

AMANDA POCOL CARNIATO

**"Vias de Sinalização dos Receptores Toll-Like e
p53 Regulam a Angiogênese e Apoptose no Câncer
de Bexiga Não-Músculo Invasivo: Efeitos do
Imunomodulador P-MAPA"**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



AMANDA POCOL CARNIATO

**"Vias de Sinalização dos Receptores Toll-Like e p53
Regulam a Angiogênese e Apoptose no Câncer de
Bexiga Não-Músculo Invasivo: Efeitos do
Imunomodulador P-MAPA"**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Amanda Pocol Carniato

e aprovada pela Comissão julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural do Instituto
de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Tecidual.

Orientador: Dr. Wagner José Fávaro
Coorientador: Dr. Patrick Vianna Garcia

A handwritten signature in blue ink, reading "Wagner José Fávaro".

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C217v Carniato, Amanda Pocol, 1988-
Vias de sinalização dos receptores toll-like e p53 regulam a angiogênese e apoptose no câncer de bexiga não-músculo invasivo : efeitos do imunomodulador P-MAPA / Amanda Pocol Carniato. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Wagner José Fávaro.

Coorientador: Patrick Vianna Garcia.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neoplasias da bexiga. 2. Receptores toll-like. 3. Imunomodulação. 4. BCG. 5. P-MAPA. I. Fávaro, Wagner José. II. Garcia, Patrick Vianna, 1978-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Signaling pathways of toll-like receptors and p53 regulate the angiogenesis and apoptosis in bladder cancer non-muscle invasive : effects of immunomodulator P-MAPA

Palavras-chave em inglês:

Bladder neoplasms

Toll-like receptors

Immunomodulation

BCG

P-MAPA

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Wagner José Fávaro [Orientador]

Wellerson Rodrigo Scarano

André Fattori

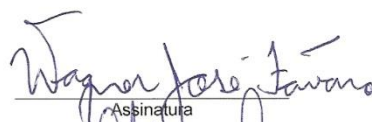
Data de defesa: 21-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 21 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

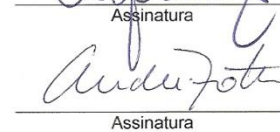
Dr. Wagner José Fávaro (Orientador)


Assinatura

Dr. Wellerson Rodrigo Scarano


Assinatura

Dr. André Fattori


Assinatura

Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza

Assinatura

Dr. Wagner Eduardo Matheus

Assinatura

Introdução: A alta recorrência do câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) pode estar relacionada aos baixos efeitos das atuais terapias sobre os receptores *Toll-like* (TLRs) e a angiogênese. Atualmente, a terapia utilizada contra o CBNMI é a imunoterapia com BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) associada com a ressecção transuretral. Entretanto, a utilização do BCG está associada a efeitos colaterais, desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave. Nesse contexto, uma nova perspectiva é representada pelo imunomodulador P-MAPA (agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio). **Objetivos:** Os objetivos deste estudo foram caracterizar os efeitos da ativação dos mediadores das vias de sinalização dos TLRs 2, 4 (MyD88, IKK α , NF-kB, TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ), INOS e p53 na regulação do processo de angiogênese (VEGF e endostatina) e apoptose (BAX) frente ao uso do P-MAPA e BCG no CBNMI. **Materiais e Métodos:** Para a indução do CBNMI, 30 animais Fischer 344 induzidos quimicamente com uma dose intravesical de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) a cada 15 dias, totalizando 4 doses. Outros 10 animais Fischer 344 que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle**. Duas semanas após a indução, os animais foram divididos em 3 grupos e tratados semanalmente por 6 semanas consecutivas via intravesical: **Grupo Controle:** 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% ; **Grupo MNU (Câncer):** mesmo tratamento que o grupo Controle; **Grupo MNU-BCG:** 10⁶ UFC – 40 mg de BCG; **Grupo MNU-P-MAPA:** 5 mg/Kg de P-MAPA. Após tratamento os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas e *Western Blotting*. **Resultados:** O MNU demonstrou-se efetivo na indução do CBNMI, caracterizando carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero (pTa), carcinoma *in situ* (pTis) e metaplasia escamosa. O grupo MNU-P-MAPA apresentou recuperação histopatológica em 100% dos animais, não apresentando alterações neoplásicas, enquanto que o grupo MNU-BCG recuperou apenas 60% dos animais. Os níveis proteicos para TLR2 e TLR4, dos intermediários da via de sinalização não-canônica (TRIF, IRF-3, IFN- γ), p53 e BAX foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA em relação aos demais grupos experimentais. Sendo que para os intermediários da via de sinalização canônica (MyD88, IKK α , NF-kB, TNF- α , IL-6) foram maiores no grupo MNU-BCG. Os níveis proteicos de

iNOS estiveram aumentados em ambos os tratamentos MNU-BCG e MNU-P-MAPA. E para VEGF, os níveis foram significativamente aumentados nos grupos MNU e MNU-BCG em relação aos demais grupos experimentais. Em contraste, a endostatina mostrou-se reduzida no grupo MNU e aumentada no grupo MNU-P-MAPA. **Conclusão:** Assim, pode-se concluir que a imunoterapia com P-MAPA promoveu distinta ativação do sistema imune inato mediada por TLRs 2 e 4 em relação ao BCG, resultando no aumento da via de sinalização para interferons, morte celular imunogênica, além da restauração dos níveis proteicos de p53 induzindo a apoptose e desaceleração do processo de angiogênese. A ativação da via de sinalização para interferons se correlacionou com a significativa melhora do CBNMI e ocorrência de apoptose.

ABSTRACT

Introduction: The high recurrence of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) may be related to the low effect of the current therapies about receptors Toll-like (TLRs) and angiogenesis. Currently, the therapy used against the NMICB is the immunotherapy with BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) associated with the transurethral resection. However, the use of BCG is associated to side effects, since symptoms irritative mild to severe systemic reaction. In this context, a new perspective is represented by the immunomodulatory P-MAPA (polymeric aggregate anidrido phospholipoleate-palmitoleate ammonium and magnesium). **Aims:** The aims of this study were characterize the effects of activation of mediators of signaling pathways of TLRs 2, 4 (MyD88, IKK α , TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) and p53 in regulating the process of angiogenesis (VEGF, HIF, Endostatin) and apoptosis (BAX) compared to using P-MAPA and BCG in the NMIBC. **Materials and Methods:** For NMIBC induction, 30 Fischer 344 animals were chemically induced with intravesical dose of 1.5 mg / kg of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) every 15 days, totaling 4 doses. Another 10 Fischer 344 animals that not received MNU were considered as **Control Group**. Two weeks after induction, the animals were divided into 3 groups and treated intravesically for 6 consecutive weeks: **Control Group:** 0.3 ml of 0.9% saline; **MNU Group (Cancer):** same treatment as the Control group; **BCG-MNU Group:** 10⁶ UFC - 40 mg of BCG; **MNU-P-MAPA group:** 5 mg/kg P-MAPA. After treatment, the animals were euthanized and the urinary bladders collected and subjected to histopathological, immunohistochemical and Western blotting analyzes. **Results:** The MNU demonstrated to be effective in inducing NMIBC, presenting undifferentiated tumor, featuring carcinoma with invasion of the lamina propria (pT1), papillary (pTa), carcinoma in situ (PTis) and squamous metaplasia. The MNU-P-MAPA group presented histopathological recovery in 100% of animals showing no neoplastic alterations, while MNU-BCG group recovered only 60% of animals. Protein levels of TLR2 and TLR4, the intermediary of non-canonical signaling pathway (TRIF, IRF-3, IFN- γ), p53 and BAX were significantly higher in MNU-P-MAPA group compared to other experimental groups. Whereas the intermediate canonical signaling pathway of TLRs (MyD88, IKK α , TNF- α , IL-6) were higher in MNU-BCG group. Protein levels of iNOS were high in both MNU-BCG and MNU-P-MAPA treatment groups. Protein levels for VEGF and HIF were significantly increased in MNU and MNU-BCG

group compared to the other experimental groups. In contrast, endostatin was reduced in MNU group and increased in the MNU-P-MAPA group. **Conclusion:** Thus, it can be concluded that immunotherapy with P-MAPA promoted distinct activation of the innate immune system mediated by TLRs 2 and 4 compared to BCG, resulting in increased signaling pathway for interferon, immunogenic cell death, in addition to restoration of p53 protein levels that leads to apoptosis and slowing the process of angiogenesis. The activation of the signaling pathway for interferon correlated with significant improvement NMIBC and the occurrence of apoptosis.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	21
1.1- <i>Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)</i>	21
1.2- <i>Via de Sinalização dos Receptores Toll Like (TLR), NF-κB, p53 e BAX</i>	23
1.3- <i>Regulação da Angiogênese</i>	27
1.4- <i>Imunoterapias no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo</i>	29
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
3- MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1- <i>Animais e Procedimento Experimental</i>	35
3.2- <i>Análises Histopatológicas</i>	36
3.3- <i>Imunohistoquímica da Via de Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK-α, NF-κB, TNF-α, IL-6, TRIF, IRF-3, IFN-γ, iNOS) e Apoptose (BAX)</i>	36
3.4- <i>Extração de Proteínas e Análises de Western Blotting para a Via de Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK-α, NF-κB, TNF-α, IL-6, TRIF, IRF-3, IFN-γ, iNOS) e P53 na Regulação da Angiogênese (VEGF e Endostatina) e Apoptose (BAX)</i>	37
3.5- <i>Análises Toxicológicas</i>	38
3.6- <i>Análises Estatísticas</i>	39
4- RESULTADOS	40
4.1- <i>Análises Histopatológicas</i>	40
4.2- <i>Imunohistoquímica e Análises de Western Blotting para a Via de</i>	

<i>Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK-α, NF-κB, TNF-α, IL-6, TRIF, IRF-3, IFN-γ, iNOS) e P53 na Regulação da Angiogênese (VEGF e Endostatina) e Apoptose (BAX)</i>	41
<i>4.3- Análises Toxicológicas</i>	43
5- DISCUSSÃO	45
6- TABELAS E FIGURAS	52
7- CONCLUSÕES	61
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9- ANEXOS	70

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe, **Ana Maria**

por sempre acreditar em mim mais do que eu mesma, por vezes dizendo “nem vou esquentar a cabeça, pois eu sei que você é capaz e vai ser fchinha resolver”,
por sempre ser a primeira pessoa a quem recorro em momentos difíceis, pois o conforto é garantido com horas de conversas, pelo amor e cuidados de mãe que não tem igual.

À minha irmã **Roberta**,

Cunhado **Ricardo**

e sobrinha **Rubia**

por sempre estarem de braços abertos à me receber e quando eu mais precisei de apoio eles vieram até mim só pra me dar um abraço e dizer que estavam comigo para o que der e vier.
Roberta, nós brigamos por que somos diferentes, mas continuamos unidas por que nos amamos.

Ao meu companheiro **Igor**,

que sempre está ao meu lado nas horas boas ou ruins, compartilhando ideias, sonhos e planos
quantas vezes ele não precisou ficar falando por horas e horas até eu me acalmar, enquanto só ouvia meu choro do outro lado.
Sem o seu apoio eu não teria conseguido enfrentar todos os obstáculos.

À família **Rocha**,

pelo amor, carinho e por terem me adotado como parte da família...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner José Fávaro, por ter me acolhido em seu laboratório em um momento tão difícil na minha vida acadêmica, pela credibilidade, pelos conselhos, amizade, pela paciência nos momentos críticos e pela inestimável convivência. Muito Obrigada,

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Patrick Garcia Vianna, pelo carinho, amparo, amizade, paciência, puxões de orelha, profissionalismo e dedicação que demonstrou em minha vida acadêmica,

Ao Dr. Iseu Nunes pelo auxílio, inestimável contribuição científica para a execução desse trabalho, além disso, por ser bom companheiro de estrada sempre trazendo consigo acepipes.

A Farmabrilis por fornecer o inovador imunomodulador P-MAPA, que será a arma da sociedade na luta contra o câncer.

Aos amigos do laboratório LCURGIM – que sempre me ajudaram no cotidiano do laboratório trabalhando em parceria e pelas conversas nos momentos de descontração acompanhados de um bom cafezinho.

A secretária e amiga Lílian, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis, pela prontidão, por toda sua paciência e compreensão e por sempre estar se desdobrando para nos ajudar.

A Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini pelo apoio ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia/Unicamp, permitindo acesso ao conhecimento.

Ao Programa de Aperfeiçoamento Científico (Cnpq), Capes e Fapesp pelo suporte financeiro,

As amigas Stephanie, Rosária, Karina, Beatriz e Sophia por serem ótimas ouvintes, sempre prontas para ouvir minha choradeira e ainda ter paciência pra me aconselhar, pelo apoio, amizade, companheirismo, risadas, e pelos bons momentos da minha vida que compartilhei com vocês nesta caminhada,

Ao amigo Felipe pelo seu jeito de ser, que sempre alegra o dia daqueles que te cercam e por compartilhar seu ponto de vista que sempre me traz clareza das situações. E ao Henrique, pelos conselhos, sinceridade e carinho que me foram oferecidos em momentos difíceis e de alegria.

EPÍGRAFE

Mãe

Tome este fruto, que por direito, é seu
Por toda a minha vida você foi minha raiz, posso passar por
qualquer turbilhão, que ainda continuo em pé
Por toda a minha vida você foi a minha copa, o sol pode ser mais
esquente, que eu ainda continuo protegida em sua sombra fresca
Por toda a minha vida você foi o meu florescer, ao meu redor pode
ser o ambiente mais insalubre, que eu ainda continuo vendo a
beleza do mundo em suas flores

E se um dia você vier a me faltar, não se preocupe com os turbilhões, sol
esquente e insalubridade, pois você será o adubo que me fortalecerá.

ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BCG	Bacillus Calmette – Guerin
Bcl2	<i>B – cell – lymphoma – 2</i>
CB	Câncer de bexiga urinária
CBNMI	Câncer de bexiga não-músculo invasivo
CFU-GM	Colônia de granulócitos/macrófagos
EGFR	Fator de crescimento epidermal
ERKs	Proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GMCSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
HIF	Fator transcricional indutor de hipóxia
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IFN	Interferon
IκB	Inibidores NF-κB
IKKs	Proteínas quinases IκB
IL	Interleucinas
JNKs	Proteínas quinases c-jun-N-terminal
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MNU	N-metil-N-nitrosureia
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NF-κB	Fator de transcrição nuclear
NK	<i>Natural Killer</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
P-MAPA	Agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio
RTU	Ressecção transuretal
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLRs	Receptores de toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	Adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon B
TIRAP	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O câncer de bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012; ZHANG et al., 2012; HOWLANDER et al., 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, 70 mil novos casos de CB foram diagnosticados nos Estados Unidos em 2011 (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Mais de 70% da incidência de CB é superficial (pTis, pTa e pT1), tumor não-músculo invasivo (CBNMI), e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (KROFT; OYASU, 1994; MONTIRONI; LOPEZ-BELTRAN, 2005; REIS et al., 2009; ASKELAND et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Contudo, 50% dos CBNMI recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (SHIMADA et al., 2011; ASKELAND et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. O tabagismo é um dos maiores fatores de risco, o qual é responsável por um terço dos casos de CB (ZEEGERS et al., 2000). A fumaça do cigarro de tabaco contém cerca de 4.700 substâncias químicas, muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos *N-nitroso* e aminas aromáticas (GRIMMER et al., 2000). A urina dos fumantes tem mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada com os compostos encontrados na urina de não-fumantes (GRIMMER et al., 2000).

