treated with Mitomycin C and Bacillus Calmette-Guérin. *Anticancer Research*, Vol. 26, pp. 2995-3004;

Oliveira P.A., Colaço A., De la Cruz L.F., Lopes C., 2006. Experimental bladder carcinogenesis - rodent models. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, Vol. 28, pp. 2-11;

-P-

Padrão A.I., Oliveira P., Vitorino R., Colaço B., Pires M.J., Márquez M., Castellanos E., Neuparth M.J., Teixeira C., Costa C., Moreira-Gonçalves D., Cabral S., Duarte J.A., Santos L.L., Amado F., Ferreira R., 2013. Bladder cancer-induced skeletal muscle wasting: disclosing the role of mitochondria plasticity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 45, pp. 1399-1409.

Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 55, pp. 74-108;

Pelucchi C., Bosetti C., Negri E., Malvezzi M., La Vecchia C., 2006. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. *Nature Clinical Practice Urology*, Vol. 3, pp. 327-40;

Peterson C.M., Johannsen D.L. e Ravussin E., 2012. Skeletal Muscle Mitochondria and Aging: A Review. *Journal of Aging Research*, Vol.2012, pp.20;

Pilot H.C., 2001. Animal models of neoplastic development. *Journal of Developmental Biology*, Vol. 106, pp. 53-57;

Pratt D.S. e Kaplan M.M., 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *New England Journal of Medicine*, Vol. 342, pp. 1266-1271;

-R-

Ramaiah S.K., 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 45, pp. 1551-1557;

Rathkopf D. e Scher H.I., 2007. *Multidisciplinary Management of Genitourinary Malignancies*. London, The cancer handbook;

-S-

Saito K., Kawakami S., Ohtsuka Y., Fujii Y., Masuda H., Kumagai J., Kobayashi T., Kageyama Y., Kihara K., 2007. The impact of preoperative serum C-reactive protein on the prognosis of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma treated surgically. *BJU International*, Vol. 100, pp. 269-273;

Sbarouni E., Georgiadou P. e Voudris V., 2011. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol. 49, pp. 177-184;

Seelaender M.C.L. e Curi R., 1994. Metabolic aspects in cancer cachexia. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 46, pp. 92-96;

Shephard E.A., Stapley S., Neal R.D., Rose P., Walter F.M., Hamilton W.T., 2012. Clinical features of bladder cancer in primary care. *British Journal of General Practice*, Vol.62, pp. 598-604;

Shirai T., Yoshiki T. e Itoh T., 1977. Synthesis of alpha-fetoprotein by human yolk sac tumor transplanted into nude mice. *Gann*, Vol. 68, pp. 847-849;

Shum A.M.Y., Mahendradatta T., Taylor R.J., Painter A.B., Moore M.M., Tsoli M., Tan T.C., Clarke S.J., Robertson G.R., Polly P., 2012. Disruption of MEF2C signaling and loss of sarcomeric and mitochondrial integrity in cancer-induced skeletal muscle wasting. *Journal of Aging Research*, Vol. 4, pp. 133-143;

Simons J.W., 1995. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis. *Critical Reviews in Oncogenesis*, Vol. 6, pp. 261-273;

Stevenson E.J., Giresi P.G., Koncareviz A., Kandarian S.C., 2003. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*, Vol. 551, pp. 33-48;

-T-

Teixeira C., Faustino A., Andrade A., Andrade D., Teixeira J., Arantes R., Vasconcelos-Nóbrega C., Gil da C.R.M., Oliveira P.A., 2013. Colheita da urina e recolha da bexiga em ensaios experimentais de carcinogénese química em roedores. Vila Real, Núcleo Editorial e Gráficos dos SDB;

Tijerina A.J., 2004. The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia. *Dimensions of Critical Care Nursing*, Vol. 23, pp. 237-243;

Tisdale M.J., 1997. Biology of cachexia. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 89, pp. 1763-1773;

Tisdale M.J., 2003. Pathogenesis of cancer cachexia. *Journal of supportive oncology*, Vol. 1, pp. 159-168;

Tsui K.H., Wang S.W., Chung L.C., Feng T.H., Lee T.Y., Chang P.L., Juang H.H., 2013. Mechanisms by Which Interleukin-6 Attenuates Cell Invasion and Tumorigenesis in Human Bladder Carcinoma Cells. *BioMed Research International*, Vol. 2013, pp.11;

Tsujihashi H., Matsuda H., Uejima S., Akiyama T., Kurita T., 1990. The kinetics of cellular proliferation in rat urinary bladder treated with N-butyl-N-(4 hydroxybutyl)nitrosamine. *Journal of Urology*, Vol. 144, pp. 1493-1496;

-V-

Van Cutsem E. e Arends J., 2005. The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. *European Journal of Oncology Nursing*, Vol. 9, pp. 51-63;

Van Zutphen L.F.M., Baumans V. e Beynen A.C., 1993. Modelos animais: Principios de la ciencia del animal de laboratorio. Sweden, Harlan;

Vasconcelos-Nóbrega C., Colaço A., Lopes C., Oliveira P.A., 2012. BBN as a urothelial carcinogen. *In vivo*, Vol. 26, pp. 727-739;

Von Haehling S. e Anker S.D., 2010. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *Journal of Cachexia Sarcopenia Muscle*, Vol. 1, pp. 1-5;

-W-

Wang X., Pickrell A.M., Zimmers T.A., Moraes C.T., 2012. Increase in muscle mitochondrial biogenesis does not prevent muscle loss but increased tumor size in a mouse model of acute cancer-induced cachexia. *Plos One*, Vol. 7, pp. 1-6;

Wanibuchi H., Yamamoto S., Chen H., Yoshida K., Endo G., Hori T., Fukushima S., 1996. Promoting effects of dimethylarsinic acid on N-butyl-iV- (4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, Vol. 17, pp. 2435-2439;

Warnock L.G., Stone W.J. e Wagner C., 1974. Decreased aspartate aminotranferase ("SGOT") activity in serum of uremic patients. *Clinical Chemistry*, Vol. 20, pp. 1213-1216;

White J.P., Baynes J.W., Welle S.L., Kostek M.C., Matesic L.E., Sato S., Carson J.A., 2011. The Regulation of Skeletal Muscle Protein Turnover during the Progression of Cancer Cachexia in the Apc (Min/ +) Mouse. *Plos One*, Vol. 6, pp. 1-17;

-Y-

Yang F., Bian C., Zhu L., Zhao G., Huang Z., Huang M., 2007. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *Journal of Structural Biology*, Vol. 157, pp. 348-355;

Yoshida S., Saito K., Koda F., Yokoyama M., Kageyama Y., Masuda H., Kobayashi T., Kawakami S., Kihara K., 2007. C-reactive protein level predicts prognosis in patients with muscle-invasive bladder cancer treated with chemoradiotherapy. *BJU INTERNATIONAL*, Vol. 101, pp. 978-981;

Younes R.N. e Noguchi Y., 2000. Pathophysiology of cancer cachexia. *Journal of the hospital clinics*, Vol. 55, pp. 181-193;

-Z-

Zhou M., Lin B.Z., Coughlin S., Vallega G., Pilch P.F., 2000. UCP3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *American Journal of Physiology*, Vol. 279, pp. 622-629;