O estudo do CBNMI tem sido amplamente abordado utilizando-se diversos modelos experimentais, dentre eles, modelos de linhagens celulares uroteliais provenientes de roedores que são facilitados pela acessibilidade do tecido e pela pronta transformação espontânea destas células comparadas às humanas. No entanto, a relevância clínica dos achados derivados destes modelos necessita de validação em modelos *in vivo* (BOHLE; BRANDAU, 2003; CRALLAN; GEORGOPOULOS; SOTHGATE,

2006). Os modelos animais para carcinogênese de bexiga apresentam características semelhantes ao CBNMI desenvolvido em humanos (REIS et al., 2009). A estrutura e função do trato urinário inferior de roedores são semelhantes à dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CBNMI, sugerindo que os roedores servem como modelo experimental para o CBNMI (WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008).

A carcinogênese urotelial em roedores sofre uma sequência de alterações morfológicas, iniciando como hiperplasia simples seguida de hiperplasia nodular e papilar (OLIVEIRA et al., 2006), progredindo posteriormente para papiloma e, ocasionalmente, carcinomas não-invasivos e, finalmente, a neoplasias invasivas (OYASU, 1995; COHEN, 2002). Muitos tumores exofíticos induzidos em ratos são polipóides, geralmente pedunculados e com um padrão de crescimento papilar invertido (OYASU, 1995; COHEN, 2002). A hiperplasia nodular em camundongos é consideravelmente mais comum do que as proliferações papilíferas, ocorrendo com certa frequência com ausência completa de hiperplasia papilar (FUKUSHIMA et al., 1981).

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos no período de algumas semanas de tratamento com doses baixas de carcinógenos químicos (REIS et al., 2009) que são instilados diretamente na bexiga dos animais (CRALLAN; GEORGOPOULOS; SOTHGATE, 2006). Em 1972, Hicks & Wakefield utilizaram 4 doses de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) para rápida indução de CBNMI em ratos, demonstrando que este é um carcinógeno completo. Estes mesmos autores demonstraram que altas concentrações de MNU induziram lesão citotóxica no urotélio, a qual induziu a resposta inflamatória, com rápida proliferação, acúmulo e perpetuação de mutações (HICKS; WAKEFIELD, 1972; CRALLAN; GEORGOPOULOS; SOTHGATE, 2006). O MNU, um composto genotóxico, pode atuar como iniciador e promotor da neoplasia causando persistente metilação do DNA (KUNZE et al., 1989; STEINBERG et al., 1990). Além disso, o MNU é o único carcinógeno conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica (KUNZE et al., 1989; STEINBERG et al., 1990). Posteriormente, este modelo foi modificado e reproduziu tumores de bexiga que são clinicamente observados em humanos, os quais tiveram origem exclusiva no urotélio, foram espontâneos e não-implantados e histologicamente equivalentes ao carcinoma de células transicionais (PERABO et al., 2005; REIS et al., 2009).

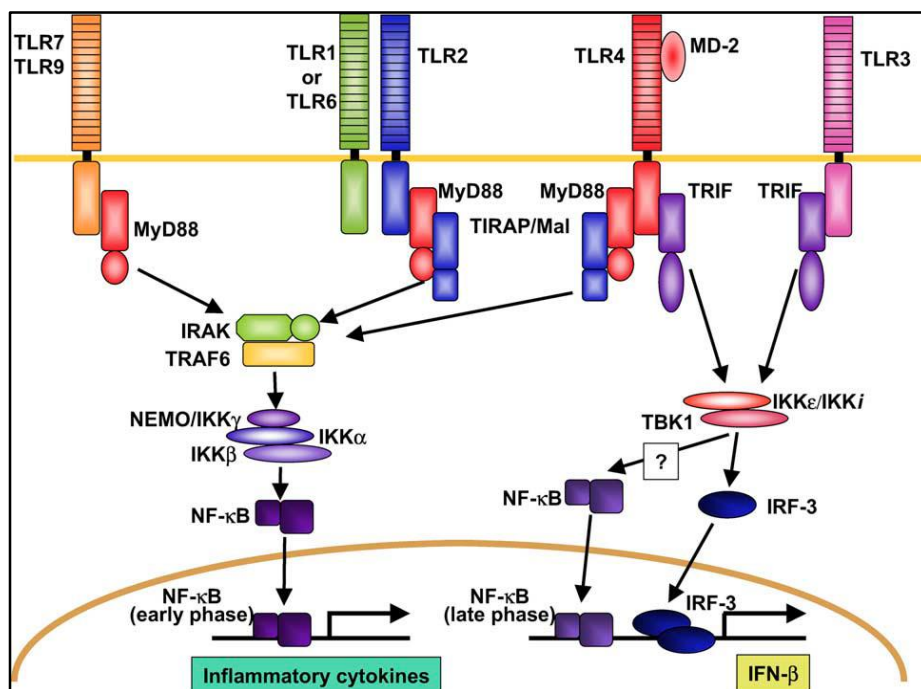
1.2 – Via de Sinalização dos Receptores Toll Like (TLR), NF- κ B, p53 e BAX

Os receptores de *toll-like* (TLRs) pertencem a uma família de receptores transmembranar que reconhecem padrões moleculares conservados de origem microbiana que são conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) (SRIKRISHNA; FREEZE, 2009; GALLI et al., 2010; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Também, os TLRs têm um papel fundamental na reparação tecidual e lesão tecidual induzida por inflamação (AKIRA; TAKEDA, 2004; GALLI et al., 2010). Neste contexto, os ligantes de TLRs podem ser derivados microbianos ou hospedeiros endógenos (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; GALLI et al., 2010;). TLRs que reconhecem lipídios e proteínas ligantes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6) estão expressos na membrana plasmática, enquanto TLRs que detectam ácidos nucleicos virais (TLR3, TLR7 e TLR9) estão localizados em compartimentos lisossomais (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004; GALLI et al., 2010).

A sinalização dos TLRs induz a ativação dos genes de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL) 6, IL-1 β e IL-12, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas e macrófagos. Coletivamente, cada TLR recruta uma combinação específica de moléculas adaptadoras para ativar diferentes fatores de transcrição que darão origem à resposta apropriada e efetiva contra o patógeno estimulador (AKIRA; TAKEDA, 2004; GALLI et al., 2010). A transdução de sinais dos TLRs ocorre através de diferentes proteínas adaptadoras, as quais desencadeiam uma cascata de sinalização envolvendo o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs) e os fatores regulatórios de interferon (IRF3, IRF5 e IRF7) (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). Muitos dos efeitos conhecidos da sinalização dos TLRs ocorrem através da translocação do NF- κ B e subsequente produção de moléculas inflamatórias e moléculas para sobrevivência celular, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004; GALLI et al., 2010). A função clássica dos TLRs consiste no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados com posterior indução de respostas imunes adaptativas (AKIRA; TAKEDA, 2004; GALLI et al., 2010). A ativação de TLRs na superfície das células epiteliais induz a expressão de moléculas de

adesão intercelular (ICAM), as quais desempenham um papel fundamental na implantação e adesão de leucócitos (GALLI et al., 2010).

O reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs estimula o recrutamento de proteínas adaptadoras que possuem domínios TIR (Toll/IL-1 receptor) em sua estrutura para interagir com o domínio TIR intracelular dos TLRs (**Esquema 1**) (TAKEDA; AKIRA, 2004). As moléculas adaptadoras envolvidas na sinalização dos receptores TLRs são: fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon B (TRIF), molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) (**Esquema 1**) (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). A proteína MyD88 é utilizada por todos os TLRs, a exceção do TLR3, e ativa NF- κ B e as vias das MAPKs para induzir a produção de citocinas inflamatórias (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). TLR3 e TLR4 utiliza a molécula adaptadora TRIF para sinalizar a produção de interferon e citocinas inflamatórias via ativação dos fatores de transcrição, IRF3 e NF- κ B, respectivamente (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). TRAM e TIRAP são moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e pelo TLRs 2 e 4 para recrutar MyD88, respectivamente (**Esquema 1**) (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). Assim, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas: via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de citocinas inflamatórias e via dependente de TRIF (via não-canônica) para a produção de interferon (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004). TLR4 é o único receptor que utiliza as quatro moléculas adaptadoras (MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM) para desencadear sua sinalização (**Esquema 1**) (AKIRA; TAKEDA, 2004; TAKEDA; AKIRA, 2004).



Esquema 1: Via de sinalização dos TLRs (Takeda & Akira, 2004)

Os TLRs foram, inicialmente, identificados somente em células imunes e epiteliais, contudo estudos recentes demonstraram que estes receptores também são expressos em algumas células tumorais, sendo que essa expressão está relacionada à carcinogênese (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2009; GALLI et al., 2010). O papel dos TLRs no câncer é uma questão controversa, pois dados conflitantes apontam os TLRs como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese. A administração de agonistas dos TLRs exerceu fortes efeitos antineoplásicos contra tumores desenvolvidos em camundongos e humanos (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2009).

A via de sinalização do NF-κB desempenha um papel importante nas respostas ao câncer, inflamação e estresse (PAHL, 1999; MENG et al. 2010). NF-κB é um fator de transcrição encontrado no citoplasma ligado aos chamados inibidores de NF-κB (IκB). A ativação do NF-κB por fatores de crescimento e inflamatórios é mediada através das proteínas quinases IκB (IKKS), que fosforilam IκB, resultando na ubiquitinação IκBα e subsequente degradação proteossômica (**Esquema 1**) (PAHL, 1999; PIKARSKY et al., 2000; MENG et al. 2010). Como consequência, o NF-κB é liberado do complexo IκB e se transloca para o núcleo, onde se liga em sítios consenso do DNA, ativando a expressão gênica (PAHL, 1999; PIKARSKY et al., 2004). A ampla distribuição dos sítios de ligação do

NF- κ B no genoma permite regular um vasto número de genes e participar em processos celulares fundamentais, tais como apoptose, proliferação e diferenciação (PHAM et al., 2004; LUO; KAMATA; KARIN, 2005). O NF- κ B responde a várias moléculas, como IL-1, TNF- α , citocromo P450, melatonina e metaloproteinases de matriz (MMPs) (PHAM et al., 2004; LUO; KAMATA; KARIN, 2005).

A p53 é uma proteína citoplasmática codificada pelo gene TP53 (localizado no braço curto do cromossomo 17) (LU et al., 2002; SHARIAT et al., 2009; NETTO, 2011). Esta proteína é de fundamental importância, pois é responsável por regular o ciclo celular, além de ser supressora tumoral (LU et al., 2002; SHARIAT et al., 2009; NETTO, 2011). Estudos de sequências promotoras de resposta ao gene TP53 sugerem um papel geral desse como regulador dos danos ao DNA e no controle da expressão gênica dos TLRs (MENENDEZ et al., 2011). A maioria dos genes TLR responde ao p53 por via canônica, bem como pelos sítios promotores de ligação não-canônicos (MENENDEZ et al., 2011). A p53 possui diversos mecanismos antitumorais, tais como: ativação de proteínas de reparo do DNA, quando este se encontra mutado; induzir a apoptose se o dano ao DNA for irreparável; controle do crescimento celular quando há dano ao DNA, interrompendo o ciclo celular na fase G1/S; e inibição de angiogênese (LU et al., 2002; SHARIAT et al., 2009; NETTO, 2011). Diferentes trabalhos demonstraram que mutações no gene TP53, com consequente acúmulo da proteína p53 nos núcleos das células tumorais uroteliais, estão relacionadas à uma maior taxa de recorrência da neoplasia e diminuição da sobrevida dos pacientes acometidos por esse tipo de câncer (LU et al., 2002; SHARIAT et al., 2009; NETTO, 2011).

Muitos dos sinais que induzem a apoptose convergem para a mitocôndria. Membros da família de proteínas BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*) formada por mais de 20 proteínas, regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria podendo ser, tanto pró-apoptóticos como por exemplo o BAX como antiapoptóticos no caso do Bcl-2 (FABREGAT; RONCERO; FERNÁNDEZ, 2007).

A p53, quando ativada devido a algum estresse, pode induzir a apoptose aumentando a expressão da proteína pró-apoptótica BAX e interagir diretamente com BAX, provocando-lhe alterações conformacionais e assim tornando se possível sua completa inserção na membrana externa da mitocôndria e oligomerização. A partir deste momento, BAX passa a constituir canais de saída de proteínas que se encontram aprisionadas entre as membranas da mitocôndria para o citoplasma, incluindo o

citocromo-c. Estas proteínas liberadas devido à permeabilização da membrana externa da mitocôndria, participam na ativação de uma família de proteases de cisteína chamadas caspases, que desmontam a célula através da degradação de proteínas reguladoras e estruturais fundamentais (GALLUZZI et al., 2008; LANDES; MARTINOU, 2011).

1.3 – Regulação da Angiogênese

A angiogênese é definida como o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes dependentes da proliferação e migração das células endoteliais, sendo assim, possui um importante papel no crescimento e desenvolvimento corporal, cicatrização de feridas e na tumorigênese (SHIBUYA; CLAESSEON-WELSH, 2006).

Em condições normais, as células endoteliais estão quiescentes, permanecendo com um fenótipo não angiogênico e controladas por uma rede de fatores pró e antiangiogênicos (CHARLESWORTH; HARRIS, 2006). Entretanto, esta regulação pode sofrer alterações decorrentes de algum tipo de estresse metabólico (hipóxia, acidose, hipoglicemia), força mecânica (crescimento celular) e ativação do sistema imune, desencadeando a formação de novos vasos (STREETER; HARRIS, 2002).

O processo de angiogênese é essencial para a sobrevivência, proliferação e potencial metastático de tumores malignos (FOLKMAN, 2006). O microambiente tumoral é caracterizado por uma flutuação de hipóxia concomitante a uma privação de nutrientes o que desencadeia o aumento das adaptações genéticas e epigenéticas, bem como ao aumento da invasividade e metástase (SEMENZA, 2003; KIMBRO; SIMONS, 2006). Por sua vez, essas adaptações hipóxicas conferem aos tumores maior resistência às terapias atuais (SEMENZA, 2003; KIMBRO; SIMONS, 2006). Parte desta adaptação é a regulação de genes em resposta a hipóxia. Relata-se que em câncer renal o fator transcricional indutor da hipóxia (HIF) aparece aumentado e induz a transcrição de genes envolvidos na angiogênese além dos genes envolvidos em participar do metabolismo da glicose, da adesão celular, da migração celular, da proteólise, regulação do pH e proliferação celular (CHARLESWORTH; HARRIS, 2006).

Segundo Ravi et al. (2000), a p53 inibe a expressão induzida por hipóxia de HIF-1 ao facilitar a ubiquitinação e subsequente degradação da subunidade HIF-1 α , portanto, a perda da atividade ou mutações em p53, resulta na perda da regulação de HIF-1, levando

ao aumento na expressão de VEGF, contribuindo para a aquisição da capacidade angiogênica em células cancerosas.

Experimentos indicam que a urina de pacientes com câncer urotelial contém um aumento de moléculas pró-angiogênicas (CHODAK et al., 1988; NGUYEN et al., 1994) como, por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que se liga com seus receptores nas células endoteliais e estimula a proliferação, migração e permeabilidade endotelial (FONG et al., 1995).

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular, que tem sido observada em tumores com potencial metastático e, além disso, estão relacionadas com a liberação do fator de crescimento fibroblástico (FGF) (BROWN; BICKNELL, 2001), sendo que este estimula a proliferação endotelial, induz alteração na regulação das proteínas responsáveis pela interação célula-célula (PRESTA et al., 2005) e agem sinergisticamente com VEGF (CROSS; CLAEISSON-WELSH, 2001). Outros exemplos de moléculas pró-angiogênicas são a interleucina 8 (IL-8), que está envolvida na regulação de MMP-2 e atua sobre as células endoteliais (LUCA et al., 1997) e o fator de crescimento epidermal (EGF), que é uma oncoproteína que regula a atividade de VEGF, IL-8, FGF e MMPs (MENDELSON, 2002).

A angiogênese é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento da maioria dos tipos de cânceres, pois na ausência da vascularização os tumores sólidos crescem apenas 1 a 2 mm (ABDOLLAHI et al., 2003; FOLKMAN, 2006). Assim, os inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para atingir as células endoteliais vasculares e bloquear a formação de novos vasos para impossibilitar a progressão do tumor, uma vez que essas células são geneticamente estáveis e, portanto, menos propensas a acumular mutações que lhes permitiria desenvolver resistência a fármacos (ABDOLLAHI et al., 2003; FOLKMAN, 2006).

Os inibidores da angiogênese são divididos em inibidores diretos e indiretos, sendo que os diretos atuam nas células endoteliais impedindo-as de responder aos estímulos pró-angiogênicos, enquanto os inibidores indiretos interferem na comunicação pró-angiogênica entre as células tumorais e as células endoteliais (FOLKMAN; HAHNFELDT; HLATKY, 1998). O efeito indireto pode ser alcançado por inibição da expressão dos fatores angiogênicos como VEGF e FGF no tumor ou bloqueio da expressão e/ou da ativação dos receptores dos fatores pró-angiogênicos nas células

endoteliais, por exemplo, bloqueando o receptor do VEGF (FOLKMAN; HAHNFELDT, P.; HLATKY, 1998). A endostatina é um inibidor direto da angiogênese, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos, além do fato de que induz a apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (O'REILLY et al. 1997; SCHMIDT; ADDICKS; BLOCH, 2004), sendo, portanto, uma potente substância antitumoral.

Apesar de p53 poder suprimir a angiogênese tumoral, instruindo células tumorais para degradar HIF-1 α ou diminuir a expressão de VEGF, quando p53 ativa o gene para α (II)PH, o que resulta na liberação extracelular de endostatina, todo um programa antiangiogênico é acionado por endostatina. Simultaneamente, a endostatina é capaz de interferir nas vias de sinalização, tanto inibindo vias pró-angiogênicas como estimulando vias antiangiogênicas (FOLKMAN, 2006).

1.4 – Imunoterapias no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

O tratamento primário do CBNMI baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral (RTU), seguido da imunoterapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), para diminuição da recidiva e prevenção da progressão tumoral (ASKELAND et al., 2012). Morales & Eidinger (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CB superficial de alto risco, sendo considerada atualmente a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (BOHLE; BRANDAU, 2003).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical. Citocinas como TNF- α , fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN) e ILs induzem resposta de linfócitos T-helper e das células NK na bexiga (BOHLE; BRANDAU, 2003). POOK, ESUVARANATHAN e MAHENDRAN (2002) demonstraram que células tumorais do CBNMI que internalizaram BCG apresentaram diminuição celular de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes mesmos autores verificaram que a combinação de BCG e o antioxidante *N-acetilcisteína* causou significativa redução de EROs e aumento da citotoxicidade nas células cancerosas

e sugeriram que os efeitos não-imunológicos do BCG podem determinar a resposta antitumoral. Na literatura especializada, dúvidas persistem com relação aos efeitos da imunoterapia com BCG e a sinalização dos TLRs no CBNMI.

O uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (BOHLE; BRANDAU, 2003; WALSH et al., 2007).

Dessa forma, tratamentos alternativos utilizando subfrações não viáveis de bactérias, dentre elas os superantígenos, e o uso do agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA) têm sido propostos com resultados promissores (DURÁN; NUNES, 1990; DURÁN et al., 1997; PERABO et al., 2005; FÁVARO et al., 2012).

O P-MAPA é um biopolímero não-linear, com massa molecular de 320 kDa (DURÁN; NUNES, 1990; DURÁN et al., 1997). Os principais componentes da molécula são Mg^{2+} , NH_4^+ , fosfato, ácidos linoleicos e palmitoleico e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da seguinte maneira: Asp 7,19%; Thr 3,56%; Ser 7,56%; Glu 8,53%; Pro 0,5%; Gly 9,69%; Ala 7,46%; Val 1,0%; Met 4,38%, Isoleu 2,54%, Leu 3,03%, Tyr 0,5%, Phe 1,0%, His 2,83%; Lys 3,56%, Trp 1,3% e Arg 35,2% (DURÁN et al., 1997; DURÁN; NUNES, 1990).

Estudos preliminares *in vivo* e *in vitro* indicaram que este imunomodulador mostrou-se capaz de combater doenças infecciosas, virais e alguns tipos de cânceres (DURÁN et al., 1997; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 1999; FÁVARO et al., 2012). Melo, Justo e Queiroz (2001) avaliaram os efeitos do P-MAPA no número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófagos (CFU-GM) na medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* e concluíram que este imunomodulador potencializou os mecanismos imunológicos reguladores das células precursoras da medula óssea, as quais estão envolvidas no controle das alterações provocadas pelo tumor no sistema hemolinfopoiético do hospedeiro. Em modelos animais para o estudo de câncer, o P-MAPA demonstrou capacidade de reverter o estado de imunossupressão causado pelo processo tumoral, estando associado a este efeito um

significativo impacto terapêutico na doença primária ou nos processos metastáticos (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 1999; FÁVARO et al., 2012).

Além disso, outros componentes do P-MAPA como a arginina e seus metabólitos, parecem modular o crescimento de vários tipos de células cancerosas. SINGH, PERVIN e CHAUDHURI (2002) verificaram que este aminoácido é responsável por causar a apoptose de células cancerosas.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A imunoterapia com BCG é a forma mais eficaz de terapia intravesical para a profilaxia da recorrência e progressão do CBNMI. Contudo, a imunoterapia com BCG está frequentemente associada com efeitos adversos locais e/ou sistêmicos, incluindo sepse, além de recorrência tumoral em até 30% dos casos. A incidência de efeitos adversos locais e sistêmicos é significativamente reduzida com a utilização de agentes quimioterápicos. No entanto, a resposta à quimioterapia intravesical é incompleta e a recorrência tumoral é elevada (superior a 80%) em pacientes com doença não-músculo invasiva. Apesar disso, até hoje, não há no mercado nenhum outro medicamento mais eficaz que o BCG. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de CBNMI, que sejam mais eficazes e apresentem menores efeitos adversos que as terapias clássicas, são muito relevantes. Nesta linha, há uma intensa busca pelo desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento do câncer, incluindo o CBNMI.

Em face do papel estratégico dos imunoterápicos e dos avanços dos métodos biotecnológicos para produção de novas moléculas com atividade farmacológica, destaca-se o imunomodulador P-MAPA, que por sua grande versatilidade e mínima citotoxicidade, reveladas através de estudos *in vivo* e *in vitro*, abre uma nova perspectiva para o combate de alguns tipos de cânceres, incluindo o CBNMI. Os estudos iniciais do nosso grupo demonstraram que no tratamento *in vivo* do CBNMI com P-MAPA houve regressão significativa do tumor, indicando um importante efeito antitumoral deste imunomodulador envolvendo a ativação dos TLRs 2 e 4 (FÁVARO et al., 2012).

Outro ponto relevante, é o estudo da interação das diferentes modalidades terapêuticas com os mecanismos de reparo celular envolvendo as vias de sinalização dos TLRs 2 e 4, p53, angiogênese e apoptose, as quais são fundamentais para o entendimento da carcinogênese urotelial. Atualmente as terapias antitumorais consistem no ataque de células em divisão através de quimioterapia e radioterapia. O sucesso do tratamento depende do tipo de câncer, uma vez que cada neoplasia apresenta características particulares de sobrevivência e evasão imune. O estudo da biologia das células cancerosas demonstrou um persistente ambiente imunossupressor ao redor das células transformadas (LIU et al., 2007). Assim, compostos que são capazes de agir como

agonistas dos receptores TLRs podem representar candidatos promissores a serem desenvolvidos como medicamentos contra o câncer. Contudo, os mecanismos de ativação do sistema imune através das vias de sinalização dos TLRs pelo P-MAPA necessitam de elucidação.

A descoberta e desenvolvimento de medicamentos, como o P-MAPA, é um empreendimento de alto risco e de longo prazo de maturação que exige a participação de muitos grupos e instituições de pesquisa para ser bem sucedido. Este processo pode ser auxiliado ou facilitado, pela eventual existência de um ambiente social e econômico que seja estimulador da criação de produtos de base tecnológica, retribuindo a novidade ou utilidade criada. A parceria do nosso grupo de pesquisa com a Farmabrilis, uma organização não governamental sem finalidades lucrativas e uma rede internacional de pesquisas, objetiva construir um ambiente de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos pioneiro e único na América do Sul. Assim, nossa contribuição para o desenvolvimento do P-MAPA é identificar os possíveis mecanismos de ação e seus efeitos biológicos no tratamento do câncer de bexiga urinária.

Considerando a importância de tratamentos alternativos que reduzam as taxas de recorrência, progressão, bem como seu impacto na evolução clínica dos pacientes com CBNMI, os objetivos gerais deste estudo foram caracterizar e comparar os efeitos da ativação dos mediadores das vias de sinalização dos TLRs 2, 4 (MyD88, IKK α , NF- κ B, TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) e p53 na regulação do processo de angiogênese (VEGF, Endostatina) e apoptose (BAX) frente ao uso do P-MAPA e BCG no CBNMI, bem como estabelecer possíveis mecanismos de ação dessas imunoterapias envolvendo essas vias de sinalização. Tais objetivos gerais foram alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterizar a histopatologia do CBNMI de ratos induzidos quimicamente e comparar a progressão tumoral frente às imunoterapias com BCG e P-MAPA;
- b) Caracterizar e comparar os efeitos das imunoterapias com BCG e P-MAPA nas vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 (MyD88, IKK α , NF- κ B, TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) por imunomarcagem e *Western Blotting* no CBNMI de ratos induzidos quimicamente;

- c) Verificar por meio de imunomarcção e *Western Blotting* a relação das vias de sinalização dos TLRs 2 e 4 com o balanço angiogênico e antiangiogênico (VEGF e Endostatina) e apoptose (BAX) frente às imunoterapias com BCG e P-MAPA no CBNMI de ratos induzidos quimicamente, para se possível estabelecer os mecanismos de ação dessas imunoterapias;
- d) Determinar bioquimicamente os possíveis efeitos hepatotóxicos, cardiotóxicos e nefrotóxicos das imunoterapias com BCG e P-MAPA em ratos induzidos quimicamente para o CBNMI.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizadas 40 ratas da linhagem Fischer 344, na faixa etária de 7 semanas, pesando em média 150 gramas, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Para a indução do CBNMI, 30 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/Kg i.p.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/Kg, i.p.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*), mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/Kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - *Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em 0,3 mL de citrato de sódio (1M pH 6,0) a cada 15 dias (semanas 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (FÁVARO et al., 2012). Os outros 10 animais que não receberam MNU foram considerados como **Grupo Controle**. Duas semanas após a última dose de MNU, os animais foram submetidos ao exame de cistografia para avaliar a ocorrência de tumor e, posteriormente divididos em 4 grupos (10 animais cada):

- a) **Grupo Controle**: recebeu semanalmente uma dose intravesical de 0,3 mL de solução fisiológica 0,9% por 6 semanas consecutivas;
- b) **Grupo MNU (Câncer)**: recebeu o mesmo tratamento que o grupo Controle;
- c) **Grupo MNU-BCG**: recebeu semanalmente uma dose intravesical de 10^6 UFC – 40 mgde BCG (*Fundação Atauilpho de Paiva, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*) por 6 semanas consecutivas;
- d) **Grupo MNU-P-MAPA**: recebeu semanalmente uma dose intravesical de 5 mg/Kg de P-MAPA (*Farmabrasilis, São Paulo, Brasil*) por 6 semanas consecutivas.

As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (*Abocath, São Paulo, Brasil*). Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab, Colombo, PR, Brasil*). Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias

coletadas e submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas, *Western Blotting* e toxicológicas.

Os experimentos contidos no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UNICAMP (**protocolo no. 2684-1**).

3.2 – Análises Histopatológicas

A bexiga urinária de 5 animais de cada grupo foi coletada e fixada em Bouin por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em Paraplast Plus (Sigma, *ST. Louis, MO, EUA*). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo *LeicaRM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*) com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (*Zeiss, Munique, Alemanha*). Os diferentes grupos experimentais foram classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (EPSTEIN et al., 1998).

3.3 – Imunohistoquímica da Via de Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK-α, NF-κB, TNF-α, IL-6, TRIF, IRF-3, IFN-γ, iNOS) e Apoptose (BAX)

A bexiga urinária de 5 animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para as análises histopatológicas, foram utilizados para as imunohistoquímicas. A seguir foram obtidos cortes com 5 µm de espessura no micrótomo rotativo *LeicaRM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior bloqueio de reações inespecíficas por incubação em solução de albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos TLR2, TLR4, MyD88, IKK-α, NF-κB, TNF-α, IL-6, TRIF, IRF-3, IFN-γ, iNOS e BAX foram localizados através dos anticorpos primários: policlonal *rabbit* ab13855 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TLR2; monoclonal *mouse* ab30667

(*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TLR4; policlonal *rabbit* ab2064 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para MyD88; policlonal *rabbit* ab38515 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IKK- α ; policlonal *rabbit* ab7970 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para NF- κ B; policlonal *rabbit* ab6671 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TNF- α ; policlonal *rabbit* ab6672 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IL-6; policlonal *rabbit* ab13810 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TRIF; policlonal *rabbit* ab25950 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IRF-3; monoclonal *mouse* 507802 (*Biolegend, San Diego, CA, EUA*) para IFN- γ ; policlonal *rabbit* ab15323 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para iNOS e policlonal *rabbit* ab7977 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para BAX, diluídos em BSA 1% e incubados *overnight* a 4 °C. O *kitADVANCE™ HRP* (*Dako, Carpinteria, CA, EUA*) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kitADVANCE™ HRP* por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (*Zeiss, Munique, Alemanha*).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células uroteliais da bexiga urinária positivas foi examinada em dez campos para cada anticorpo com aumento de 400x. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células uroteliais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células uroteliais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células uroteliais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células uroteliais positivas (REIS et al., 2012).

3.4 – Extração de Proteínas e Análises de Western Blotting para a Via de Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK- α , NF- κ B, TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) e P53 na Regulação da Angiogênese (VEGF e Endostatina) e Apoptose (BAX)

A bexiga urinária foi coletada de 5 animais de cada grupo experimental, congelada e, posteriormente, submetida às análises de *Western Blotting*. As bexigas urinárias foram homogeneizadas em tampão de extração contendo, Triton-x-1%, NaCl 150mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, Hepes 1mM pH 7,6, PMSF 0,2 mM e 10 μ L/mL de coquetel inibidor de proteases (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*). Os extratos das bexigas urinárias

foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, através do micrométodo de *Bradford*. O correspondente a 70 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Ge Helthcare, Alemanha). As membranas foram bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários: policlonal *rabbit* ab13855 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TLR2; monoclonal *mouse* ab30667 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TLR4; policlonal *rabbit* ab2064 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para MyD88; policlonal *rabbit* ab38515 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IKK- α ; policlonal *rabbit* ab7970 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para NF- κ B; policlonal *rabbit* ab6671 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TNF- α ; policlonal *rabbit* ab6672 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IL-6; policlonal *rabbit* ab13810 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para TRIF; policlonal *rabbit* ab25950 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para IRF-3; monoclonal *mouse* 507802 (*Biolegend, San Diego, CA, EUA*) para IFN- γ ; policlonal *rabbit* ab15323 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para iNOS; monoclonal *mouse* ab26 (*abcam, EUA*) para p53; policlonal *rabbit* ab7977 (*abcam, Cambridge, MA, EUA*) para BAX; monoclonal *mouse* VG-1 sc-53462 (*Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*) para VEGF, monoclonal *mouse* ab64569 (*abcam, EUA*) para Endostatina e monoclonal *mouse* sc47778 (*Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*) para B-Actina. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit* a6154 (*sigma, St. Louis, MO, EUA*) e *anti-mouse* a9917 (*sigma, St. Louis, MO, EUA*) HRP conjugados diluídos em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *NIHImageJ 1.47v* (*National Institute of Health, EUA. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>*).

3.5 – Análises de Toxicidade

As análises toxicológicas foram realizadas com base em marcadores funcionais utilizando amostras sanguíneas de todos os animais (10 animais por grupo).

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (ventrículo esquerdo). O soro foi separado por centrifugação a 6000 rpm, 5 minutos, e utilizado para investigar os possíveis efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos dos tratamentos com P-MAPA ou BCG através das análises: atividade da alanina aminotransferase (ALT), marcador específico para lesão do parênquima hepático; atividade da aspartato aminotransferase (AST), marcador indicativo de lesões hepática e cardíaca; níveis circulantes de uréia e creatinina para verificar a função renal; atividade da fosfatase alcalina para verificar a progressão do câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI). As leituras foram realizadas pelo leitor de microplacas *Multi-Mode Microplate Reader Synergy H1M* (Bio-Tek Instruments, EUA), com controle de temperatura e analisadas através do software Kcjunior (Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

3.6 – Análises Estatísticas

Os parâmetros quantificados (análises de *Western Blotting* e toxicológicas) foram analisados estatisticamente para os diferentes grupos experimentais. Para a análise estatística foram empregados o *Test-T* e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc* para comparação entre médias. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 1% e 5%. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

As análises histopatológicas e as imunohistoquímicas para os diferentes antígenos foram avaliadas através do teste de proporção. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

4- RESULTADOS

4.1 – Análises Histopatológicas

O trato urinário do grupo Controle não apresentou alterações estruturais (Figuras 1a, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e). O urotélio normal foi composto por 2 - 3 camadas, sendo: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (Figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e).

Em contraste, o trato urinário do grupo MNU apresentou drásticas alterações histopatológicas, tais como: hidronefrose e hidroureter (Figuras 1b, 1c); carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero (pTa), carcinoma *in situ* (pTis) e metaplasia escamosa foram encontrados na bexiga urinária em 40,0%, 40,0%, 20,0% e 20,0% dos animais, respectivamente (Figuras 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, Tabela 1). O carcinoma *in situ* (pTis) foi caracterizado por uma desordenada proliferação das células uroteliais (hiperplasia) em um urotélio plano, com acentuadas atipias celulares caracterizadas por núcleos volumosos, redução do citoplasma e nucléolos múltiplos e proeminentes. O carcinoma papilífero (pTa) foi caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade, núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos. O carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1) foi caracterizado por células neoplásicas agrupadas em pequenos grupos ou cordões invadindo a lâmina própria, numerosas figuras de mitose e células pleomórficas com núcleos aumentados. A metaplasia escamosa foi caracterizada por grupos de células escamosas com queratinização e mínimo pleomorfismo nuclear.

O carcinoma papilífero (40,0%), a neoplasia intraurotelial de baixo grau (40,0%) e a hiperplasia papilífera (20,0%) foram as alterações histopatológicas mais frequentes na bexiga urinária do grupo MNU-BCG (Figuras 3a, 3b, 3c, 3d, 3e; Tabela 1). Além disso, o trato urinário do grupo MNU-BCG apresentou marcantes alterações macroscópicas, tais como: lesões císticas nos rins, hidroureter, espessamento e lesões papilíferas na bexiga urinária (Figura 1d). A neoplasia intraurotelial de baixo grau foi caracterizada por aumento do número de camadas celulares no urotélio, hipercromasia nuclear e displasia.

As características macroscópicas do trato urinário do grupo MNU-P-MAPA foram semelhantes às daquelas do grupo Controle (Figura 1e). Nas análises histopatológicas, foi mais frequente o urotélio normal, presente em 60,0% dos animais (Figuras 3f, 3g, 3h, Tabela 1). As alterações histopatológicas encontradas no grupo MNU-P-MAPA foram: hiperplasia plana (20,0%) e hiperplasia papilífera (20,0%) (Figuras 3i, 3j, Tabela 1). As hiperplasias planas e papilíferas foram caracterizadas por espessamento do urotélio, com ondulações da mucosa no caso da hiperplasia papilífera e ausência de atipias citológicas.

A ocorrência de cálculos urinários e hematúria macroscópica foram observadas apenas nos grupos MNU e MNU-BCG, e ausentes no grupo MNU-P-MAPA (Figura 1f).

4.2 – Imunohistoquímica e Análises de Western Blotting para a Via de Sinalização dos TLRs (TLR2, TLR4, MyD88, IKK- α , NF- κ B, TNF- α , IL-6, TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) e P53 na Regulação da Angiogênese (VEGF e Endostatina) e Apoptose (BAX)

Os níveis proteicos para TLR2 foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA (69,6%) quando comparados aos grupos Controle (40,6%), MNU-BCG (26,2%) e MNU (25,0%), apresentando imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular de forma intensa nos grupos MNU-P-MAPA e MNU-BCG, moderada no Controle e fraca no grupo MNU (Figuras 4a, 4g, 4m, 4s, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para MyD88 foram significativamente maiores nos grupos MNU-BCG (33,8%) e MNU-P-MAPA (30,8%) quando relacionados aos demais grupos experimentais, apresentando intensa imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular (Figuras 4b, 4h, 4n, 4t, 6; Tabela 2). Contudo, esses níveis foram significativamente maiores no grupo Controle (19,1%) em relação ao grupo MNU (9,7%), os quais exibiram imunorreatividade moderada e fraca, respectivamente (Figuras 4b, 4h, 4n, 4t, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para IKK- α foram significativamente maiores no grupo MNU-BCG (27,3%) em relação aos grupos MNU (20,9%), MNU-P-MAPA (18,4%) e Controle (11,0%), apresentando imunorreatividade no urotélio intensa, moderada, fraca e fraca, respectivamente (Figuras 4c, 4i, 4o, 4u, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para NF- κ B foram significativamente maiores no grupo MNU (54,1%) quando comparados aos grupos MNU-BCG (39,6%), Controle (32,5%) e MNU-P-

MAPA (27,2%) (Figura 6). A imunorreatividade para NF- κ B foi fraca no citoplasma das células uroteliais dos animais do grupo Controle, intensa tanto no núcleo como no citoplasma das células uroteliais dos animais do grupo MNU, moderada tanto no núcleo como no citoplasma das células uroteliais dos animais do grupo MNU-BCG e fraca no citoplasma das células uroteliais dos animais do grupo MNU-P-MAPA (Figuras 4d, 4j, 4p, 4v; Tabela 2).

Os níveis proteicos para TNF- α foram significativamente maiores no grupo MNU-BCG (82,4%) em relação aos demais grupos experimentais, apresentando intensa imunorreatividade no urotélio, lamina própria e células da camada muscular (Figuras 4e, 4k, 4q, 4w, 6; Tabela 2). Contudo, esses níveis foram significativamente maiores nos grupos MNU-P-MAPA (61,4%) e MNU (58,1%) em relação ao grupo Controle (45,4%), os quais demonstraram fraca, intensa e fraca imunorreatividades, respectivamente (Figuras 4e, 4k, 4q, 4w, 5; Tabela 2).

Os níveis proteicos para IL-6 foram significativamente maiores nos grupos MNU-BCG (45,6%) e MNU (38,6%) em relação aos grupos MNU-P-MAPA (29,2%) e Controle (21,3%), os quais demonstraram intensa, intensa, fraca e fraca imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e nas células da camada muscular, respectivamente (Figuras 4f, 4l, 4r, 4x, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para TLR4 foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA (51,5%) em relação aos demais grupos experimentais, apresentando intensa imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular (Figuras 5a, 5g, 5m, 5s, 6; Tabela 2). Ainda, esses níveis foram significativamente mais elevados nos grupos Controle (32,4%) e MNU-BCG (27,3%) em relação ao grupo MNU (19,3%), os quais demonstraram moderada, intensa e fraca imunorreatividade no urotélio, respectivamente. (Figuras 5a, 5g, 5m, 5s, 6; Tabela 1).

Os níveis proteicos para TRIF foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA (48,0%) em relação aos demais grupos experimentais, apresentando intensa imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular (Figuras 5b, 5h, 5n, 5t, 6; Tabela 2). Ainda, esses níveis foram significativamente maiores nos grupos MNU-BCG (25,8%) e MNU (21,1%) quando comparados ao grupo Controle (6,8%), os quais apresentaram moderada, fraca e fraca imunorreatividade, respectivamente (Figuras 5b, 5h, 5n, 5t, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para IRF-3 foram significativamente maiores nos grupos MNU-BCG (53,7%) e MNU-P-MAPA (50,5%) em relação aos grupos Controle (33,4%) e MNU (26,8%), os quais apresentaram moderada, intensa, fraca e fraca imunorreatividade no urotélio, respectivamente (Figuras 5c, 5i, 5o, 5u, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para IFN- γ foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA (59,4%) em relação aos grupos MNU-BCG (40,4%), MNU (26,0%) e Controle (24,8%), os quais demonstraram intensa, moderada, fraca e fraca imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular, respectivamente (Figuras 5d, 5j, 5p, 5v, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para iNOS foram significativamente maiores nos grupos MNU-P-MAPA (40,1%) e MNU-BCG (32,4%) em relação aos grupos MNU (19,2%) e Controle (8,0%), os quais exibiram intensa, moderada, fraca e fraca imunorreatividade no urotélio, lâmina própria e células da camada muscular, respectivamente (Figuras 5e, 5k, 5q, 5w, 6; Tabela 2).

Os níveis proteicos para BAX foram significativamente maiores no grupo MNU-P-MAPA (85,6%) em relação aos grupos MNU (53,1%), MNU-BCG (51,6%) e Controle (34,6%), os quais demonstraram intensa, moderada, moderada e fraca imunorreatividade no urotélio, respectivamente (Figuras 5f, 5l, 5r, 5x, 6; Tabela 2).

Os grupos MNU-P-MAPA (22,8%) e Controle (19,2%) apresentaram níveis proteicos significativamente maiores para p53 em relação aos demais grupos experimentais (Figura 6). Ainda, esses níveis foram significativamente maiores no grupo MNU-BCG (11,6%) em relação ao grupo MNU (7,9%) (Figura 6).

Os níveis proteicos para VEGF foram significativamente maiores no grupo MNU (63,9%) em relação aos demais grupos experimentais (Figura 6). Também, esses níveis foram significativamente maiores no grupo MNU-BCG (28,6%) em relação aos grupos MNU-P-MAPA (13,1%) e Controle (10,4%) (Figura 6).

Já os níveis proteicos para endostatina foram significativamente maiores nos grupos MNU-P-MAPA (29,5%) e Controle (26,4%) quando comparados aos grupos MNU-BCG (11,6%) e MNU (5,4%) (Figura 6).

4.3 – Análises de Toxicidade

Os níveis séricos de ALT e AST foram significativamente maiores nos grupos MNU

e MNU-BCG em relação aos grupos MNU-P-MAPA e Controle (Tabela 3).

A atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior no grupo MNU quando relacionada aos demais grupos experimentais (Tabela 3). Ainda, o grupo MNU-BCG apresentou atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em relação aos grupos MNU-P-MAPA e Controle (Tabela 3).

Os níveis de creatinina e ureia foram significativamente maiores nos grupos MNU e MNU-BCG em relação aos grupos MNU-P-MAPA e Controle (Tabela 3).

6- DISCUSSÃO

Os resultados histopatológicos do presente estudo evidenciaram tumor indiferenciado, caracterizando carcinoma com invasão da lâmina própria (pT1), carcinoma papilífero (pTa), carcinoma *in situ* (pTis) e metaplasia escamosa no grupo MNU, demonstrando que o MNU foi efetivo na indução do CBNMI nesse modelo animal. Nos animais submetidos a imunoterapia com BCG, as alterações histopatológicas mais frequentes foram carcinoma papilífero (pTa), neoplasia intraurotelial de baixo grau e hiperplasia papilífera. Contudo, os animais tratados com P-MAPA apresentaram melhor recuperação histopatológica do estado de câncer do que a observada no grupo de animais tratados com BCG. Adicionalmente às análises histopatológicas, procedeu-se a análise dos níveis séricos da fosfatase alcalina, os quais foram significativamente aumentados nos animais tratados somente com MNU, indicando progressão tumoral. Proctor et al. (2010) demonstraram que os níveis aumentados da atividade da fosfatase alcalina estavam associados com a presença de câncer e aumento da mortalidade. A imunoterapia com P-MAPA reduziu significativamente os níveis da fosfatase alcalina em relação ao tratamento com BCG.

O câncer vesical, caracterizado por lesões superficiais (CBNMI), apresenta elevada taxa de recidiva e progressão após ressecção endoscópica (ASKELAND et al., 2012). Os tumores superficiais são classificados em 3 estágios: Tis - carcinoma *in situ*; Ta - papilífero e T1 - tumor confinado a mucosa e submucosa da bexiga, ocorrendo em 10%, 70% e 20%, respectivamente (EPSTEIN et al., 1998). Contudo, 20% - 30% desses tumores apresentam progressão e 70% recorrência pós-tratamento exclusivo com RTU (ASKELAND et al., 2012). Por outro lado, sabe-se que a terapia adjuvante com BCG diminuiu esses índices para 30% (HALL et al., 2007; ASKELAND et al., 2012). Morales & Eiding (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG. Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada atualmente a imunoterapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor (BOHLE; BRANDAU, 2003; HALL et al., 2007; ASKELAND et al., 2012).

A administração intravesical de BCG exerce efeito antineoplásico no CBNMI, pois esse agente induz a uma resposta sistêmica do complexo imune compreendendo os componentes humoral e celular (BOHLE; BRANDAU, 2003). BCG também exerce um efeito farmacogenético direto sobre as células do carcinoma urotelial (BOHLE; BRANDAU, 2003; DIPOLA; LATTIME, 2007). Ainda, outros autores demonstraram o efeito antiproliferativo direto de BCG em células do carcinoma urotelial (SEOW et al., 2002; CHEN et al., 2005). Possíveis mecanismos contribuem para esse efeito biológico, os quais incluem a parada do ciclo celular e/ ou apoptose. Chen et al. (2005) demonstraram interrupção do ciclo celular na fase G1/ S quando células do carcinoma urotelial foram expostas ao BCG.

Além disso, a imunoterapia intravesical com BCG induz a uma intensa resposta inflamatória no urotélio da bexiga urinária caracterizada por ativação de linfócitos T e citocinas (PAVLOVICH et al., 2000). Vários estudos demonstraram que a administração intravesical de BCG induz diferentes mediadores como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e a proteína induzível de interferon-10 (IP-10), os quais exercem potente efeito antitumoral e antiangiogênico (PAVLOVICH et al., 2000). De acordo com Schamhart et al. (2000), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de 1 ano. Contudo, tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (SCHAMHART et al., 2000). Contudo, os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (BOHLE; BRANDAU, 2003; WALSH; RETIK; VAUGHAN, 2007). No presente estudo a imunoterapia com BCG levou à ocorrência de reações adversas como hematúria macroscópica, além do aumento dos níveis séricos de ALT, AST, ureia, creatinina.

Considerando o melhor entendimento e aperfeiçoamento da imunoterapia com BCG para o tratamento do CBNMI, além das limitações dessa terapia padrão, a busca de novos agentes para a terapia intravesical continua. Dessa forma, tratamentos alternativos utilizando imunomoduladores, como o uso do agregado polimérico anidrido fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio (P-MAPA) têm sido propostos com

resultados promissores (DURÁN; NUNES, 1990; NUNES; DURÁN, 2003). Estudos preliminares *in vivo* e *in vitro* indicaram que este imonomodulador mostrou-se capaz de combater doenças infecciosas, virais e alguns tipos de cânceres (DURÁN et al., 1997; JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 1999). Justo, Durán e Queiroz (2003) verificaram, em camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE), mielossupressão, aumento do número de unidades formadoras de colônias de granulócito/macrófagos (CFU-GM) no baço e esplenomegalia. Após tratamento subcutâneo de P-MAPA durante 7 dias nestes animais, observou-se redução de 35% da esplenomegalia e do crescimento tumoral, estimulação da mielopoiese, além do aumento da produção de IL-2 e interferon-gama (IFN- γ) com consequente aumento da atividade de células NK (JUSTO; DURÁN; QUEIROZ, 2003). De acordo com estes autores, o efeito modulador do P-MAPA na resposta mielopoética está relacionado à sua atividade antitumoral como um possível mecanismo de regulação na produção de CFU-GM e expressão de suas atividades funcionais. FÁVARO et al. (2012) demonstraram que o P-MAPA possui um importante efeito antitumoral no CBNMI. De acordo com esses autores, o P-MAPA aumentou os níveis proteicos de TLR2, TLR4 e p53 quando administrado intravesicalmente em animais com CBNMI induzido quimicamente, correlacionando com a regressão tumoral. Também, experimentos *in vitro* com células HEK293 relevaram que o tratamento dessas células com P-MAPA ativou o NF- κ B com consequente estimulação dos TLRs 2 e 4 (FÁVARO et al., 2012). Assim concluiu-se que o P-MAPA atuou como agonista dos TLRs 2 e 4 e ativou p53, melhorando o estado imunológico no CBNMI (FÁVARO et al., 2012).

O P-MAPA não demonstrou citotoxicidade ou genotoxicidade em culturas de células V79 e linfócitos humanos, bem como se mostrou atóxico em camundongos, cães e macacos (DURÁN et al., 1993). Os dados toxicológicos apresentados no presente estudo demonstraram que o P-MAPA reduziu os níveis séricos de ALT, AST, uréia, creatinina e fosfatase alcalina, demonstrando que esse imunomodulador não apresentou efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotóxicos.

Neste complexo cenário, os presentes resultados demonstraram uma potencial evolução no tratamento do CBNMI: 1 - maior eficácia antitumoral com a introdução do imunomodulador P-MAPA em relação ao tratamento convencional com BCG; 2 - menor potencial de efeitos adversos do P-MAPA em relação ao BCG; 3 - relação direta entre a resposta ao tratamento com P-MAPA e a recuperação tecidual do urotélio da bexiga urinária.

Os compostos que atuam como agonistas dos TLRs, ou em outras palavras, os compostos ou moléculas que se ligam e ativam os TLRs são objetos de intensa investigação e desenvolvimento para o tratamento do câncer. A este respeito, o presente estudo detalhou uma série de análises no modelo animal para CBNMI induzido quimicamente, e demonstrou que o imunomodulador P-MAPA exibiu significativa atividade antitumoral decorrente da estimulação dos TLRs 2 e 4. A ativação dos TLRs estimula o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas através do aumento dos níveis de expressão de moléculas co-estimulatórias, tais como CD80 e CD86 em células dendríticas (CD), o que permite que tais células possam ativar de forma mais eficaz as células T (TSUJI et al., 2000; MICHELSEN et al., 2001). Ayari et al. (2011) demonstraram recentemente que os TLRs são expressos tanto no urotélio normal quanto no CBNMI. O papel dos TLRs no câncer é uma questão controversa, pois diferentes estudos demonstraram que os TLRs podem atuar como reguladores negativos ou positivos da carcinogênese (GALLI et al., 2010; MATIJEVIC; PAVELIC, 2010). Diferentes autores demonstraram que os TLRs podem ajudar as células tumorais a escapar da resposta do sistema imune (HUANG et al., 2007), enquanto outros mostraram que a expressão dos TLRs nas células tumorais pode levá-las à apoptose ou outros tipos de morte celular (HUANG et al., 2007; SALAUN et al., 2007; GALLI et al., 2010). A evidência contraditória dos TLRs pode ser explicada pela diferente intensidade e natureza da resposta inflamatória (GALLI et al., 2010).

De fato, processos inflamatórios crônicos são mais leves do que respostas inflamatórias agudas, que são destinadas a induzir a eliminação do patógeno. Na maioria dos casos, a inflamação associada ao câncer é semelhante à inflamação crônica, incluindo a produção de fatores que estimulam a reparação tecidual e a sobrevivência e proliferação de células cancerosas (GALLI et al., 2010). No entanto, se a resposta inflamatória se desenvolve em inflamação aguda, um mecanismo efetor imunológico é ativado de modo a regredir o tumor (GALLI et al., 2010). Considerando os diversos elementos que controlam os processos neoplásicos, um importante papel é atribuído aos membros da superfamília de quimiocinas (BEN-BARUCH, 2006). Quimiocinas expressas pelas células tumorais e células do hospedeiro desempenham um papel crítico no desenvolvimento do tumor através da regulação da migração de diferentes subtipos de leucócitos (BEN-BARUCH, 2006). A proporção relativa de cada tipo de célula de defesa no interior do tumor, por exemplo, macrófagos, células T, células NK, células dendríticas,

ou outros subtipos de leucócito, determinam em grande parte o perfil imunológico local (ALLAVENA et al., 2008). Em particular, células T CD8 e alguns tipos de células do sistema imunológico inato, como as células NK, podem inibir o crescimento tumoral (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008; GALLI et al., 2010).

Em contraste, a estimulação de alguns TLRs demonstrou aumento na proliferação e sobrevivência tumoral, sugerindo que a estimulação dos TLRs favorece a carcinogênese (JEGO et al., 2006). Recentemente, a expressão aberrante do TLR4 foi encontrada na maioria dos carcinomas humanos, incluindo o CB (BROWN et al., 2003; HUANG et al., 2005). Ainda, estudos têm demonstrado que a ativação da sinalização do TLR4 em células cancerosas correlacionou-se com a progressão do tumor (HUANG et al., 2005). Um estudo recente demonstrou que as células uroteliais da bexiga urinária expressaram TLR4 e a ativação da sinalização do TLR4 resultou em uma resposta significativa de IL-6 (SONG et al., 2007). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com funções pró-inflamatórias em células imunes e não imunes (SEGUCHI et al., 1992). Cardillo, Sale e Di Silverio (2000) demonstraram níveis elevados de IL-6 no soro e urina de pacientes com CB. Já Okamoto, Hattori e Oyasu (1997) verificaram que a IL-6 promoveu o crescimento *in vitro* das células do CB. Esses mesmos autores concluíram que a IL-6 associada ao tumor pode atuar como um fator de crescimento autócrino para o CB. Entretanto, os mecanismos moleculares indutores de resposta da IL-6 nas células do CB ainda não foram elucidados.

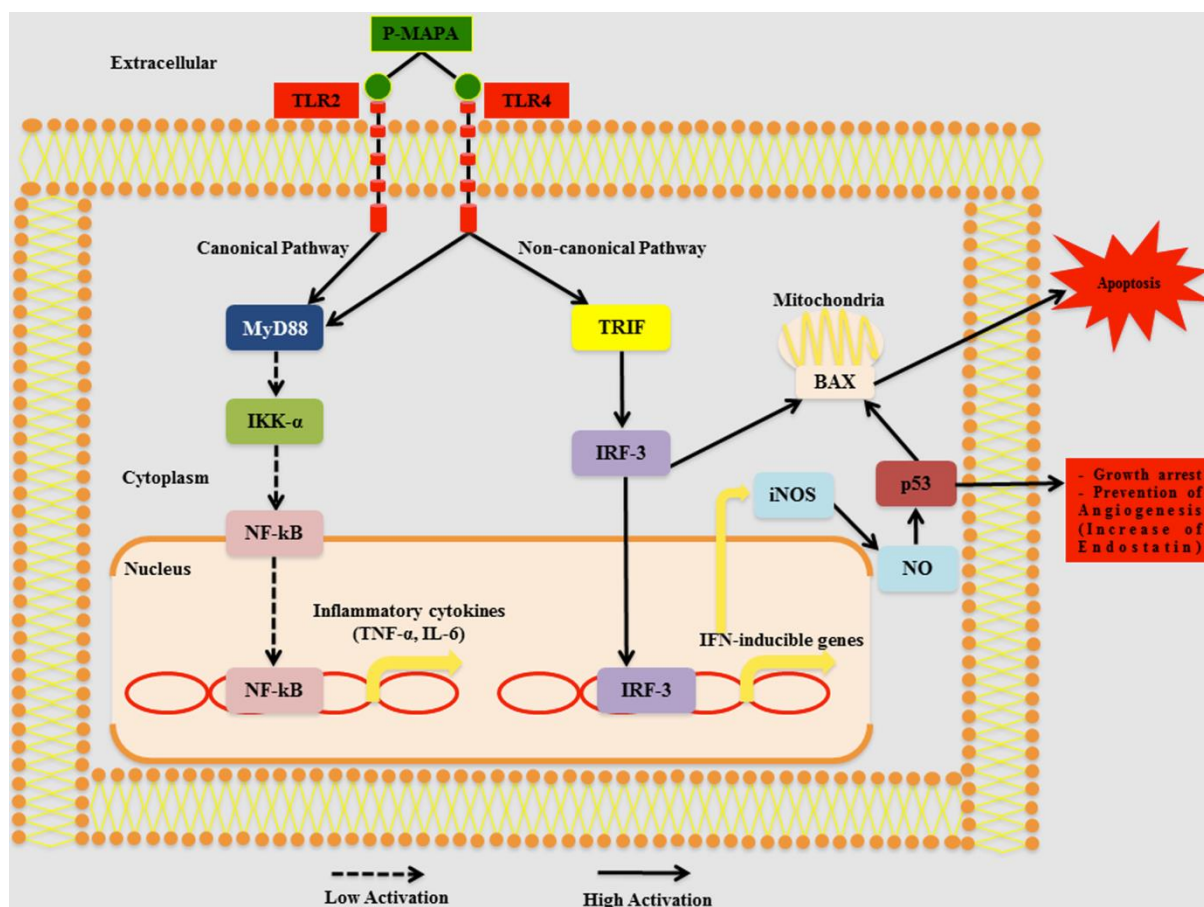
Assim, os presentes resultados demonstraram que a imunoterapia com BCG aumentou os níveis proteicos dos intermediários da via de sinalização canônica, via de produção de citocinas inflamatórias, dos TLRs (MyD88, IKK- α , NF- κ B, TNF- α , IL-6) (**Esquema 2**). Esses dados estão de acordo com a literatura no que tange os mecanismos que levam à síntese de NF- κ B. O aumento de MyD88 desencadeou uma resposta via proteína IKK- α , que também esteve aumentada no grupo tratado com BCG, com consequente elevação da produção de NF- κ B.

Diferencialmente, o tratamento com P-MAPA aumentou os níveis proteicos dos intermediários da via de sinalização não-canônica, via de produção de interferons, dos TLRs (TRIF, IRF-3, IFN- γ , iNOS) (**Esquema 2**). Provavelmente, em consequência dessa ativação imune o P-MAPA restaurou os níveis proteicos de p53, fato que não ocorreu com o tratamento com BCG. Adicionalmente, a apoptose foi investigada pela determinação dos níveis proteicos da BAX, os quais indicaram significativo aumento da atividade apoptótica nos animais tratados com P-MAPA em relação ao tratamento convencional com BCG.

Os IFNs são potentes modificadores de resposta biológica com uma ampla variedade de efeitos sobre as diferentes linhagens celulares (BROWN; WAGNER; BAHNSON, 2000). Os IFNs exibem propriedades imunomoduladora, antitumoral, antiangiogênica e antiproliferativa (BROWN; WAGNER; BAHNSON, 2000). Diferentes autores demonstraram que o IRF3 inibe o crescimento de diferentes linhagens celulares tumorais tanto *in vitro* como *in vivo* (DUGUAY et al., 2002, KIM et al., 2003). Ainda, o IRF3 é um importante ativador da proteína pró-apoptótica BAX (LLAMBI; GREEN, 2011). A morte celular em vertebrados ocorre através da via de apoptose mitocondrial, na qual as proteínas da família Bcl-2 controlam a integridade da membrana externa da mitocôndria (LLAMBI; GREEN, 2011). Quando as interações entre essas proteínas resultam em apoptose, a proteína efetora BAX rompe esta membrana num processo chamado de permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Se ocorrer MOMP, proteínas presentes no espaço intermembranar mitocondrial ganham acesso para o citosol e provocam a ativação de caspases que orquestram a morte celular (LLAMBI; GREEN, 2011). A função do gene supressor tumoral p53, o qual é frequentemente mutado em tumores humanos, é ativar a apoptose (DEGENHARDT et al., 2002). A p53 regula a transcrição de genes que impedem o crescimento celular e ativa a expressão de pró-apoptóticos, como a BAX, nas mitocôndrias (DEGENHARDT et al., 2002).

Outro importante resultado do presente estudo demonstrou que a imunoterapia com P-MAPA foi efetiva em restaurar o equilíbrio angiogênico no CBNMI através da redução dos níveis proteicos de VEGF e aumento dos níveis de endostatina. Já no tratamento com BCG, os níveis proteicos de VEGF continuaram elevados em relação ao tratamento com P-MAPA. Os níveis aumentados de VEGF e a diminuição dos níveis de endostatina podem se correlacionar com a desregulação do NF- κ B e da proteína p53. Dolcet et al. (2005) demonstraram que a desregulação do NF- κ B inibe a apoptose, aumenta a proliferação celular e promove a angiogênese. A terapia antiangiogênica é sensível ao estado de p53 nos tumores, indicando um importante papel da p53 na regulação da angiogênese. Teodoro et al. (2006) demonstraram que p53 ativa transcricionalmente o gene α (II) colágeno prolil-4-hidroxilase [α (II)PH], resultando em liberação extracelular de fragmentos antiangiogênicos de colágeno tipos 4 (tunstatina) e 18 (endostatina). Esses mesmos autores demonstraram que em meio condicionado, células que expressam ectopicamente p53 ou α (II)PH inibiram o crescimento de células

endoteliais primárias humanas e correlacionaram a via de supressão tumoral mediada por p53 com a síntese de fragmentos antiangiogênicos de colágeno.



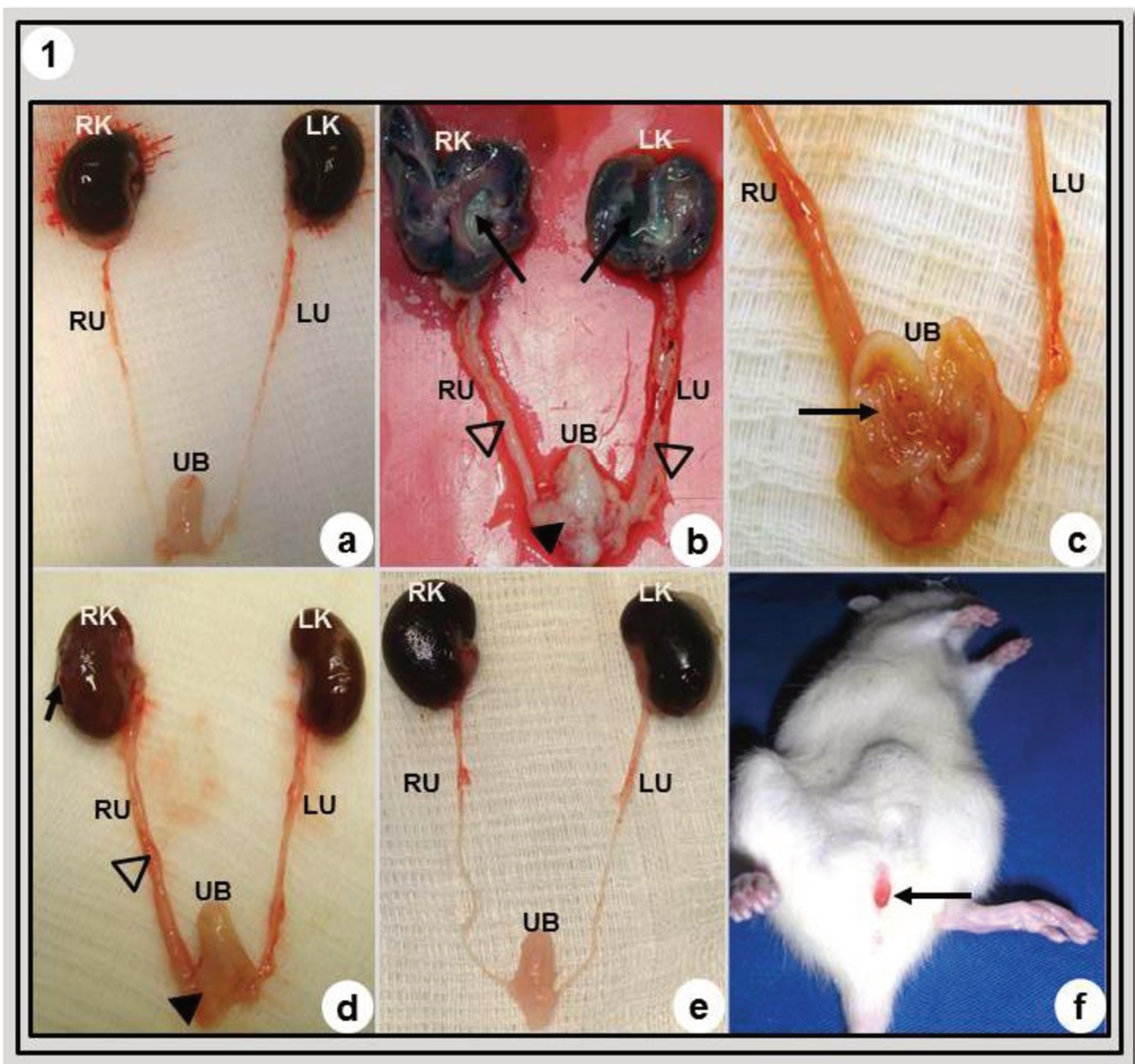
Esquema 2: Hipotético Mecanismo Imune do Imunomodulador P-MAPA (Laboratório de Carcinogênese Experimental e Farmabrilis).

6- FIGURAS E TABELAS

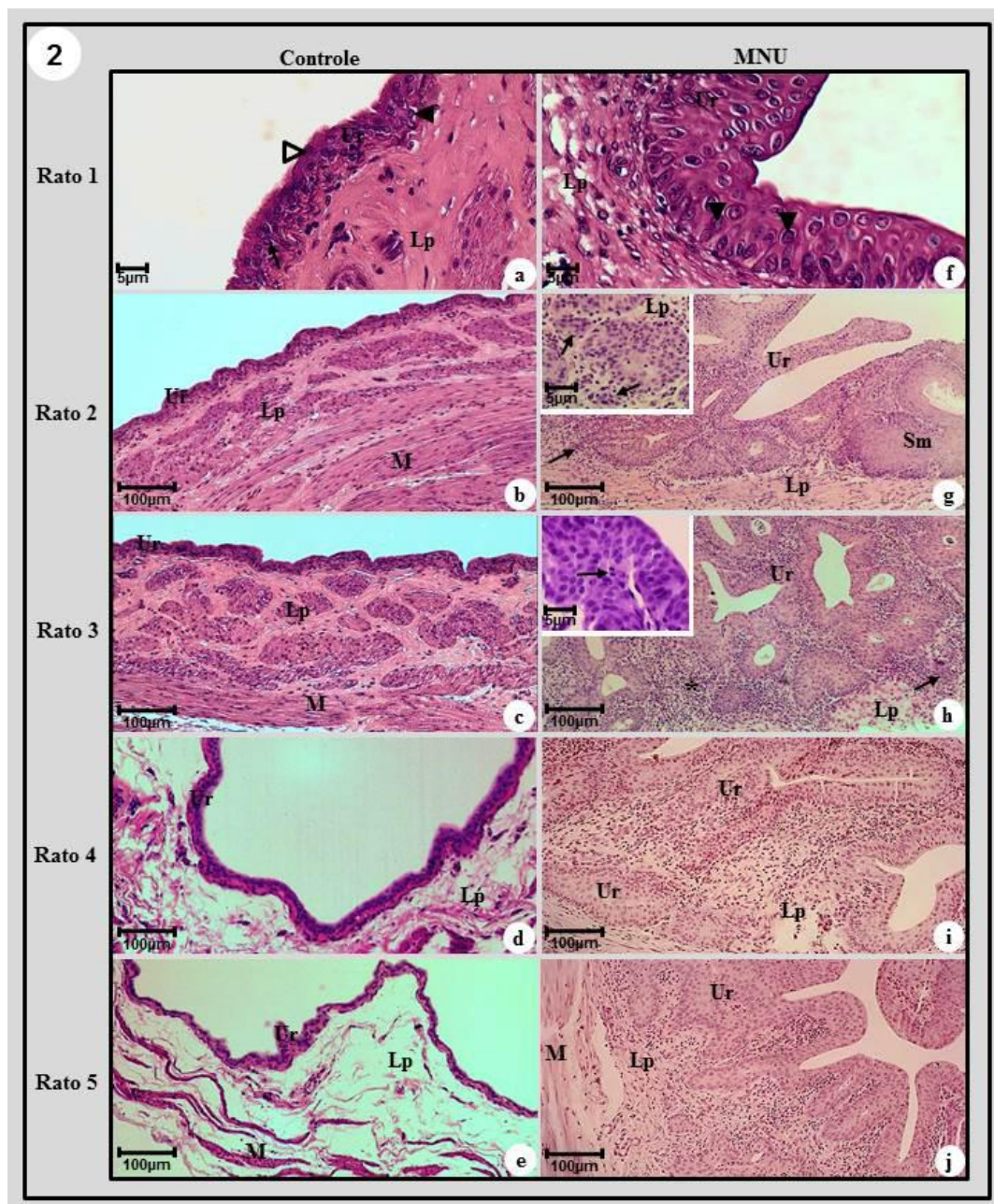
Tabela 1: Porcentagem de alterações histopatológicas na bexiga urinária dos animais dos grupos Controle, MNU, MNU-BCG e MNU-P-MAPA.

Histopatologia	Grupos			
	Controle (n= 05)	MNU (n= 05)	MNU-BCG (n= 05)	MNU-P- MAPA (n= 05)
Hiperplasia Plana	-	-	-	01 (20,0%)*
Hiperplasia Papilífera	-	-	01 (20,0%)	01 (20,0%)
Neoplasia Intraurotelial Baixo Grau	-	-	02 (40,0%)*	-
Neoplasia Intraurotelial Alto Grau – Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	-	01 (20,0%)*	-	-
Carcinoma Papilífero (pTa)	-	02 (40,0%)*	02 (40,0%)	-
Carcinoma Urotelial com Invasão da Lâmina Própria (pT1)	-	02 (40,0%)*	-	-
Metaplasia Escamosa	-	01 (20,0%)*	-	-
Normal	05 (100,0%)*	-	-	03 (60,0%)*

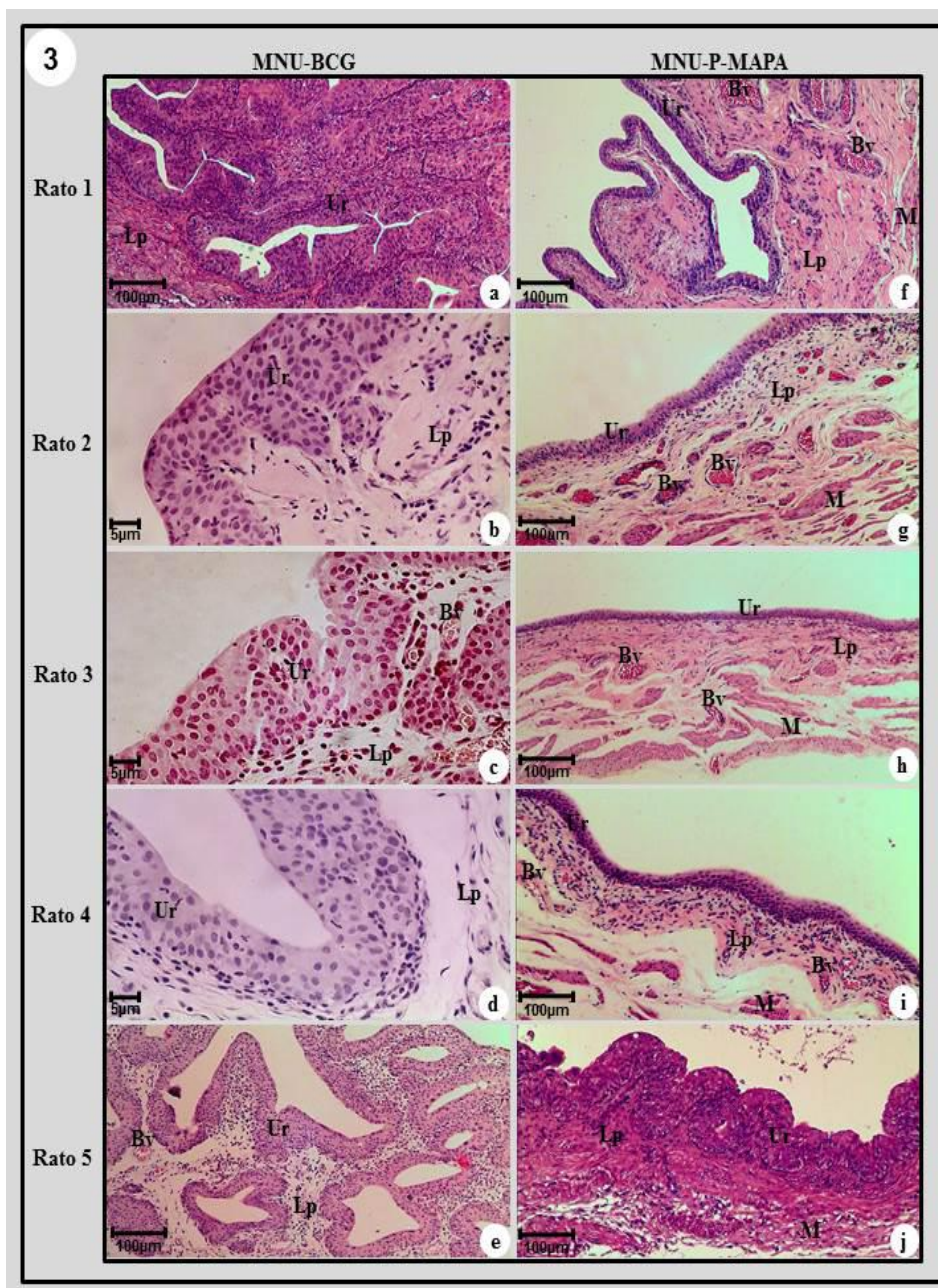
Significância estatística (teste de proporção, $P < 0.0001$)



Figuras 1a - 1e: Trato urinário dos animais dos grupos Controle (a), MNU (b, c), MNU-BCG (d) e MNU-P-MAPA (e). Em (a) e (e) características normais do trato urinário. (b) Lesões distribuídas em diversos pontos do trato urinário: hidronefrose e lesões papilíferas (**setas**) nos rins, hidroureter (**cabeças de setas abertas**); espessamento e lesões papilíferas (**cabeça de seta fechada**) na bexiga urinária. (c) Lesões papilíferas intravesicais (**seta**), hidroureter. (d) Lesões císticas (**seta**) no rim, hidroureter (**cabeça de seta aberta**), espessamento e lesões papilíferas (**cabeça de seta fechada**) na bexiga urinária. a - e: **LK** - rim esquerdo, **LU** - ureter esquerdo, **RK** - rim direito, **RU** - ureter direito, **UB** - bexiga urinária. **Figura 1f:** Os animais dos grupos MNU e MNU-BCG apresentaram hematúria macroscópica (**seta**). O grupo MNU-P-MAPA não demonstrou qualquer hematúria macroscópica.



Figuras 2a - 2j: Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos Controle (a, b, c, d, e) e MNU (f, g, h, i, j). (a), (b), (c), (d) e (e) Urotélio normal composto por 2-3 camadas: uma camada de células basais (**cabeça de seta fechada**), uma camada intermédia de células (**seta**), e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva (**cabeça de seta aberta**). (f) Carcinoma *in situ* (pTis), caracterizado por atipia celular: núcleos volumosos (**cabeças de setas fechadas**) com citoplasma reduzido e nucléolos proeminentes. (g), (h) Carcinoma urotelial com invasão da lâmina própria (pT1): células neoplásicas dispostas em pequenos grupos (**setas**) invadindo a lâmina própria; metaplasia escamosa (**Sm**); focos de infiltrado inflamatório (**asterisco**) na lâmina própria; **inset da figura h:** figura mitótica (**seta**). (i), (j) Carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas e células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade. a - j: **Lp** – lâmina própria, **M** - camada muscular, **Ur** - urotélio.



Figuras 3a - 3j: Fotomicrografias das bexigas urinárias dos grupos MNU-BCG (a, b, c, d, e) e MNU-P-MAPA (f, g, h, i, j). (a) e (e), Carcinoma papilífero (pTa) caracterizado por extensas lesões papilíferas, células uroteliais com arranjo desordenado e com perda da polaridade. (b) e (d), neoplasia intraurotelial de baixo grau caracterizada por aumento do número de camadas celulares, hiper cromasia nuclear e displasia. (c) Hiperplasia papilífera caracterizada por espessamento do urotélio e ausência de atipias citológicas. (f), (g), (h) Urotélio normal composto por 2 - 3 camadas: uma camada de células basais, uma camada celular intermédia, e uma camada superficial ou apical composta por células em guarda-chuva; vasos sanguíneos (**Bv**) na lâmina própria. (i) Hiperplasia plana; vasos sanguíneos (**Bv**) na lâmina própria. (j) Hiperplasia papilífera; vasos sanguíneos (**Bv**) na lâmina própria. a - j: **Lp** – lâmina própria, **M** - camada muscular, **Ur** - urotélio.

Tabela 2: Intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos na bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU-BCG e MNU-P-MAPA.

Antígenos	Grupos			
	Controle (n=5)	MNU (n=5)	MNU-BCG (n=5)	MNU-P-MAPA (n=5)
TLR2	42.1%	15.8%	87.3%*	95.1%*
MyD88	22.5%	21.0%	92.5%*	88.0%*
IKK-?	25.4%	47.4%	88.9%*	22.3%
NF-κB	28.3%	86.5%*	65.9%	18.4%
TNF-?	17.4%	84.0%*	87.1%*	12.5%
IL-6	10.8%	85.1%*	91.7%*	10.0%
TLR4	45.4%	10.3%	84.0%*	96.1%*
TRIF	11.8%	5.3%	47.8%	94.0%*
IRF-3	7.9%	6.7%	58.3%	96.2%*
IFN-?	22.4%	13.9%	61.3%	97.5%*
iNOS	10.0%	18.9%	55.6%	94.7%*
BAX	5.8%	57.1%	62.3%	85.4%*

◆ fraca imunorreatividade (1% – 35% células uroteliais e/ou lamina própria e/ou células da camada muscular positivas);

◆ moderada imunoreatividade (36% – 70% células uroteliais e/ou lamina própria e/ou células da camada muscular positivas);

◆ intensa imunoreatividade (> 70% células uroteliais e/ou lamina própria e/ou células da camada muscular positivas).

*Significância estatística (teste de proporção, $P<0.0001$)

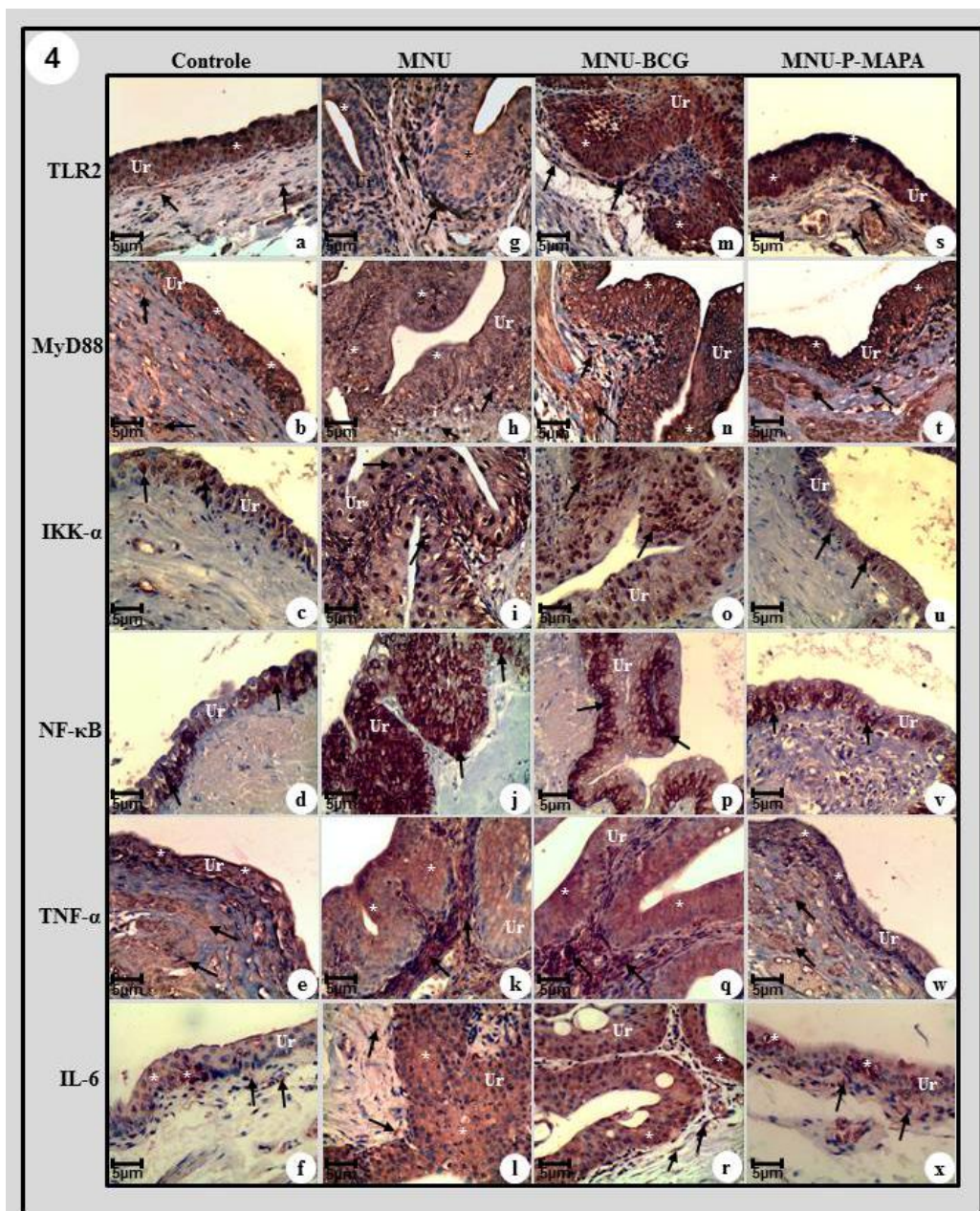


Figura 4: Imunomarcação da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (a, b, c, d, e, f), MNU (g, h, i, j, k, l), MNU-BCG (m, n, o, p, q, r) e MNU-P-MAPA (s, t, u, v, w, x). (a), (g), (m) e (s) imunomarcação para TLR2 no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (b), (h), (n) e (t) imunomarcação para MyD88 no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (c), (i), (o) e (u) imunomarcação para IKK-α no urotélio (**setas**). (d), (j), (p) e (v) imunomarcação para NF-κB (**setas**) no citoplasma de células uroteliais de animais dos grupos Controle e MNU-P-MAPA; e em ambos núcleo e citoplasma de células uroteliais dos animais dos grupos MNU e MNU-BCG. (e), (k), (q) e (w) imunomarcação para TNF-α no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (f), (l), (r) e (x) imunomarcação para IL-6 no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). a – x:Ur – urotélio.

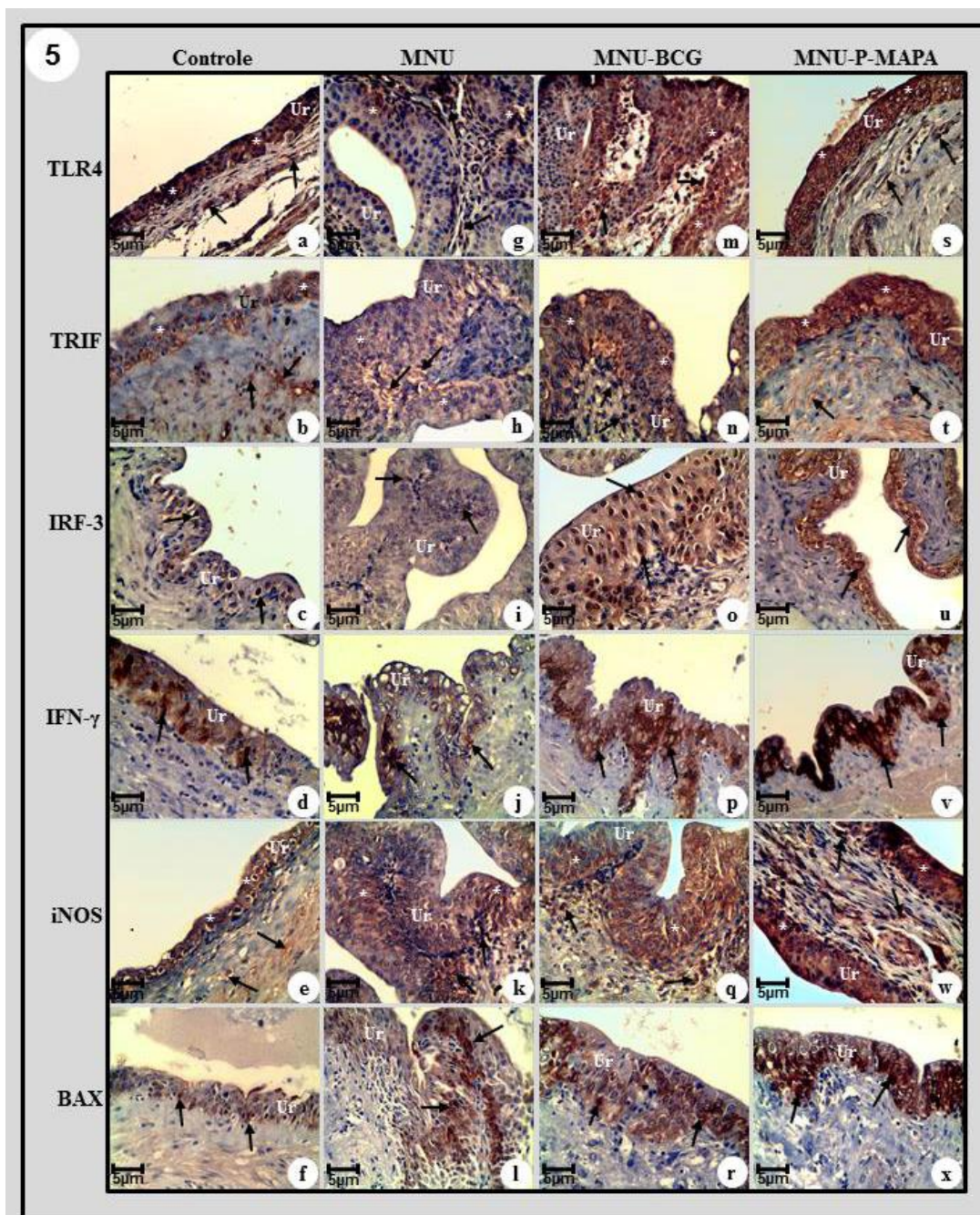


Figure 5: Imunomarcacão da bexiga urinária de animais dos grupos Controle (a, b, c, d, e, f), MNU (g, h, i, j, k, l), MNU-BCG (m, n, o, p, q, r) e MNU-P-MAPA (s, t, u, v, w, x). (a), (g), (m) e (s) imunomarcacão para TLR4 no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (b), (h), (n) e (t) imunomarcacão para TRIF no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (c), (i), (o) e (u) imunomarcacão para IRF-3 no urotélio (**setas**). (d), (j), (p) e (v) imunomarcacão para IFN- γ no urotélio (**setas**). (e), (k), (q) e (w) imunomarcacão para iNOS no urotélio (**asterisco**), lâmina própria e células da camada muscular (**setas**). (f), (l), (r) e (x) imunomarcacão para BAX no urotélio (**setas**). **a – x:** Ur – urotélio.

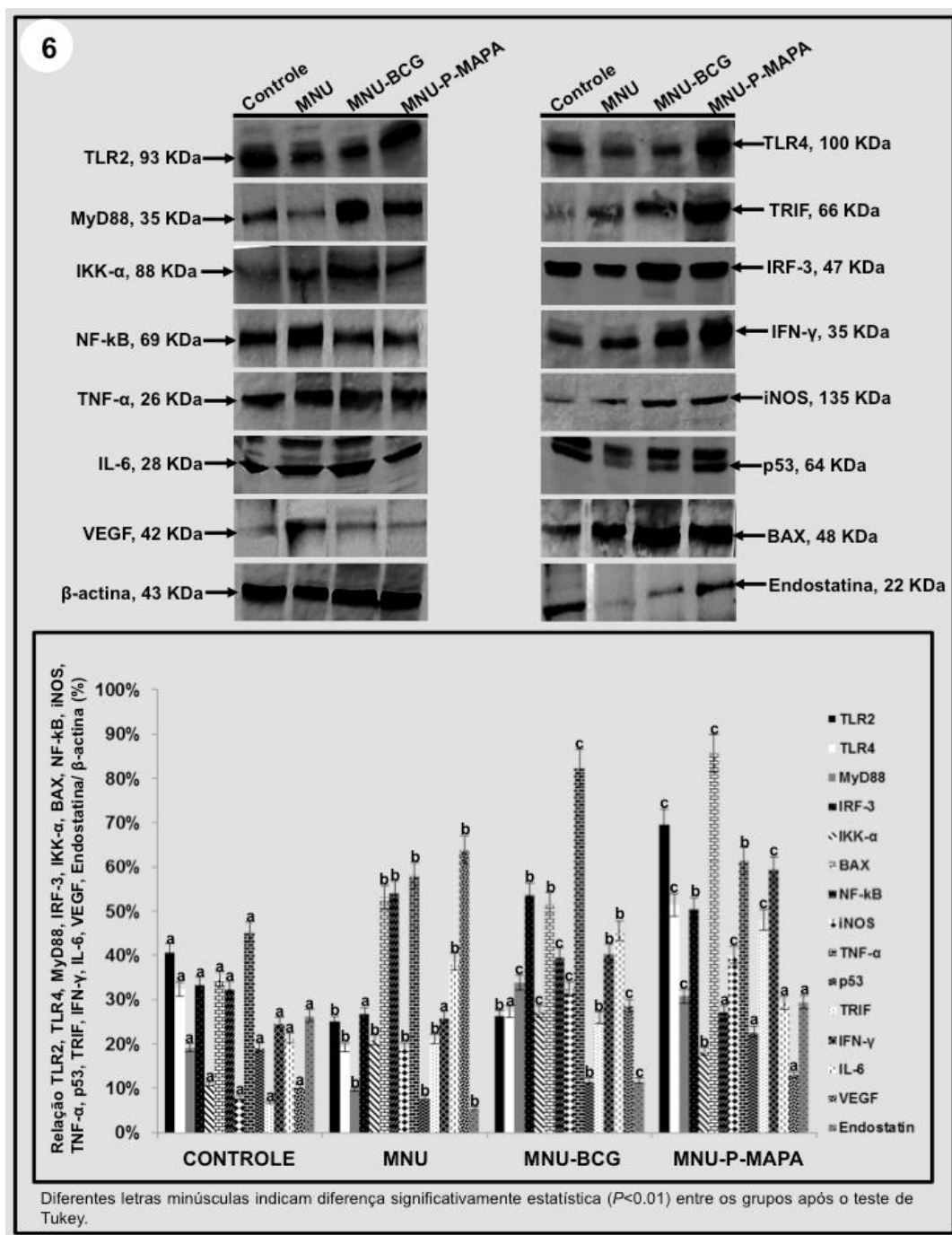


Figura 6: Representação do *Western Blotting* e determinação semiquantitativa das proteínas TLR2, TLR4, MyD88, IRF-3, IKK-α, BAX, NF-κB, iNOS, TNF-α, p53, TRIF, IFN-γ, IL-6, VEGF e Endostatina extraídas da bexiga urinária dos grupos Controle, MNU, MNU-BCG e MNU-P-MAPA. Os níveis proteicos foram identificados nos *blotts*. β-actina foi usada como controle endógeno. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ($n = 05$). Duas médias representadas por letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Tabela 3: Análises Toxicológicas e Bioquímicas (ALT, AST, Fosfatase Alcalina, Uréia e Creatinina) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	ALT (U/L)	AST (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	22,9±3,2 ^a	85,4±5,3 ^a	176,7±15,2 ^a	38,5±2,2 ^a	0,55±0,03 ^a
MNU	90,1±8,4 ^b	138,5±18,1 ^b	370,1±23,0 ^b	91,4±13,4 ^b	8,3±1,2 ^b
MNU-BCG	71,5±7,2 ^b	122,0±15,4 ^b	295,6±10,1 ^c	80,3±8,6 ^b	7,5±2,1 ^b
MNU-P- MAPA	42,4±1,8 ^c	103,8±4,8 ^c	205,9±15,6 ^d	50,4±3,3 ^c	2,1±0,12 ^c

Dados expressos como média ± desvio padrão (n=10)

Duas médias de diferentes grupos representados pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Duas médias representadas por letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

7- CONCLUSÕES

- a) A imunoterapia com P-MAPA mostrou-se mais eficaz que BCG nos parâmetros histopatológicos observados no modelo de CBNMI induzido por MNU;
- b) A imunoterapia com P-MAPA promoveu distinta ativação de TLRs 2 e 4 , resultando no aumento da via de sinalização para interferons, morte celular imunogênica e restauração dos níveis protéicos de p53. Enquanto que BCG resultou no aumento da sinalização de citocinas pró-inflamatórias, mostrando-se menos eficaz no tratamento do CBNMI quando comparada com P-MAPA.
- c) P-MAPA mostrou-se mais eficaz na indução de apoptose e na desaceleração do processo angiogênico do que BCG, onde o processo de angiogênese mostrou-se inversamente correlacionado com aumento dos níveis de TLRs, restauração de p53 e decréscimo do NF-κB.
- d) A imunoterapia com P-MAPA não apresentou sinais de toxicidade hepática, renal e cardíaca nos parâmetros avaliados, ao contrário, melhorou o perfil bioquímico no estado de câncer. BCG recuperou apenas um dos parâmetros avaliados, os níveis de fosfatase alcalina.
- e) Os presentes resultados tomados em conjunto colocam o P-MAPA como potencial candidato para o tratamento do CBNMI.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, A.; et al. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. **Cancer Res.**, v.15, p.8890-8898, 2003.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, p.499-511, 2004.

ALLAVENA, P.; et al. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. **Immunol. Rev.**, v.222, p.155–161, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Bladder Cancer Overview. In: How many people get bladder cancer? American Cancer Society, Atlanta. Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_1X_How_many_people_get_bladder_cancer_44.asp?sitearea. Acesso em 16 dez, 2013.

ASKELAND, E.J.; et al. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond, **Adv. Urol.**, v.2012, p.181987, 2012.

AYARI, C.; et al. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. **J. Urol.**, v.185, p.1915-1921, 2011.

BEN-BARUCH, A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. **Cancer Metastasis Rev.**, v.25, p.357-371, 2006.

BOHLE, A.; BRANDAU, S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. **J. Urol.**, v.170, p.964–969, 2003.

BROWN, D.H.; WAGNER, T.T.; BAHNSON, R.R. Interferons and bladder cancer. **Urol. Clin. North Am.**, v.27, p.171-178, 2000.

BROWN, G.D.; et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J. Exp. Med.**, v.197, p.1119-1124, 2003.

BROWN, N.S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential, and response to therapy of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v.3, p.323-327, 2001.

CARDILLO, M.R.; SALE, P.; DI SILVERIO, F. Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. **Anticancer Res.**, v.20, p. 4579-4583, 2000.

CHARLESWORTH, P.J.; HARRIS, A.L. Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies. **Nat. Clin. Pract. Urol.**, v.3, p.157-169, 2006.

CHEN, F.; et al. BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. **BM. Urol.**, v.5, p.8, 2005.

CHODAK, G.W.; et al. Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder or kidney cancer. **Cancer Res.**, v.48, p.2083-2088, 1988.

COHEN, S.M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. **Toxicol. Pathol.**, v.30, p.663-671, 2002.

CRALLAN, R.A.; GEORGOPOULOS, N.T.; SOUTHGATE, J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.27, p.374-381, 2006.

CROSS, M.J.; CLAESSEON-WELSH, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signaling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.22, p.201-207, 2001.

DEGENHARDT, K.; et al. BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. **Cancer Cell.**, v.2, p.193-203, 2002.

DIPAOLA, R.S.; LATTIME, E.C. Bacillus Calmette-Guerin mechanism of action: the role of immunity, apoptosis, necrosis and autophagy. **J. Urol.**, v.178, p.1840-1841, 2007.

DOLCET, X.; et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch.**, v.446, p.475-482, 2005.

DUGUAY, D.; et al. In vivo interferon regulatory factor 3 tumor suppressor activity in B16 melanoma tumors. **Cancer Res.**, v.62, p.5148-5152, 2002.

DURÁN, N.; DA-SILVA-NUNES, O. Characterization of an aggregated polymer from *Penicillium* sp. (PB-7 strain). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.23, p.1289-1302, 1990.

DURÁN, N.; et al. SB-73/P-MAPA: protein magnesium phospholipoleate-palmitoleate anhydride. **Drugs of the Future**, v.22, p.454, 1997.

DURÁN, N.; et al. SB-73: Immunomodulator Agent. **Drugs Fut.**, v.18, p.327-334, 1993.

EPSTEIN, J.L.; et al. The world health organization / international society of urological pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. bladder consensus conference committee. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.22, p.1435-1448, 1998.

FABREGAT, I.; RONCERO, C.; FERNÁNDEZ, M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. **Liver Inter.**, v.27, p.155-162, 2007.

FÁVARO, W.J.; et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on toll-like receptors and p53: potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer. **Infect. Agent. Cancer**, v.7, p.14, 2012.

FOLKMAN, J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. **Exp. Cell. Res.** v.312, p.594-607, 2006.

FOLKMAN, J.; HAHNFELDT, P.; HLATKY, L. The logic of anti-angiogenic gene therapy Friedmann T. eds. The Development of Gene Therapy, 1-17, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 1998.

FONG, G.H.; et al. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v.376, p.66-70, 1995.

FUKUSHIMA, S.; et al. Effect of l-tryptophan and sodium saccharin on urinary tract carcinogenesis initiated by N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. **Cancer Res.**, v.41, p.3100-3103, 1981.

GALLI, R.; et al. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. **J Immunol.**, v.184, p.6658-6669, 2010.

GALLUZZI, L.; et al. Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. **Cell Cycle**, v.7, p. 1949-1955, 2008.

GRIMMER, G. et al. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. **Sci Total Environ.**, v.247, p.81-90, 2000.

HALL, M.C.; et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. **J Urol.**, v.178, p.2314-2330, 2007.

HICKS, R.M.; WAKEFIELD, J.S.J. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. **Chem. Biol. Interact.**, v.5, p.139-152, 1972.

HOWLANDER, N.; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, **National Cancer Institute**. Bethesda. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/. Acesso em: 18 dez, 2013.

HUANG, B.; et al. Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. **Cancer Res.**, v.67, p.4346-4352, 2007.

HUANG, B.; et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer Res.**, v.65, p. 5009-5014, 2005.

JEGO, G.; et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. **Leukemia**, v.20, p.1130-1137, 2006.

JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M.L.S. Effects on splenic T lymphocytes in Ehrlich ascites tumor-bearing mice (EAT) induced by P-MAPA - Role of cytokines. **Int J Mol Med.**, v.4, p.S49, 1999.

JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; QUEIROZ, M.L.S. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation and cytokines profile in tumour-bearing mice treated with P-MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, v.25, p.305-319, 2003.

KIM, T.Y.; et al. Oncogenic potential of a dominant negative mutant of interferon regulatory factor 3. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.15272-15278, 2003.

KIMBRO, K.S.; SIMONS, J.W. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v.13, p.739-749, 2006.

KROFT, S.H.; OYASU, R. Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. **Lab. Invest.**, v.71, p.158–174, 1994.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int. Rev. Immunol.**, v.30, p.16-34, 2011.

KUNZE, E.; et al. Cell cycle dependence of N-methyl-N-nitrosourea-induced tumour development in the proliferating, partially resected rat urinary bladder. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.70, p.125–142, 1989.

LANDES, T.; MARTINOU, J.C. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, p. 540-545, 2011.

LIU, V.C.; et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells role of tumor-derived TGF-beta. **J. Immunol.** v. 178, p.2883-2892, 2007

LLAMBI, F.; GREEN, D.R. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. **Curr. Opin Genet. Dev.**, v.21, p.12-20, 2011.

LU, M.L.; et al. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. **Clin Cancer Res.**, v.8, p.171-179, 2002.

LUCA, M.; et al. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v.151, p.1105-1113, 1997.

LUO, J.L.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy. **J. Clin. Invest.**, v.115, pp.2625–2632, 2005.

MANTOVANI, A.; et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v.454, p.436–444, 2008.

MATIJEVIC, T.; PAVELIC, J. Toll-like receptors: cost or benefit for cancer? **Curr Pharm Des.**, v.16, p.1081-1090, 2010.

MELO, A.; JUSTO, G.Z.; QUEIROZ, M.L.S. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Hum Exp. Toxicol.**, v.20, p.38-45, 2001.

MENDELSON, J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. **J. Clin. Oncol.**, v.20, p.1-13, 2002.

- MENENDEZ, D. et al. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. **PLoS. Genet.**, v.7, p.e1001360, 2011.
- MENG, Q.; et al. Nuclear factor- κ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. **Cancer Lett.**, v.299, p.45-53, 2010.
- MICHELSSEN, K.S.; et al. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. **J. Biol. Chem.**, v.276, p. 25680-25686, 2001.
- MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. **Int. J. Surg. Pathol.**, v.13, p.143-153, 2005.
- MORALES, A.; EIDINGER, D. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. **J. Urol.**, v.115, p.377-380, 1976.
- NETTO, G.J. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? **Nat. Rev. Urol.**, v.9, p.41-51, 2011.
- NGUYEN, M.; et al. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.86, p.356-361, 1994.
- NUNES, I.; DURAN, N. Imunomodulador agregado proteico de anidrido de fosfolinoleato-palmitoleato de amônia e magnésio e processo de sua obtenção e formulação. Patente: PI0305373-3. Depósito no INPI: 06/11/2003.
- O'REILLY, M.S.; et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell.**, v.88, p.277-285, 1997.
- OKAMOTO, M.; HATTORI, K.; OYASU, R. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. **Int. J. Cancer.**, v.72, p.149-154, 1997.
- OLIVEIRA, P.A.; et. al. Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. **Exp. Oncol.**, v.28, p.2-11, 2006.
- OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, p.747-755, 1995.
- PAHL, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v.18, p.6853-6866, 1999.
- PAVLOVICH, C.P; et al. BCG-induced urinary cytokines inhibit microvascular endothelial cell proliferation. **J. Urol.**, v.163, p.2014-2021, 2000.
- PERABO, F.G.; et al. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. **Anticancer Res.**, v.25, p.3565-3573, 2005.

PHAM, C.G.; et al. Ferritin heavy chain up regulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. **Cell.**, v.119, p.529–542, 2004.

PIKARSKY, E.; et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v.431, p.461-466, 2004.

POOK, S.H.; ESUVARANATHAN, K.; MAHENDRAN, R. N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized Mycobacterium bovis in human bladder cancer cells. **J. Urol.**, v.168, p.780–785, 2002.

PRESTA, M.; et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.16, p.159-178, 2005.

PROCTOR, M.J.; et al. The relationship between the presence and site of cancer, an inflammation-based prognostic score and biochemical parameters. Initial results of the Glasgow Inflammation Outcome Study. **Br. J. Cancer**, v.103, p.870-876, 2010.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.9, p.57–63, 2009.

RAVI, R.; et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . **Genes Dev.**, v. 14, p. 34-44, 2000.

REIS, L.O.; et al. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder. **Cancer**, v.187, p.438-445, 2012.

REIS, L.O.; et al. Experimental animal model and RNA interference: a promising association for bladder cancer research. **World J. Urol.**, v.27, p.353-361, 2009.

SALAUN, B.; et al. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? **Clin. Cancer Res.**, v.13, p.4565–4574, 2007.

SCHAMHART, D.H.; et al. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. **Eur. Urol.**, v.37, p.16-23, 2000.

SCHMIDT, A.; ADDICKS, K.; BLOCH, W. Opposite effects of endostatin on different endothelial cells. **Cancer Biol. Ther.**, v.3, p.1162-1198, 2004.

SEGUCHI, T.; et al. Interleukin-6 activity in urine and serum in patients with bladder carcinoma. **J. Urol.**, v.148, p.791-794, 1992.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p.721-732, 2003.

SEOW, S.W.; et al. Lactobacillus species is more cytotoxic to human bladder cancer cells than Mycobacterium bovis (bacillus Calmette-Guerin). **J. Urol.**, v.168, p.2236-2239, 2002.

SHARIAT, S.F.; et al. p53 predictive value for pT1-2 N0 disease at radical cystectomy. **J. Urol.**, v.182, p.907-913, 2009.

SHIBUYA, M.; CLAESON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp. Cell Res.**, v.312, p. 549-560, 2006.

SHIMADA, K.; et al. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. **BMC Urol.**, v.11, p.22, 2011.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics 2012. **CA Cancer J. Clin.**, v.62, p.10-29, 2012.

SINGH, R.; PERVIN, S.; CHAUDHURI, G. Caspase-8-mediated BID cleavage and release of mitochondrial cytochrome c during Nomega-hydroxy-L-arginine-induced apoptosis in MDA-MB-468 cells. Antagonistic effects of L-ornithine. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.37630-37636, 2002.

SONG, J.; et al. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. **PLoS Pathog.**, v.3, p. 60, 2007.

SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H.H. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. **Neoplasia**, v.11, p.615–628, 2009.

STEINBERG, G.D.; et al. Characterization of an N-methyl-N-nitrosurea induced autochthonous rat bladder cancer model. **Cancer Res.**, v.50, p.6668-6741, 1990.

STREETER, E.H.; HARRIS, A.L. Angiogenesis in bladder cancer prognostic marker and target for future therapy. **J. Surg. Oncol.**, v.11, p.85-100, 2002.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.**, v.16, p.3-9, 2004

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.21, p.335-376, 2003.

TEODORO, J. G.; et al. P53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. **Science**, v.313, p.968-971, 2006.

TIGUERT, R. et al., Structural alteration of p53 protein in patients with muscle invasive bladder transitional cell carcinoma. **J. Urol.**, v.166, p.2155-2160, 2001.

TSUJII, S.; et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. **Infect. Immun.**, v.68, p.6883-6890, 2000.

WALSH, P.C. et al. **Campbell's urology, sixth edition**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

WILLIAMS, P.D.; LEE, J.K.; THEODORESCU, D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. **Neoplasia**, v.10, p.838–846, 2008.

ZEEGERS, M.P.; et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. **Cancer**, v.89, p.630–639, 2000.

ZHANG, Y.; et al. Changing patterns of bladder cancer in the USA: evidence of heterogeneous disease. **BJU Int.**, v.109, p.52-56, 2012.

9- ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "**Vias de sinalização dos receptores Toll-Like e p53 regulam a angiogênese e apoptose no câncer de bexiga não-músculo invasivo: efeitos do imunomodulador P-MAPA**":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2684-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Amanda Pocol Carniato
Aluna: Amanda Pocol Carniato

Wagner José Favar
Orientador: Wagner José Fávoro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura