



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOÃO CARLOS CARDOSO ALONSO

EFEITOS DA IMUNOTERAPIA COM ONCOTHERAD® (MRB-CFI-1) NO
TRATAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO
INVASIVO RECIDIVADO À TERAPIA COM *BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN* (BCG)
E/ OU QUIMIOTERAPIA INTRAVESICAL

CAMPINAS
2020

JOÃO CARLOS CARDOSO ALONSO

**EFEITOS DA IMUNOTERAPIA COM ONCOTHERAD® (MRB-CFI-1) NO
TRATAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO
INVASIVO RECIDIVADO À TERAPIA COM BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG)
E/ OU QUIMIOTERAPIA INTRAVESICAL**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
JOÃO CARLOS CARDOSO ALONSO, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. WAGNER JOSÉ
FÁVARO

CAMPINAS
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

AL72e Alonso, João Carlos Cardoso, 1972-
Efeitos da imunoterapia com OncoTherad® (MRB-CFI-1) no tratamento de pacientes com câncer de bexiga não-músculo invasivo recidivado à terapia com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical / João Carlos Cardoso Alonso. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Wagner José Fávoro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da bexiga. 2. OncoTherad®. 3. Imunoterapia. 4. Nanotecnologia. I. Fávoro, Wagner José, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of OncoTherad® (MRB-CFI-1) immunotherapy in the treatment of patients with relapsed non-muscle invasive bladder cancer after *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) and/ or intravesical chemotherapy

Palavras-chave em inglês:

Bladder neoplasms

OncoTherad®

Immunotherapy

Nanotechnology

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Wagner José Fávoro [Orientador]

Fabiano André Simões

Paulo Eduardo Pizão

José Carlos Souza Trindade Filho

Rafael Ferreira Coelho

Data de defesa: 09-09-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3064-0602>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0928472241648469>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JOÃO CARLOS CARDOSO ALONSO

ORIENTADOR: WAGNER JOSÉ FÁVARO

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO**
 - 2. PROF. DR. FABIANO ANDRÉ SIMÕES**
 - 3. PROF. DR. PAULO EDUARDO PIZAO**
 - 4. PROF. DR. JOSE CARLOS SOUZA TRINDADE FILHO**
 - 5. PROF. DR. RAFAEL FERREIRA COELHO**
-

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 09/09/2020

DEDICATÓRIA

À Deus...

O Senhor é o meu pastor, nada me faltará". (Salmo 23)

Aos meus pais: João Alonso e Maria Benita.

Minha eterna gratidão pela educação, pelo amor, pelas orações e apoio incessante na minha vida, sempre seguindo meus passos. O Salmo acima é uma tradução do que significam para mim. Que eu consiga seguir o vosso exemplo.

À minha esposa e filhos: Anieli, Mariana e Lucas.

Pelo apoio e compreensão infinitos. Que o nosso amor sempre transcenda às minhas falhas e ausências. Que eu continue me aprimorando com os seus gestos, virtudes e exemplos, e desfrutemos sempre do afago e aconchego da nossa família. Vocês são meu Porto Seguro, e principal razão para continuar.

Aos meus irmãos: Maria Isabel e Fernando Lucas.

Meus pilares da família. Obrigado pelo amparo, afeto, exemplo e carinho de sempre. Que estejamos sempre juntos.

À minha avó: Maria Clarinda.

Minha segunda mãe e grande incentivadora. Essencial à minha formação e inquestionável exemplo de mulher forte e guerreira.

À todos da minha família: Sobrinhos, meu afilhado (João Gabriel), tios, tias, cunhados, primos, minha afilhada (Isabela) e meus avós (João, Izabel e Júlio), que já se encontram acolhidos por Deus, muito obrigado pelo apoio e carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

À **todos os pacientes**, em especial aos que participaram deste estudo, peças fundamentais para o avanço da ciência e melhoria da qualidade de vida e bem estar da humanidade.

Ao **Prof. Dr. Wagner José Fávaro**, orientador e amigo. Reconheço aqui o seu perfil incontestável de professor dedicado e atento ao seu trabalho. Minha gratidão eterna por me conduzir e incitar o meu interesse acadêmico, contribuindo com bravura para o meu crescimento intelectual.

Ao **Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero**, pela amizade e valiosa colaboração, na elaboração e disponibilização do imunoterápico OncoTherad®, para esse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Athanase Billis**, pela sua Coorientação e preciosa contribuição nas análises anatomopatológicas.

À **FAPESP, CNPq e FAEPEX**, pelos auxílios, o que tornou possível à execução e elaboração desse trabalho.

À **Prefeitura Municipal de Paulínia, Secretaria Municipal de Saúde e Hospital Municipal de Paulínia**, pelo espaço e estrutura cedidos, além do apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

Ao **Serviço de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas/ Unicamp**, pela colaboração e análise estatística.

Aos Membros da Banca:

Qualificação: Professores Doutores Lísias Nogueira Castilho, José Andres Yunes, Adriano Fregonesi e Marcelo Lopes de Lima.

Defesa: Professores Doutores Fabiano André Simões, José Carlos Souza Trindade Filho, Paulo Eduardo Pizão, Rafael Ferreira Coelho, Lísias Nogueira Castilho, Adriano Fregonesi e Marcelo Lopes de Lima. Meus mais sinceros agradecimentos pela participação de todos, por dedicarem seu tempo e suas valiosas considerações.

Aos amigos e colegas de trabalho: Dr. Ronald Finamor Rejowski, Dr. Leonardo Oliveira Reis, Dr. Fábio Guimarães, Dr. Adriano Cintra, Dr. Juliano Cesar Moro, pelo apoio de sempre e amizade.

Ao Enfermeiro Humberto Alves Ferrari e à Téc. de Enfermagem Magali Codogno Maciel, muito obrigado por toda ajuda na condução dos pacientes, agendamentos, orientações gerais, sempre com muita dedicação e dignidade. Palavras seriam poucas para expressar toda a minha gratidão a vocês.

Aos Técnicos de Enfermagem, Ana Carolina Trautvein, João Batista, Walker Laranja, pelo apoio e amizade de sempre. **Às Recepcionistas, Edna Aparecida Gambini, Silvia Helena de Oliveira, Marlete Bispo,** pelo exemplar atendimento e acolhida ao paciente.

À Bioquímica e Psicóloga Dra. Juliana Mattoso, pelo valioso apoio com o manejo das imunoterapias, transporte e auxílio com os pacientes, fundamental para o seguimento desse trabalho.

À Dra. Ianny Brum Reis, pela disposição e prontidão de sempre, ajuda no tratamento dos pacientes e apoio na revisão da tese.

À Dra. Ana Deckmann e Doutorandas Bianca Ribeiro e Ianny Brum Reis, pela participação e apoio na administração da imunoterapia e análises morfofuncionais.

À toda equipe da Saúde do Homem de Paulínia, Diretoria do Hospital, Superintendência, Chefes de Departamentos, Médicos, Enfermeiros, Técnicos de Enfermagem e Funcionários, meus agradecimentos pelo incentivo e participação direta ou indireta nesse trabalho.

RESUMO

As novas modalidades de tratamento para pacientes com câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) de alto grau, para os quais a terapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) falhou ou está contraindicada, estão aumentando devido ao desenvolvimento de novos medicamentos. A imunoterapia se tornou uma terapia promissora contra o câncer, melhorando o prognóstico de pacientes com diferentes tipos de cânceres e oferecendo a possibilidade de remissão da doença a longo prazo. Uma vez que o CBNMI é sensível à imunoterapia, os imunomoduladores que atuam como agonistas do sistema imunológico são considerados candidatos promissores para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o CBNMI, sem os efeitos colaterais que os acompanham. Nesse cenário, uma nova perspectiva é representada pela nanoimunoterapia OncoTherad®. OncoTherad® é um complexo de fosfato inorgânico nanoestruturado associado à proteína glicosídica, desenvolvido pela Universidade Estadual de Campinas/ Brasil, que apresenta propriedades imunomoduladoras e antitumorais. Assim, os objetivos desse estudo foram avaliar a segurança e a eficácia da nanoimunoterapia OncoTherad® para pacientes com CBNMI recidivado após BCG e/ ou quimioterapia intravesical. Nós conduzimos um estudo prospectivo, unicêntrico (Hospital Municipal de Paulínia, São Paulo, Brasil), de braço único, fase I/ II (Ensaio clínico: RBR-6swqd2) em 29 (18 homens, 11 mulheres) pacientes consecutivos com CBNMI recidivado (≥ 1 ciclo prévio de BCG e/ ou quimioterapia intravesical). O esquema terapêutico com OncoTherad® baseou-se em uma aplicação semanal pelas vias intravesical (120 mg/mL) e intramuscular (25 mg/mL) por 6 semanas consecutivas, seguido por uma aplicação a cada 15 dias por 3 meses e, uma aplicação mensal até o final do tratamento (24 meses). O seguimento foi realizado com biópsias sistemáticas da bexiga, cistoscopias e ultrassonografias. Os desfechos primários foram a resposta patológica completa (RPC) e sobrevida livre de recidiva (SLR). A recorrência foi definida como recidiva tumoral comprovada histologicamente (qualquer grau) e monitorada em intervalos trimestrais. Os desfechos secundários foram o tempo de recidiva da doença, duração da resposta e segurança da imunoterapia. A idade média dos 29 pacientes e o tempo de seguimento foram de 65 anos (34 - 96) e 24 meses, respectivamente. O tratamento com OncoTherad® mostrou RPC de 79,3% e SLR de 22,2 meses no seguimento de 24 meses. A duração da resposta e o tempo médio de recidiva da doença foram de 15,3 meses e 20,6 meses (ou 618 dias), respectivamente. Em relação à toxicidade, 62,1% dos eventos adversos foram de Graus 1 ou 2, sendo os mais comumente relatados: disúria (51,7%), cistite (34,5%), prurido (44,8%), rash cutâneo (27,6%), artralgia (27,6%) e fadiga (27,6%). Ainda, a nanoimunoterapia OncoTherad® levou à formação de folículos linfóides primários (PLFs) na maioria dos pacientes (51,7%) durante os 24 meses de seguimento. As imunorreatividades para TLR4, TRIF, IRF-3, IFN- γ e iNOS foram significativamente intensas nas regiões dos PLFs presentes nas amostras vesicais de pacientes tratados com OncoTherad® após 24 meses de seguimento em relação às amostras de tecido vesical que precederam o tratamento. Assim, pode-se concluir que a nanoimunoterapia OncoTherad® parece ser uma opção de tratamento segura e eficaz para pacientes com CBNMI recidivado após BCG e/ ou quimioterapia intravesical e, pode fornecer benefícios para prevenir a recidiva tumoral. Além disso, este estudo demonstrou um importante efeito de ativação da via de sinalização do TLR4 desencadeada pelo OncoTherad® na formação e organização dos PLFs, os quais podem estar relacionados aos efeitos antitumorais e imunoprotetores dessa imunoterapia no tecido vesical.

Palavras-chave: Câncer de Bexiga; Nanotecnologia; OncoTherad®; Imunoterapia.

ABSTRACT

The new modalities for treating patients with high-grade non-muscle invasive bladder cancer (HGNMIBC) for whom *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) has failed or is contraindicated are recently increasing due to the development of new drugs. Immunotherapy has become a promising cancer therapy, improving the prognosis of patients with many different types of cancer and offering the possibility for long-term cancer remission. Since HGNMIBC is sensitive to immunotherapy, immunomodulators that act as agonists of the immune system are considered promising candidates for the development of more effective treatments for HGNMIBC without the accompanying side-effects. In this scenario, a new perspective is represented by OncoTherad® nano-immunotherapy. OncoTherad® is a nanostructured inorganic phosphate complex associated with glycosidic protein, developed by the University of Campinas/ Brazil, which exhibits immunomodulatory and antitumor properties. Thus, the aims of the study were to evaluate the safety and efficacy of OncoTherad® nano-immunotherapy for BCG-relapsed and/ or intravesical chemotherapy-relapsed HGNMIBC. We carried out a prospective, single-center (Municipal Hospital of Paulinia, São Paulo, Brazil), single-arm phase I/ II study (Clinical Trial: RBR-6swqd2) in 29 (18 male, 11 female) consecutive patients with HGNMIBC-relapsed (≥ 1 previous course of BCG and/ or intravesical chemotherapy). The schedule was initiated with weekly intravesical (120 mg/mL) and intramuscular (25 mg/mL) OncoTherad® treatment for 6 weeks, followed by one every other week application for 3 months and, one monthly application until the end of the treatment (24 months). Follow-up was performed with systematic mapping biopsies of the bladder, cystoscopy, and ultrasound. The primary endpoints were pathological complete response (pCR) and recurrence-free survival (RFS). The recurrence was defined as histology proven tumor recurrence (any grade) and monitored at 3-month intervals. Secondary endpoints were time to disease recurrence, duration of response, and safety response. The median age of the 29 patients and follow-up were 65 years (range 34-96) and 24 months, respectively. OncoTherad® treatment showed pCR of 79.3% and RFS of 22.2 months at 24-month follow-up. The duration of response and meantime for disease recurrence were 15.3 months and 20.6 months (or 618 days), respectively. Regarding toxicity, 62.1% of adverse events were Grade 1 or 2. The most commonly reported treatment-related adverse events were dysuria (51.7%), cystitis (34.5%), pruritus (44.8%), rash (27.6%), arthralgia (27.6%) and fatigue (27.6%). Also, OncoTherad® nano-immunotherapy led to the formation of primary lymphoid follicles (PLFs) in most patients (51.7%) at 24-months follow-up. TLR4, TRIF, IRF-3, IFN- γ and iNOS immunoreactivities were significantly intense in the regions of PLFs present in the bladder samples from patients treated with OncoTherad® after 24-months follow-up in relation to bladder tissue samples that preceded OncoTherad® treatment. In conclusion, OncoTherad® nano-immunotherapy seems a safe and effective treatment option for BCG-relapsed and/ or intravesical chemotherapy-relapsed HGNMIBC patients and may provide benefit for preventing tumor recurrence. Also, this study demonstrated an important effect of activation of the TLR4 signaling pathway triggered by OncoTherad® in the formation and organization of PLFs, which may be related to antitumor and immunoprotective effects from this immunotherapy in bladder tissue.

Keywords: Bladder Cancer; Nanotechnology; OncoTherad®; Immunotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Esquema da via de sinalização do sistema imune mediada por TLR2 e TLR4. Modificado de Liu et al. (2014).27
- Figura 2: Avaliação do número de recidivas antes (oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical) e após o tratamento com OncoTherad® durante os 24 meses de seguimento.56
- Figura 3: Ultrassonografias, Cistoscopias e Fotomicrografia representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hiperecótica ovalada de contornos levemente ovalados, medindo 3,0 x 1,0 x 0,9 cm na parede lateral esquerda; (B) imagem cistoscópica confirmando lesão vegetante > 3 cm na parede lateral esquerda. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (C), (D) bexiga com paredes regulares e mucosa vesical livre de lesões vegetantes, apresentando apenas cicatrizes prévias de Ressecção Transuretral (RTU). (E) Histologia normal: Urotélio composto por 2-4 camadas: uma camada apical composta por células em guarda-chuva, uma camada intermédia de células e uma camada de células basais; Lâmina própria composta por fibras colágenas, fibras musculares lisas e vasos sanguíneos.61
- Figura 4: Ultrassonografias, Cistoscopia e Fotomicrografias representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hiperecótica, medindo 3,1 x 1,44 cm no assoalho vesical. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (B) imagem ultrassonográfica revelando bexiga de paredes finas e delgadas, com conteúdo anecótico e homogêneo; (C) imagem cistoscópica revelando lesão plana (círculo) < 3cm em assoalho vesical, caracterizada por cistite crônica folicular; (D), (E) Fotomicrografias da mesma lesão plana encontrada na cistoscopia: folículo linfóide primário (círculo) caracterizado pela presença de centro germinativo contendo linfócitos, além de centrócitos (pequenos e clivados), centroblastos (grandes e nucléolos) e macrófagos.62
- Figura 5: Ultrassonografias, Cistoscopias e Fotomicrografias representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hiperecótica ovalada de contornos levemente ovalados, medindo 4,2 x 1,6 x 2,2 cm na parede anterossuperior; (B) imagem cistoscópica confirmando lesão vegetante volumosa > 3 cm na parede anterossuperior. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (C) imagem ultrassonográfica revelando bexiga de paredes finas e delgadas, com conteúdo anecótico e homogêneo; (D) mucosa vesical apresentando lesão com projeções curtas e esparsas (círculo), caracterizada histologicamente em (E), (F) como tecido de granulação (cistite erosiva + tecido de granulação).63
- Figura 6 (6a – 6l): Imunomarcações representativas da bexiga urinária antes do tratamento com OncoTherad® (a, c, e, g, i, k) e após o seguimento de 24 meses com OncoTherad® (b, d, f, h, j, l). (a), (b) Imunomarcação para TLR2 no urotélio e região do PLF. (c), (d) Imunomarcação para TLR4 no urotélio e região do PLF. (e), (f), Imunomarcação para TRIF no urotélio e região do PLF. (g), (h) Imunomarcação para IRF-3 no urotélio e região do PLF. (i), (j) Imunomarcação para IFN- γ no urotélio e região do PLF. (k), (l) Imunomarcação para iNOS no urotélio e região do PLF. a – l: Lp – lâmina própria, PLF – folículo linfóide primário, Ur – urotélio.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação TMN do Câncer de Bexiga	20
Tabela 2: Características dos anticorpos primários para imunomarcção.....	47
Tabela 3: Características básicas do estudo (N= 29).....	51
Tabela 4: Frequências gerais das variáveis categóricas (estadiamento/ gradação histológica, focalidade e tamanho dos tumores) e medidas descritivas das variáveis quantitativas (número de recidivas e tempo da última recidiva) após tratamento com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical.....	52
Tabela 5: Frequências gerais das variáveis categóricas (estadiamento/ gradação histológica, focalidade e tamanho dos tumores, resposta patológica completa) e medidas descritivas das variáveis quantitativas (número de recidivas, sobrevida livre de recidiva e duração da resposta) durante os 24 meses de tratamento com OncoTherad®.	55
Tabela 6: Avaliação da gradação histológica, tamanho e focalidade dos tumores antes (oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical) e após o tratamento com OncoTherad®.....	57
Tabela 7: Respostas terapêuticas teciduais do OncoTherad® ao final dos 24 meses de seguimento (N= 29).	60
Tabela 8: Média da intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos na bexiga urinária Antes e Após o tratamento com OncoTherad®.....	65
Tabela 9: Reações adversas em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga submetidos ao tratamento intravesical e intramuscular com OncoTherad®.	69
Tabela 10: Comparação dos parâmetros sorológicos bioquímicos antes e após o tratamento com OncoTherad®.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva no seguimento de 24 meses do tratamento com OncoTherad®.	58
Quadro 2: Ocorrência de algum tipo de reação adversa segundo o grau de intensidade.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ad-IFN α – Interferon Adenoviral Alfa

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCG – *Bacillus Calmette-Guerin*

CAR-T – Receptores Antigênicos Quiméricos

CB – Câncer de bexiga

CBNMI – Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo

CpG – Oligonucleotídeos

CTLA-4 – Proteína 4 do Linfócito T citotóxico

DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos

ERKs – Proteínas Quinases Reguladoras de Sinalização Extracelular

FDA – *Food and Drug Administration*

GMCSF – Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos

ICAM – Moléculas de Adesão Intercelular

IFN – Interferon

IFN α – Interferon Alfa

IL1 – Interleucinas 1

IL-6 – Interleucinas 6

ILs – Interleucinas

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INF- γ – Interferon gama

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IPT – Inibição da Progressão Tumoral

IRF – Fatores Regulatórios de Interferon

IRF3 – Fator Regulatório de Interferon 3

JNKs – Proteínas Quinases c-jun-N-terminal

MAPKs – Proteínas-quinases Ativadas por Mitógeno

MDSC – Células Supressoras Derivadas da Linhagem Mielóide

MNU – *N-metil-N-nitrosouréia*

MRB-CFI-1 – Complexo Fosfato Inorgânico 1

MyD88 – Fator 88 de Diferenciação Mielóide

NF- κ B – Fator de Transcrição Nuclear κ B

NK – Células *Natural Killer*

NSCLC – Câncer de Pulmão Não-Pequenas Células

OPG – Osteoprotegerina

PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PD-1 – Receptor de Morte Celular Programada 1

PDL-1 – Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 1

PLFs – Folículos Linfóides Primários

PRRs – Receptores de Reconhecimento de Patógenos

RANK – Receptor Ativador de NF- κ B

RANKL – Ligante do Receptor Ativador de NF- κ B

RC – Resposta Completa

RCP – Resposta Patológica Completa

RTU – Ressecção Transuretral

SED – Sem Evidência de Doença

SLP – Sobrevida Livre de Progressão

SLR – Sobrevida Livre de Recidiva

STING – Fator Estimulador do Complexo de Genes de Interferon

SUS – Sistema Único de Saúde

TCR – Receptores de Células T

TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico-Pirúvica

TLR4 – *Toll-Like Receptor 4*

TLRs – Toll-Like Receptors

TMB – Carga Mutacional

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

TRAM – Proteína de Membrana Associada à Cadeia de Translocação

TRIF – Adaptador Indutor de Interferon- β contendo domínio TIR

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1- Câncer de Bexiga Urinária (CB).....	18
1.2- Imunoterapia antineoplásica	22
1.3- Importância dos receptores Toll-like e das vias de sinalização relacionadas	25
1.4- Tratamento primário do CBNMI: Ressecção Transuretral (RTU) e imunoterapia com Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	29
1.5- Nanopartículas aplicadas ao tratamento do câncer.....	32
1.5.1- Nova perspectiva para o tratamento do CBNMI: uso da imunoterapia com OncoTherad®	34
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	37
2.1- Justificativa e condições de uso da imunoterapia com OncoTherad® no CBNMI	37
2.2- Objetivos.....	42
2.2.1- Gerais	42
2.2.2- Específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1- Produção e caracterizações físico-químicas do OncoTherad®.....	43
3.2- Tratamento farmacológico de pacientes com CBNMI: uso da imunoterapia com OncoTherad®.....	43
3.3- Avaliação da eficácia terapêutica à imunoterapia OncoTherad®.....	44
3.4- Critérios de inclusão e exclusão	45
3.4.1- Critérios de inclusão.....	45
3.4.2- Critérios de exclusão	45
3.5- Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas	45
3.6- Análises Toxicológicas da Imunoterapia com OncoTherad®.....	48
3.7- Análises Estatísticas	48
3.8- Financiamento.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1- Características dos pacientes	50

4.2- Imunoterapia com OncoTherad® foi eficaz no tratamento do CBNMI, promovendo elevadas taxas de Resposta Patológica Completa (RPC) e aumento na Sobrevida Livre de Recidiva (SLR) e Tempo de Recidiva da Doença no seguimento de 24 Meses	53
4.3- Imunoterapia com OncoTherad® promoveu alterações cistoscópicas e teciduais não-neoplásicas na bexiga urinária ao final dos 24 meses de seguimento	59
4.4- Imunoterapia com OncoTherad® estimulou a via de sinalização do TLR4 para produção de interferon e induziu a formação de folículos linfóides primários após 24 meses de seguimento.....	64
4.5- Imunoterapia com OncoTherad® causou efeitos colaterais leves e moderados durante os 24 meses de seguimento.....	67
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. ANEXOS.....	99
ANEXO 1 – Termo de Consentimento	99
ANEXO 2 – Parecer CEP UNICAMP	105
ANEXO 3 – Registro Brasileiro de Ensaio Clínico	107
ANEXO 4 – Critério para Efeitos Adversos NCI	108
ANEXO 5 – Financiamento FAPESP.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1- Câncer de Bexiga Urinária (CB)

O câncer de bexiga (CB) é um dos tumores mais comuns do sistema urinário, além do nono câncer mais comum em todo o mundo, com uma incidência de aproximadamente 430.000 casos por ano (Antoni et al., 2017; Jahrreiss et al., 2020). A taxa de mortalidade do CB ocupa a 13ª posição, sendo maior nos países desenvolvidos (Antoni et al., 2017; Siegel et al., 2019).

Estima-se que 81.400 novos casos de CB (62.100 homens e 19.300 mulheres) serão diagnosticados nos Estados Unidos em 2020, com aproximadamente 17.980 mortes (13.050 homens e 4.930 mulheres) ocorrendo durante esse mesmo período (Siegel et al., 2019; *American Cancer Society*, 2020). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para o Brasil em 2020 será de 10.640 casos novos de CB, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres (INCA, 2020). Em 2017, o número de mortes notificadas por CB no Brasil foi de 4.335, sendo 3.021 homens e 1.334 mulheres, demonstrando um aumento significativo da prevalência deste tumor nos últimos anos (INCA, 2020).

Aproximadamente 70% - 75% dos pacientes com CB apresentam inicialmente o fenótipo não-músculo invasivo (CBNMI), o qual está confinado ao urotélio como tumor papilífero (pTa) ou carcinoma *in situ* (pTis) sem invasão estromal ou, invasão limitada à lâmina própria (pT1) (Askeland et al., 2012; Lamm et al., 2014). O CBNMI constitui um grupo heterogêneo de tumores com diferentes taxas de progressão para o fenótipo músculo invasivo, variando de 0,8% a 50% em 5 anos (Sylvester et al., 2006; van Rhijn et al., 2009). Estudos anteriores sugerem que importantes fatores de risco para a progressão do CBNMI são a presença concomitante de CIS (*in situ*), alto grau e estadió T1 (Sylvester et al., 2006; van Rhijn et al., 2009). Além disso, multiplicidade, tamanho tumoral ≥ 3 cm e histórico de recorrência são considerados fatores de risco (Sylvester et al., 2006; van Rhijn et al., 2009).

O CB acomete preferencialmente indivíduos adultos idosos, na proporção de 10:3 para homens e mulheres, respectivamente (Nezos et al., 2009). Ainda, o aumento da doença está diretamente relacionado com a idade, com mais de 90% após os 55 anos, sendo que após os 80 anos representa a quarta causa de morte (Lynch &

Cohen, 1995). Estima-se que em 2020, 1 em cada 5 pessoas tenham mais de 65 anos de idade. Após os 65 anos, a incidência do CB aumenta em 11 vezes e sua mortalidade, em 15 vezes (Siegel et al., 2012).

O estadiamento histológico do CB é determinado pela profundidade de invasão tumoral na parede vesical e dependerá da ressecção transuretral (RTU) do tumor para seu correto diagnóstico. Fragmentos de RTU superficiais e profundos devem ser analisados separadamente (Epstein et al., 1998; Epstein, 2003). A classificação TNM 2009 (*UICC - Union for Cancer Control*) é utilizada para o estadiamento (**Tabela 1**).

A exposição a carcinógenos exógenos e as interações gene-carcinógeno aumentam o risco de CB (DeGeorge et al., 2017). A ocorrência da doença parece ser mais alta nos países desenvolvidos, devido a diferentes exposições a agentes cancerígenos e expectativa de vida aumentada para desenvolver a malignidade. De fato, as diferenças regionais na ocorrência do CB demonstraram estar ligadas à exposição diferencial a carcinógenos do tabagismo, bem como a riscos ocupacionais e ambientais (Poon et al., 2015; Rosenquist & Grollman, 2016; Xu et al., 2017). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CB incluem gênero masculino, raça branca, tabagismo, histórico pessoal ou familiar de CB, radiação pélvica, exposições ambientais/ ocupacionais, exposição a certos medicamentos, infecção crônica ou irritação do trato urinário e certas condições médicas, incluindo obesidade e diabetes (Stopiglia et al., 2015; Antoni et al., 2017; DeGeorge et al., 2017; Xu et al., 2017). Embora o diabetes *mellitus* pareça estar associado a um risco elevado de desenvolver CB (Xu et al., 2017), o tratamento com metformina pode estar associado a um melhor prognóstico em pacientes diabéticos com CB (Hu et al., 2018). Certas síndromes genéticas, principalmente a síndrome de Lynch, também pode predispor um indivíduo ao carcinoma urotelial (Carlo et al., 2019).

O tabagismo é o principal fator de risco para o CB (Zeegers et al., 2000; Cumberbatch et al., 2016; Jahrreiss et al., 2020). O risco relativo total (RR) de incidência do CB mostrou ser de 2,58 para todos os fumantes, de 3,47 a 2,04 para fumantes atuais e ex-fumantes, respectivamente (Cumberbatch et al., 2016). Quase metade de todos os pacientes com CB tem histórico de tabagismo (Kispert et al., 2019; Pezzuto et al., 2019). O cigarro de tabaco possui altas concentrações de carcinógenos conhecidos, como aminas aromáticas e compostos *N-nitrosos* análogos do MNU (*N-*

metil-N-nitrosouréia). Além disso, mais de 5.000 substâncias tóxicas estão presentes na fumaça do cigarro, algumas são potentes carcinógenos que alteram genes como *K-ras* e *p53* (Stern et al., 2009).

Tabela 1: Classificação TMN do Câncer de Bexiga

CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE BEXIGA	
Tumor primário: T	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de Tumor primária
Ta	Carcinoma papilar não invasivo (restrito a mucosa)
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com invasão subepitelial (invasão da lâmina própria)
T2: Tumor com invasão da musculatura própria	
pT2a	Superficial (metade interna)
pT2b	Profunda (metade externa)
T3: Tumor invade tecido perivesical	
pT3a	Microscopicamente
pT3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4: Tumor invade qualquer órgão adjacente	
pT4a	Tumor invade próstata, útero ou vagina
pT4B	Tumor invade a parede pélvica-abdominal
Linfonodos Regionais (N)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
NO	Nenhuma metástase para linfonodo regional
N1	Metástase linfonodos ≤ 2cm
N2	Metástase linfonodos ≤ 5cm
N3	Metástase linfonodos ≥ 5cm
Metástases a Distância (M)	
MX	Metástases a distância não podem ser avaliadas
M0	Nenhuma metástase a distância
M1	Metástases a distância

Fonte: UICC - Union for Cancer Control, 2009

O tabagismo não está associado apenas ao risco de desenvolvimento do CB, mas também a uma taxa mais alta de recorrência e progressão da doença, falha na resposta terapêutica e mortalidade (Rink et al., 2015; Jahrreiss et al., 2020). Dados recentes demonstraram que tabagistas inveterados têm menor probabilidade de responder à quimioterapia sistêmica à base de platina (Boeri et al., 2019). Boeri et al. (2019) constataram que o tabagismo teve uma associação significativa com a menor taxa de resposta terapêutica à quimioterapia; uma vez que 73,2% dos fumantes atuais não responderam à quimioterapia neoadjuvante para o fenótipo músculo invasivo em comparação com apenas 39,7% dos indivíduos que nunca fumaram (Boeri et al., 2019).

No mundo industrializado, a segunda causa mais importante de CB é a exposição a carcinógenos ocupacionais, sendo responsável por 5 a 10% dos casos de CB (Rink et al., 2015; Jahrreiss et al., 2020). Pintores, trabalhadores da indústria da borracha, produção de alumínio, produção de corantes industriais, negócios de lavagem a seco, processos de impressão e fabricação têxtil, assim como trabalhadores expostos a aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, apresentaram maior risco de desenvolverem CB (Cumberbatch et al., 2018; Rouprêt et al., 2018).

Na África e no Oriente Médio, as infecções pelo parasita endêmico *Schistosoma haematobium* são um fator de risco conhecido para CB, principalmente o carcinoma espinocelular (CEC) da bexiga (Ishida et al., 2018; Nesi et al., 2019; Jahrreiss et al., 2020). Acredita-se que uma ativação de células inflamatórias desencadeie sínteses endógenas de *N-nitrosamina*. Além disso, a esquistossomose pode elevar o risco de CB através da indução de mutações no gene *K-ras* (Nesi et al., 2015).

Embora vários fatores do estilo de vida estejam associados à gênese do câncer, existem apenas alguns estudos investigando fatores do estilo de vida relacionados especificamente ao risco de CB (Jahrreiss et al., 2020). O estado civil é um fator de risco conhecido para sobrevivência e controle de diversas neoplasias, com piores resultados para pacientes que não são casados (Jahrreiss et al., 2020; Rosiello et al., 2020). De acordo com um estudo recente de Rosiello et al. (2020), homens solteiros tiveram uma taxa mais alta de CB não-órgão confinado na cistectomia radical.

Além disso, esses mesmos autores demonstraram que o *status* de solteiro foi um preditor independente de maior mortalidade específica por câncer em homens (RR: 1,24, IC 95%: 1,12–1,37). Nas mulheres, não houve associação significativa entre estado civil e mortalidade específica por câncer (RR: 1,13, IC 95%: 0,88–1,31; P = 0,14) ou predição de doença não-órgão confinada na cistectomia radical (Rosiello et al., 2020).

1.2- Imunoterapia antineoplásica

O tratamento de neoplasias avançadas é desafiador. Apesar de inúmeros avanços recentes, a maioria das neoplasias metastáticas ainda resulta num prognóstico reservado (Hayat et al., 2007; Siegel et al., 2018). O objetivo da terapia antineoplásica é inibir especificamente a atividade maligna de células neoplásicas, sem que as células saudáveis sejam afetadas, sendo importante sempre levar em consideração, como em qualquer estratégia de tratamento, o índice terapêutico – dose tóxica sobre dose terapêutica (Neves & Kwok, 2015). As estratégias terapêuticas clássicas para combater o câncer, quimioterapia e radioterapia, ainda são bastante utilizadas, por terem uma atividade citotóxica, o que pode permitir em muitos casos a redução da massa tumoral e até mesmo, cura (Liu et al., 2000; Wilson et al., 2014). Porém, como são terapias que não discriminam células neoplásicas de células saudáveis, estas trazem consigo uma alta taxa de efeitos colaterais indesejáveis, como também desenvolvimento de mecanismos de resistência, o que podem levar a recidivas e falhas terapêuticas (Siegel et al., 2018).

Novas estratégias para controle das neoplasias avançadas precisam ser desenvolvidas. Dentre as várias modalidades de terapias inovadoras que têm sido desenvolvidas para o tratamento de câncer nas últimas décadas, pode-se destacar os inibidores de enzimas quinase (Ellis & Hicklin, 2008; Flaherty et al., 2010; Robert et al., 2015; Ferguson & Gray, 2018), os anticorpos monoclonais contra proteínas-alvo tumorais (Heinemann et al., 2013) e a imunoterapia (Van Cutsem et al., 2009; Weiner et al., 2010; Neves & Kwok, 2015).

Algumas formas de imunoterapia já são usadas na prática clínica há décadas (Morales & Eiding, 1976; Rosenberg et al., 1999; Pook et al., 2002). O tratamento com interferon e interleucinas demonstrou ser ativo contra melanoma e carcinoma de

células renais metastáticos, ao passo que a terapia intravesical com *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin* (oncoBCG) sabidamente reduz o risco de recidiva do CBNMI (Ojea et al., 2007; Yu et al., 2007; Babjuk et al., 2008). No entanto, com exceção dos tratamentos intravesicais, a maioria dessas primeiras formas de imunoterapia resultava em baixas taxas de resposta e toxicidades significativas, limitando sua aplicabilidade para a maioria dos pacientes (Schwartz et al., 2002; Eigentler et al., 2003; Wei et al., 2018).

Na última década, novas modalidades de imunoterapia foram desenvolvidas e vem revolucionando o tratamento de tumores avançados. Os inibidores de “*checkpoints*” imunológicos merecem um destaque especial (Wei et al., 2018). O ipilimumab é um anticorpo monoclonal contra o receptor proteína 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), que por sua vez trata-se de um co-receptor inibitório dos receptores de células T (TCR). Quando ocorre a co-estimulação do TCR e do CTLA-4, o linfócito T desenvolve tolerância em relação ao antígeno apresentado. Já quando o CTLA-4 é inibido pelo ipilimumab, o TCR pode ser estimulado sem a co-estimulação inibitória e a resposta imune ao antígeno em questão é exacerbada (Weber, 2009; Robert et al., 2011; Tarhini, 2013; Schadendorf et al., 2015). Após o sucesso do ipilimumab no tratamento de melanoma metastático, outros inibidores de checkpoints foram desenvolvidos, focando na inibição do receptor de morte celular programada 1 (PD-1) ou de seu ligante (PDL-1) (Patnaik et al., 2015; Larkin et al., 2015; Chang et al., 2016; Rosenberg et al., 2016; Kang et al., 2017). Trata-se também de um receptor inibitório, cuja estimulação resulta em inativação de linfócitos T já sensibilizados contra determinado antígeno. Já estão disponíveis para a prática clínica anticorpos monoclonais contra o PD-1, tais como nivolumab (Larkin et al., 2015) e pembrolizumab (Patnaik et al., 2015; Sullivan & Flaherty, 2015; Kang et al., 2017); ou contra o ligante desse receptor (PDL-1), tais como durvalumab (Antonia et al., 2018), avelumab (Patel et al., 2018) e atezolizumab (Rosenberg et al., 2016).

Tais drogas tem mostrado excelentes resultados no tratamento de várias formas de neoplasia, como melanoma, carcinoma de células renais, carcinoma de bexiga, câncer colorretal com instabilidade de microssatélites, câncer de mama triplo negativo câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão. Uma das principais vantagens da imunoterapia, quando comparada a outras formas de tratamento sistêmico antineoplásico, é a possibilidade de uma resposta clínica duradoura, a qual

difícilmente é obtida com outras modalidades terapêuticas (Neves & Kwok, 2015; Seymour et al., 2017).

Além de ser usada como terapia isolada, a imunoterapia pode também ser combinada com quimioterapia citotóxica. Tal estratégia demonstrou benefícios consistentes no tratamento do câncer de pulmão não-pequenas células (NSCLC) avançado (Gandhi et al., 2018) e apresenta dados promissores no tratamento de câncer de mama triplo negativo (Schmid et al., 2018). Há um provável efeito sinérgico entre imunoterapia e quimioterapia, possivelmente relacionado à liberação de antígenos tumorais quando da morte celular desencadeada pelas drogas citotóxicas (Reynders et al., 2015). Um efeito sinérgico semelhante ocorre quando lesões neoplásicas (tumor primário ou metástases) são tratadas com radioterapia durante um tratamento de imunoterapia, podendo resultar em potencialização da resposta sistêmica fora do campo de irradiação em um fenômeno conhecido como efeito abscopal (Wang et al., 2018).

Apesar dos inúmeros resultados positivos, a imunoterapia por inibição de receptores “*checkpoint*” tem algumas limitações. As respostas clínicas à imunoterapia tendem a demorar mais tempo para acontecer quando comparadas àquelas observadas com quimioterapia citotóxica ou terapia alvo. Alguns efeitos adversos imunomediados, como a colite autoimune e a hepatite autoimune, ainda que relativamente incomuns, podem ser muito graves e mesmo fatais (Brahmer et al., 2018; Wang et al., 2018). Talvez a maior limitação dos inibidores de “*checkpoints*” seja a dificuldade para prever quais pacientes irão apresentar resposta clínica. Enquanto alguns tumores apresentam respostas completas e duradouras, em muitos outros casos não há resposta alguma. A expressão de PDL-1 no tumor ou no infiltrado peritumoral, a carga mutacional (TMB) e a instabilidade de microssatélites são marcadores preditivos de resposta, mas sua sensibilidade e especificidade são limitadas, o que exige ainda hoje que muitos pacientes sejam tratados sem resposta para que alguns possam obter um desfecho clínico favorável (Yarchoan et al., 2017; Shen & Zhao, 2018; Taube et al., 2018). Por fim, os elevados custos dessas drogas limitam sua acessibilidade (Dranitsaris et al., 2018), principalmente (mas não apenas) em países em desenvolvimento como o Brasil (Aguiar et al., 2018).

Diante dos sucessos (e das limitações) da terapia de inibição de “checkpoints”, outras formas de imunoterapia estão atualmente em diversos estágios de desenvolvimento clínico-farmacológico. Vírus oncolíticos (Reale et al., 2019), vacinas de RNA mensageiro (McNamara et al., 2015), e terapia com células T com receptores antigênicos quiméricos (CAR-T) (Miliotou & Papadopoulou, 2018), dentre outras, são modalidades promissoras. A ativação da via dos receptores “*toll-like*” (TLR) também é apontada como uma potencial estratégia para estimular respostas imunes antitumorais (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008; Moradi-Marjaneh et al., 2018).

1.3- Importância dos receptores *Toll-like* e das vias de sinalização relacionadas

Estratégias terapêuticas que modulam o microambiente tumoral e reforçam a migração de células T para o tumor são fundamentais no controle de diversos tipos de cânceres (Yang et al., 2020). Uma dessas estratégias é o uso de moduladores da imunidade inata, como os agonistas dos receptores *toll-like* (TLRs) (Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020). O tratamento baseado no uso desses agonistas aumenta a atividade de células efetoras antitumorais, como células T citotóxicas e células *natural killer* (NK) e, ao mesmo tempo bloqueia a atividade de alguns tipos de células imunossupressoras, como as células T regulatórias (Treg) e células supressoras mielóides. Esses compostos também afetam o recrutamento de células imunes no microambiente tumoral (Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020).

Os TLRs pertencem à família de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) do sistema imune inato e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) relacionados a patógenos invasores e células hospedeiras, respectivamente (Kumar et al., 2011; Junt & Barchet, 2015; Satoh & Akira, 2016; Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020; Javaid & Choi, 2020). Até o momento, 13 TLRs foram relatados em camundongos e 10 em seres humanos, que são expressos em diversas células imunes [células dendríticas (DCs), macrófagos, subconjuntos de células T e B)] e células não-imunes (células epiteliais e fibroblastos) (Javaid & Choi, 2020). Com base em sua localização subcelular em humanos, os TLRs podem ser subdivididos em dois grupos principais: TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana plasmática das células; por outro lado, os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados na membrana

endossômica (Akira & Takeda, 2004; Galli et al., 2010; Satoh & Akira, 2016; Takeda & Akira, 2004; Zhao et al., 2014; Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020; Javaid & Choi, 2020).

A ativação dos TLRs é o passo inicial de uma cascata de eventos que levam à estimulação da imunidade inata, caracterizada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias e por respostas imunes adaptativas (Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020). Uma vez ativados, os TLRs recrutam adaptadores contendo o receptor de interleucina 1 de domínio *toll* (TIR) citosólico. Os principais adaptadores envolvidos na sinalização dos TLRs são: fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88), proteína adaptadora contendo domínio receptor de *toll*-interleucina 1 (TIR) (TIRAP), adaptador indutor de interferon- β contendo domínio TIR (TRIF) e proteína de membrana associada à cadeia de translocação (TRAM) (Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020). O adaptador MyD88 é utilizado por todos os TLRs, exceto TLR3, e ativa o fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e as vias das proteínas-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) para induzir a produção de citocinas inflamatórias (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Satoh & Akira, 2016). TRAM e TIRAP são moléculas adaptadoras utilizadas pelo TLR4 para recrutar TRIF e, pelos TLRs 2 e 4, para recrutar MyD88, respectivamente (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Satoh & Akira, 2016; Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020).

Assim, a sinalização dos TLRs pode ser classificada de duas formas (**Figura 1**): via dependente de MyD88 (via canônica) para a produção de citocinas inflamatórias: TNF- α , interleucinas (ILs-6, 1 β e IL-10) e; via dependente de TRIF (via não-canônica) que ativa os fatores regulatórios de interferon (IRF-3, IRF-5 e IRF-7) para a produção de interferons (IFNs) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004; Satoh & Akira, 2016). TLR4 é o único receptor que utiliza as quatro moléculas adaptadoras (MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM) para desencadear sua sinalização (**Figura 1**) (Akira & Takeda, 2004; Takeda & Akira, 2004)

Também, a ativação dos TLRs ajuda a ativar outras vias de sinalização, como vias envolvendo p38, proteínas quinases c-jun-N-terminal (JNKs) e proteínas quinases reguladoras de sinalização extracelular (ERKs), as quais são essenciais para orquestrar respostas imunes inatas e adaptativas e reparo de lesões (Satoh & Akira, 2016; Bourquin et al., 2019; Yang et al., 2020).

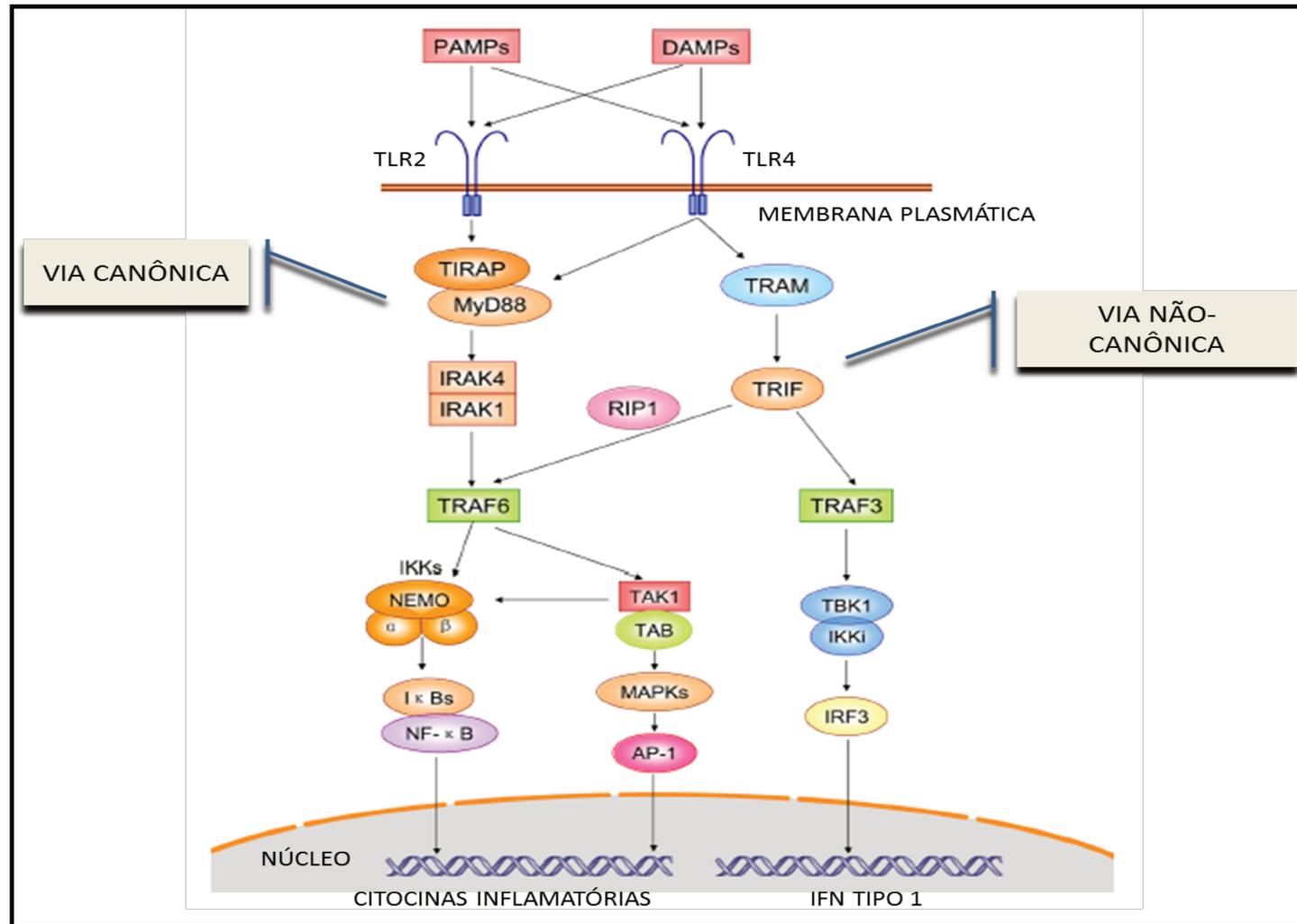


Figura 1: Esquema da via de sinalização do sistema imune mediada por TLR2 e TLR4. Modificado de Liu et al. (2014).

A via de sinalização RANK/RANKL/OPG é assim denominada em referência aos seus componentes chave: o Receptor Ativador de NF- κ B (RANK), uma proteína transmembranar, e seu ligante (RANKL). Além disso, RANKL é regulada pelo seu receptor, a Osteoprotegerina (OPG), cuja ação é também regulada por diversos outros fatores. Esta via de sinalização é essencial na homeostase óssea permitindo o crescimento e diferenciação de osteoclastos (Leibbrandt & Penninger, 2008). Curiosamente, esta via de sinalização é também atuante no desenvolvimento do sistema imunológico. Em experimentos com ratos RANK/RANKL knockout, houve ausência de linfonodos. Células T CD4⁺ e CD8⁺ expressam RANKL após ativação e esta expressão está conectada à sobrevivência de células dendríticas através de mecanismos antiapoptóticos (Leibbrandt & Penninger, 2008).

A relação da via RANK/RANKL/OPG com a carcinogênese se dá de várias maneiras. Uma delas é o estabelecimento de um ambiente favorável para o desenvolvimento das células tumorais através da acumulação de macrófagos associados a tumores, que expressam RANK e através da sinalização por RANKL alteram a resposta imune, induzindo a angiogênese. Além disso, a via está ligada aos estágios iniciais de formação do câncer e metástase (Renema et al., 2016).

O início da resposta imune adaptativa requer dois sinais, o primeiro via apresentação de antígenos envolvendo o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e o receptor de células T (Sinal 1), e o segundo via co-estimulação de CD28 com B7 (CD80 ou CD86) (Sinal 2) (Taube et al., 2018). Uma vez que uma resposta imune é iniciada, a duração e a amplitude da resposta são moduladas por diferentes pontos de checagem (*checkpoints*). Um deles é o CTLA-4, que possui maior afinidade pelas moléculas B7 em relação ao CD28. O CTLA-4 é suprarregulado 48h após a ativação das células T e leva à atenuação da resposta imune na fase inicial, verificando a ativação precoce de células T *naive* e de memória via sinalização dominante negativa (Taube et al., 2018). Outro importante ponto de checagem é a via de morte programada 1 (PD-1)/ ligante de morte programada-1 (PD-L1), que atua nos tecidos periféricos na fase efetora da resposta imune (Taube et al., 2018). Acredita-se que seu papel seja suprimir a resposta imune e evitar possíveis danos autoimunes após exposição de antígenos a longo prazo, como durante infecções virais crônicas (Taube et al., 2018).

O ponto de checagem PD-1/ PD-L1 é de particular interesse, pois os tumores podem cooptar este caminho para atenuar a resposta imune do hospedeiro no microambiente tumoral (Taube et al., 2018). A resistência imune adaptativa mediada por PD-L1 foi descrita pela primeira vez no melanoma (Taube et al., 2012). Neste mecanismo, a vigilância das células T reconhece os neoantígenos tumorais como estranhos e se torna ativada, regulando o PD-1 e secretando o IFN- γ (Taube et al., 2018). Em resposta ao IFN- γ , as células tumorais e as células imunes no microambiente tumoral expressam PD-L1. O PD-L1 então liga-se ao PD-1, e inativa as células T de vigilância (Taube et al., 2018). Quando a expressão de PD-L1 tanto na célula tumoral quanto na célula imune foi avaliada como potenciais biomarcadores de resposta à terapia no carcinoma urotelial, os pesquisadores descobriram que a expressão de PD-L1 na célula imune é mais preditiva da resposta à inibição da sinalização PD1/ PD-L1 do que a expressão de PD-L1 na célula tumoral (Rosenberg et al., 2016). Tal fato pode ser explicado pela existência de um componente da expressão constitutiva de PD-L1 nas células tumorais, como tem sido relatado em tumores que surgem do epitélio do tipo escamoso (Drake, 2012; Malm et al., 2014). Mais recentemente, o sucesso da terapia de bloqueio PD-1/ PD-L1 no carcinoma urotelial levou à aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para certas condições clínicas desse tipo de tumor (Taube et al., 2018).

1.4- Tratamento primário do CBNMI: Ressecção Transuretral (RTU) e imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)

O CBNMI representa a maioria (75%) dos casos recém-diagnosticados de CB (Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). Entre os estádios de CBNMI, os tumores pTis, pTa alto grau e pT1 são considerados de alto risco para recorrência e progressão da doença (Ro et al., 1992; Epstein et. al., 1998; Chang, 2016; Babjuk et al., 2017). O tratamento padrão para CBNMI de alto risco é a ressecção transuretral (RTU) do tumor vesical, seguida por terapia intravesical adjuvante com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Kemp et al., 2005; Chang et al., 2016; Babjuk et al., 2017; Kamat et al., 2020).

Morales et al. (1976) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG (ou oncoBCG). Desde então, oncoBCG 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; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020).

Em relação ao seu mecanismo imune, BCG serve como um PAMP para ativar o receptor de reconhecimento de padrões (PRR) na superfície de várias células (Moriwaki et al., 2001; Wells et al., 2003; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020), incluindo células tumorais uroteliais e células apresentadoras de antígeno (APC) como macrófagos, células dendríticas, e outras (Moriwaki et al., 2001; Wells et al., 2003; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). A terapia com oncoBCG ativa a via de sinalização canônica dos TLRs 2 e 4, via dependente de MyD88, com consequente indução da expressão de citocinas e influxo de células inflamatórias na parede vesical (Schamhart et al., 2000; Bohle & Brandau, 2003; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). Citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF), IFNs e ILs induzem resposta de células T citotóxicas e células NK na bexiga (Bohle & Brandau, 2003; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). De acordo com Schamhart et al. (2000), após a instilação de oncoBCG, 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; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020).

Embora o tratamento intravesical com oncoBCG seja a terapia adjuvante padrão ouro para o CBNMI alto grau, seu uso é limitado devido à falha do tratamento, efeitos adversos e intolerância que ocorrem em mais de dois terços dos pacientes (Perabo et al., 2005; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). Ainda, complicações severas e óbitos relacionados ao tratamento foram descritos (Berry et al., 1996; Kamat et al., 2017). Efeitos secundários graves ocorrem em <5% de todos os pacientes submetidos à imunoterapia intravesical com oncoBCG (Babjuk et al., 2008). Estima-se que aproximadamente 5-10% dos pacientes não conseguem completar o tratamento de indução com oncoBCG, acarretando a interrupção do esquema terapêutico (Bohle & Brandau, 2003; Ojea et al., 2007). A toxicidade da imunoterapia intravesical com oncoBCG pode ser dividida em efeitos colaterais locais e sistêmicos. Os efeitos colaterais locais mais comuns incluem disúria (71%), hematúria (29%) e contratura vesical (3%) (Hall et al., 2007; Han et al., 2020; Kamat et al., 2020). Já os

efeitos colaterais sistêmicos podem ser divididos em infecciosos (cistite bacteriana, epididimite, prostatite, infecções uretrais, sepse) e não-infecciosos (artralgias, reações cutâneas, anafilaxia), sendo que os sintomas de febres e calafrios ocorrem em 30% dos pacientes; epididimite, prostatite e infecções uretrais em 4%; sepse em 1%; e artralgias e reações cutâneas em 6% (O'Donnell & Boehle, 2006; Hall et al., 2007).

Enquanto 84% dos pacientes com CBNMI estadio pTis atingem inicialmente uma resposta completa com oncoBCG (Lamm et al., 2000), até 50% falham em manter uma resposta durável (Packiam et al., 2017). Assim, há uma necessidade clara não atendida de opções terapêuticas seguras e eficazes em pacientes com CBNMI, nos quais a terapia com oncoBCG falhou. Pacientes com CBNMI de alto grau possuem risco aumentado de progressão da doença. A falha em responder à re-indução com BCG está associada a um risco de recorrência e progressão de 30% a 50% para a doença músculo invasiva (Klaassen et al., 2018; Juvet et al., 2020). A cistectomia radical precoce tem sido o tratamento padrão para melhorar a sobrevida, pois as opções terapêuticas são limitadas. No entanto, a cistectomia acarreta mudanças significativas de morbidade, mortalidade e qualidade de vida (Klaassen et al., 2018). Atualmente, não há terapia intravesical de resgate padrão ouro para pacientes que não respondem à terapia com oncoBCG.

Quando oncoBCG foi estabelecida para a terapia do CBNMI, os fabricantes modificaram a concentração do frasco (uma dose de BCG para câncer de bexiga é semelhante a mais de 4000 doses de BCG destinada para vacinação) e a formulação a ser administrada na bexiga (Guallar-Garrido & Julián, 2020). No geral, poucas empresas produzem BCG para oncologia e exportam para o mundo todo. No final de 2012, um evento inesperado levou ao colapso da fábrica da Sanofi que produzia BCG *Connaught* no Canadá (Guallar-Garrido & Julián, 2020). Em uma inspeção de rotina do FDA (*Food and Drug Administration*), foi encontrado contaminação na área de produção de BCG devido a enchentes naturais anteriores. O fechamento forçado da fábrica para descontaminar a área interrompeu a produção de BCG. Naquela época, oncoBCG *Connaught* produzido e distribuído pela Sanofi era uma das principais fontes de tratamento do CB na América do Norte e na Europa, regiões com maior incidência de CB em todo o mundo (Bray et al., 2018; Guallar-Garrido & Julián, 2020). Posteriormente, a Sanofi decidiu interromper a produção de oncoBCG e em meados de 2017 confirmaram que estavam a sair do mercado. Além disso, durante os últimos

cinco anos, problemas na produção de oncoBCG em outras empresas resultaram em restrições de fornecimento dos principais fornecedores (Cernuschi et al., 2018; Guallar-Garrido & Julián, 2020). Portanto, a gravidade do problema aumentou drasticamente devido à crescente demanda global por tratamento de CB e à anunciada escassez antecipada porque os fornecedores esgotaram seus estoques.

Similarmente, no Brasil a fabricação e distribuição de OncoBCG sofre com constantes interrupções. Recentemente, a fabricação foi suspensa pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), após inspeção constatar o descumprimento dos requisitos de boas práticas na fabricação de produtos injetáveis e verificar a ineficiência dos processos para identificação de desvios de qualidade e suas causas pela Fundação Ataulpho de Paiva (Laboratório responsável pela produção da OncoBCG). "Considerando o elevado risco sanitário identificado na inspeção conduzida ao Laboratório, a Anvisa determinou a suspensão da fabricação do medicamento OncoBCG", disse à agência em nota. "Concluiu-se que os riscos suplantavam os benefícios". A Sociedade Brasileira de Urologia questionou a Anvisa sobre "outros fabricantes que tenham aprovação das vacinas BCG e OncoBCG, indispensáveis no tratamento complementar do câncer de bexiga". A entidade não confirmou resposta sobre possíveis substitutos a medicação, lançada em 2006, para o tratamento de câncer de bexiga. Dessa forma, a falta de OncoBCG pode causar impacto negativo no tratamento dos pacientes com câncer de bexiga. Sem essa imunoterapia tais pacientes possuem alto risco de recidiva e progressão tumoral.

1.5- Nanopartículas aplicadas ao tratamento do câncer

Nanopartículas são partículas que possuem pelo menos uma de suas dimensões com escala menor ou igual a 100 nm, desenhadas para melhorar a penetração e retenção de uma droga em um tecido alvo e ao mesmo tempo reduzir sua concentração em tecidos sadios (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Chowdhury & Akaike, 2005; Cho et al., 2008; Nie, 2010). Elas podem ser compostas por polímeros (micelas ou dendrímeros) (Brigger et al., 2002), lipídeos (partículas lipossomais) (Moghimi & Szebeni, 2003), vírus (partículas virais) (Xu et al., 2006), compostos organometálicos (nanotubos) (Cho et al., 2008), ou híbridos orgânico-inorgânico (Xu et al., 2006).

Idealmente, as nanopartículas formam um veículo colóide para a droga administrada, melhorando sua biodisponibilidade e evitando degradação precoce

(Brigger et al., 2002). Com sua biodisponibilidade prolongada, as nanopartículas tendem a se acumularem em maiores concentrações na vasculatura permeável e de drenagem angiolinfática ineficiente que existe no microambiente tumoral (Brigger et al., 2002; Moghimi & Szebeni, 2003; Xu et al., 2006). Algumas nanopartículas também podem conter em sua estrutura um ligante específico para um receptor ou estrutura presente nas células tumorais (Moghimi & Szebeni, 2003).

A farmacocinética de uma nanopartícula varia com o seu tamanho e as características de sua superfície (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Chowdhury & Akaike, 2005; Brigger et al., 2002). Para escapar da retenção no sistema retículo-endotelial, uma nanopartícula deve medir menos que 100nm, pois a espessura dos sinusóides esplênicos varia de 150-200nm e a das junções endoteliais entre 100-600 nm (Cho et al., 2008). Ao mesmo tempo, uma superfície hidrofílica dificulta a opsonização e captura por macrófagos (Moghimi & Szebeni, 2003).

Algumas nanopartículas já estão disponíveis comercialmente para uso como drogas antineoplásicas. O paclitaxel ligado a albumina (Von Hoff et al., 2013) e a doxorrubicina lipossomal (Keller et al., 2004) são exemplos de nanopartículas orgânicas que servem como veículos para drogas citotóxicas (taxano e antracíclico, respectivamente). Outras nanopartículas estão atualmente em desenvolvimento clínico, seja como veículos para drogas citotóxicas ou para terapias-alvo (Cho et al., 2008; Wang et al., 2012; Zeng et al., 2015).

Nanopartículas inorgânicas são menos complexas e de produção mais barata que outras formas de nanopartículas, e também tem a vantagem de normalmente provocarem menos efeitos adversos (Xu et al., 2006). No entanto, sua capacidade de transfecção (isto é, ser internalizada pela célula-alvo) também é geralmente menor que a de outras nanopartículas (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Xu et al., 2006). Entre as formas de nanopartículas inorgânicas estão as compostas por fosfato de cálcio (Xu et al., 2006). São partículas biodegradáveis e, por ser o fosfato de cálcio o principal componente de tecidos orgânicos rígidos (i.e., osso), apresentam pouca toxicidade celular intrínseca (Sokolova & Epple, 2008). A estrutura óssea é, na verdade, composta por colóides de fosfato de cálcio e matéria orgânica, logo pode ser considerada ela própria composta por nanopartículas (Weiner & Wagner, 1998).

Partículas de fosfato de cálcio são frequentemente usadas como veículos para transfecção de ácidos nucleicos, dado que o cálcio ionizado possui afinidade tanto

com os grupos fosfato presentes nos ácidos nucleicos como com o fosfato inorgânico que compõe a superfície da nanopartícula (Sokolova & Epple, 2008). Devido a sua estabilidade dependente do pH, esses compostos também podem ser usados para transferência de proteínas para o meio intracelular. Nanopartículas de fosfato de cálcio são estáveis na circulação sanguínea, mas no ambiente ácido do meio intracelular ocorre a degradação do fosfato de potássio e liberação das proteínas transportadas (Zeng et al., 2015).

1.5.1- Nova perspectiva para o tratamento do CBNMI: uso da imunoterapia com OncoTherad®

Pesquisadores do Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (UNICAMP), coordenados pelos Professores Nelson Duran e Wagner José Fávaro, desenvolveram um composto sintético com propriedades antitumorais e imunológicas, denominado Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1 (MRB-CFI-1), registrado com a logomarca OncoTherad®. O OncoTherad® representa a primeira imunoterapia 100% brasileira desenvolvida dentro de uma universidade pública.

O OncoTherad® é um composto nanométrico de fosfato e sais metálicos associado a uma proteína glicosídica, com tamanho entre 420-530 nm, que possui patentes depositadas no Brasil (**Número: BR 1020170127680**), EUA (**Número: US20200156951A1**) e Bloco Europeu (**Número: WO2018227261**) (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a; Fávaro et al., 2019b; Fávaro & Duran, 2020). O OncoTherad® atua como um Modificador de Resposta Biológica, desencadeando a estimulação do sistema imune mediada por TLRs 2 e 4, através da fosforilação de aminoácidos hidroxilados como serina, treonina e tirosina por compostos que apresentam sais de fosfato.

Determinados compostos de fosfato quando administrados no interior do tumor promovem ativação do sistema imune no microambiente tumoral, levando a uma importante regressão da lesão neoplásica maligna (Shirota et al., 2012; Corrales et al., 2015). A administração intratumoral de oligonucleotídeos CpG promove redução da atividade imunossupressora de células supressoras mielóide (MDSC) (Shirota et al., 2012). Shirota et al. (2012) verificaram que as MDSC monocíticas do

microambiente tumoral expressaram TLR e responderam à estimulação de oligonucleotídeos CpG por intermédio da perda de sua capacidade de suprimir a função das células T, pela produção de citocinas Th1 e de sua diferenciação em macrófagos com capacidade tumoricida, contribuindo para a regressão tumoral. Em camundongos, a administração intratumoral de derivados dinucleotídeos cíclicos sintéticos ativaram o fator estimulador do complexo de genes de interferon (STING), induzindo uma significativa resposta imune sistêmica, a qual foi capaz de reduzir os tumores induzidos nesses animais, bem como eliminar e/ ou reduzir as metástases à distância (Corrales et al., 2015).

Similarmente, a estrutura inorgânica do OncoTherad® é capaz de ativar o sistema imune inato através das vias de sinalização mediadas por TLR, deflagrando uma resposta inflamatória aguda sistêmica, a qual é potencializada pela parte orgânica (proteína glicosídica) do composto. Assim, para verificar se o nanocomposto OncoTherad® era capaz de deflagrar *in vivo* a resposta inflamatória local (ativação local do sistema imune), nosso grupo de pesquisa avaliou a administração intraperitoneal do OncoTherad® em ratas Fischer 344. Após a aplicação de 3 doses, uma a cada 72 horas, as análises macroscópicas e histológicas dos peritônios revelaram que os animais tratados com OncoTherad® apresentaram sinais intensos de inflamação peritoneal, os quais foram caracterizados por rubor, aumento da vascularização, pontos hemorrágicos e extensos infiltrados inflamatórios teciduais, além de pequenos aglomerados de cristais de fosfatos na cavidade abdominal. Assim, tais resultados revelaram que o composto OncoTherad® foi capaz de induzir a resposta inflamatória local, justificando sua avaliação como imunomodulador nos experimentos em animais com CBNMI induzidos quimicamente (Fávaro & Duran, 2017; Fávaro & Duran, 2020).

Após o experimento de indução da resposta inflamatória local em ratos saudáveis, nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial antitumoral e imunomodulatório do OncoTherad® em roedores, cães e seres humanos com CBNMI (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a, Fávaro et al., 2019b; Fávaro & Duran, 2020). Estudos pré-clínicos, clínico-veterinários e clínicos em seres humanos Fase I/ II para CBNMI, demonstraram que o OncoTherad® promoveu a ativação local de células T, DCs, NK e macrófagos M1 mediada por TLR4 no microambiente tumoral, culminando com a redução do tumor primário e das

metástases (Fávaro & Duran, 2017; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a; Fávaro & Duran, 2020). No tratamento do CBNMI induzido quimicamente em ratas Fisher 344, o tratamento com OncoTherad® aumentou as imunorreatividades de proteínas reguladoras, como PTEN (fosfatase e tensina homóloga) e p21, demonstrando a contribuição positiva dessa imunoterapia na regulação do ciclo celular (Fávaro & Duran, 2020).

Silva et al. (2020) caracterizaram os efeitos terapêuticos da imunoterapia com OncoTherad®, administrada pelas vias intraperitoneal e intravesical, no pós-tratamento imediato (após 6 semanas consecutivas de tratamento) e nas sobrevividas (SV) de 30 (SV30) e 90 (SV90) dias de ratas Fisher 344 induzidas quimicamente ao CBNMI. Os resultados desse estudo demonstraram que a imunoterapia com OncoTherad® pela via intraperitoneal apresentou índices de inibição da progressão tumoral (IPT) de 33,34% (no pós-tratamento), 42,84% (na SV30) e 71,43% (na SV90), enquanto que o tratamento administrado pela via intravesical resultou em índices de IPT de 66,67% (no pós-tratamento), 57,14% (na SV30) e 42,84% (na SV90). Assim, a imunoterapia com OncoTherad® se mostrou efetiva nas duas vias de administração, intraperitoneal e intravesical, promovendo índices de inibição da progressão tumoral superiores ao tratamento padrão com oncoBCG.

Em relação a segurança da imunoterapia com OncoTherad®, os resultados demonstraram que a toxicidade *in vitro* desse nanocomposto nas células de carcinoma de bexiga urinária grau II (linhagem celular 5637) foi baixa, viabilidade celular de 75%, indicando que o provável mecanismo de morte das células neoplásicas pelo OncoTherad® é dependente da ativação do sistema imune. Além disso, os estudos demonstraram que a imunoterapia com OncoTherad® não causou efeitos adversos locais e sistêmicos na dose terapêutica de 20 mg/Kg em ratos, camundongos e coelhos (Fávaro & Duran, 2017; Duran et al., 2019; Fávaro & Duran, 2020). As doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg promoveram reações inflamatórias moderadas e intensas, respectivamente, na bexiga, ureteres e rins das três espécies animais testadas (Fávaro & Duran, 2017; Duran et al., 2019; Fávaro & Duran, 2020). Ainda, o tratamento com OncoTherad® não causou hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas doses de 20 mg/Kg, 50 mg/Kg e 100 mg/Kg em ratos, camundongos e coelhos, sendo que a dose máxima tolerada foi de 100 mg/Kg (Fávaro & Duran, 2017; Duran et al., 2019; Fávaro & Duran, 2020).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1- Justificativa e condições de uso da imunoterapia com OncoTherad® no CBNMI

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 desses efeitos 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 30%) em pacientes com doença não-músculo invasiva. Apesar disso, até hoje, não há no mercado nenhuma outra terapia mais eficaz que o BCG.

No Brasil, a fabricação e distribuição da vacina OncoBCG sofre com constantes interrupções, o que pode causar impacto negativo no tratamento dos pacientes com câncer de bexiga. Sem essa vacina, tais pacientes possuem alto risco de recidiva e progressão tumoral. Desta forma, o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do 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 da nanotecnologia para produção de novas moléculas com atividade farmacológica, destacam-se os compostos que atuam como agonistas e/ ou moduladores dos TLRs, os quais representam candidatos promissores contra o câncer. Nesse contexto, destaca-se o uso do OncoTherad®, o qual tem sido proposto com resultados promissores no tratamento do CBNMI (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a, Fávaro et al., 2019b). Com base nos estudos pré-clínicos e clínico-veterinários realizados nos últimos anos, a imunoterapia OncoTherad® representa uma nova abordagem para combater lesões malignas de alto grau ainda na bexiga urinária, antes de se espalharem para tecidos e órgãos adjacentes. Experimentalmente, o OncoTherad® mostrou significativa atividade antitumoral e uma clara superioridade sobre o BCG, em estudos comparativos de eficácia e segurança (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al.,

2019; Fávoro et al., 2019a, Fávoro et al., 2019b). O OncoTherad® pode ajudar a superar a falta de efetividade e alta toxicidade do BCG na maioria dos pacientes. A toxicidade do OncoTherad® na dose terapêutica é próxima de zero.

Considerando uma abordagem poupadora da bexiga, o OncoTherad® pode ser usado para tratar pacientes com CBNMI refratários, recidivados e intolerantes ao BCG, bem como os refratários à quimioterapia de primeira e segunda linhas aprovadas, eliminando lesões malignas antes que se espalhem para outros tecidos e órgãos. Notavelmente, os estudos pré-clínicos evidenciaram que o OncoTherad® também pode ser usado no tratamento das formas avançadas da doença, em associação com outras drogas, sem toxicidade adicional.

Considerando os dados em conjunto, os resultados pré-clínicos e clínico-veterinários indicam que o OncoTherad® pode ser usado para tratar pacientes com câncer de bexiga que se encaixam em três condições que surgem no decurso da doença e dos tratamentos. As três condições e os usos correspondentes do OncoTherad® são os seguintes:

a) Condição 1: Pacientes com CBNMI de alto grau que são refratários ou recidivantes ao BCG, com alto risco de recorrência e progressão da doença: Pacientes com CBNMI de alto grau que são refratários ou recidivantes ao tratamento com BCG apresentam maior risco de progressão para doença músculo invasiva e/ ou metastática. Até o momento, nenhum tratamento disponível mostrou melhor eficácia do que o tratamento intravesical com BCG para evitar ou retardar a progressão da doença.

O mecanismo de ação distinto do OncoTherad® pode ser benéfico aos pacientes refratários ou recidivantes ao BCG. Atuando em vias imunes distintas, o OncoTherad® pode eliminar as células uroteliais tumorais que sobreviveram ou que são resistentes à terapia com BCG, possivelmente por causa dos mecanismos de escape e/ ou resistência. Duas características dos mecanismos de ação do OncoTherad®, em comparação ao BCG, devem ser destacadas nesta condição, como segue:

1- Experimentalmente, o OncoTherad® ativa vias imunes distintas que são mais efetivas do que àquelas induzidas pelo BCG para conter a progressão da doença. Em uma série de experimentos comparativos independentes, o tratamento intravesical com OncoTherad® apresentou uma taxa de sucesso de 70% - 80%. A

maior taxa de sucesso do tratamento intravesical com BCG, usado como controle positivo, foi de 40% (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a, Fávaro et al., 2019b);

2- Experimentalmente, o OncoTherad® foi capaz de diminuir a expressão dos sistemas RANK/ RANK-L e PD-L1/ FOXP3 e, conseqüentemente impedir a formação de metástases e/ ou impedir a progressão das mesmas (Fávaro et al., 2019b).

O uso do OncoTherad® fornece outros recursos benéficos para pacientes com CBNMI que falharam ao tratamento com BCG, incluindo aqueles refratários às terapias intravesicais de segunda linha. Os resultados experimentais sugerem que o OncoTherad® pode ser usado imediatamente após RTU ou na presença de hematúria macroscópica. O OncoTherad® mostrou efeitos terapêuticos importantes em modelos animais quimicamente induzidos ou em cães que desenvolvem espontaneamente CBNMI, mesmo quando utilizado na presença de hematúria macroscópica decorrente do processo carcinogênico. É digno de nota que nenhum sinal de hematúria subsequente foi observado nos animais tratados com OncoTherad® (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Durán et al., 2019).

b) Condição 2: Pacientes com CBNMI de alto grau que são intolerantes ao BCG, com alto risco de recorrência e progressão da doença: Os pacientes nessa condição recebem tratamentos conservadores baseados na imunoterapia com BCG, mas mesmo assim apresentam alto risco de recorrência do tumor e progressão da doença. A condição está claramente relacionada às quantidades insuficientes de BCG recebido, pois o tratamento é interrompido devido à toxicidade dessa imunoterapia (Brausi et al., 2014).

A maioria dos episódios de toxicidades local e sistêmica do BCG emergem durante a fase de indução ou no primeiro semestre da terapia de manutenção, resultando em atrasos e interrupções das instilações de BCG. As conseqüências são deletérias, já que o BCG pode prevenir a recorrência e a progressão da doença apenas quando a terapia de manutenção é realizada (Brausi et al., 2014).

Além dos importantes efeitos antitumorais, a imunoterapia intraperitoneal e intravesical com OncoTherad® na dose terapêutica de 20 mg/Kg, não causou efeitos colaterais, como hematúria macroscópica, hiperplasia urotelial e inflamação intensa

na bexiga, ureteres e rins, bem como não mostrou sinais de inflamação e/ ou de toxicidade sistêmica no fígado, baço, estômago e pâncreas. Ainda, o tratamento com OncoTherad® não mostrou sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (Duran et al., 2019).

Portanto, a terapia intravesical com OncoTherad® pode beneficiar os pacientes intolerantes ao BCG que tiveram que interromper o tratamento por causa das toxicidades local ou sistêmica, eliminando lesões malignas antes de se espalharem para outros órgãos.

c) Condição 3: Pacientes com CBNMI de alto grau que são refratários ou recidivantes ao BCG e quimioterapia de primeira e segunda linhas, para os quais a cistectomia estaria associada a alta morbidade ou mortalidade: A cistectomia radical ou parcial é a opção para pacientes não responsivos às terapias atuais que poupam a bexiga urinária. Pacientes que se recusam ou que são inelegíveis à remoção da bexiga enfrentam um prognóstico sombrio, devido ao aumento do risco de progressão para doença avançada. A cistectomia radical é uma cirurgia complexa e está associada à 45% de complicações cirúrgicas e 8% de mortalidade (Liedberg, 2010).

Apesar dos tratamentos conservadores, uma grande parcela de pacientes com CBNMI no momento do diagnóstico desenvolverá doença invasiva ou metastática. Cerca de metade dos pacientes com câncer de bexiga localmente avançado ou metastático não respondem satisfatoriamente aos esquemas quimioterápicos de primeira linha à base de platina: a) metotrexato, vimblastina, doxorrubicina (adriamicina) e cisplatina (MVAC) e; b) gemcitabina e cisplatina (GC). Devido à alta toxicidade da cisplatina, muitos pacientes recebem doses menores do que as normalmente recomendadas ou até mesmo nenhum tratamento. A alternativa seria um esquema quimioterápico baseado em carboplatina, como tratamento de segunda linha (gemcitabina + carboplatina ou gemcitabina + paclitaxel), que fornece uma sobrevida mediana de 9 - 10 meses (Yafi et al., 2011; Massari et al., 2015).

Apesar da terapia de primeira linha baseada em platina, as opções são escassas para aqueles pacientes cujas lesões malignas progridem. Apenas 10% - 15% deles respondem à quimioterapia de agente único de segunda linha (Yafi et al., 2011; Massari et al., 2015). Os inibidores de checagem imune recentemente

aprovados parecem ser uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com câncer de bexiga avançado e metastático que falham ou são inelegíveis à quimioterapia de primeira linha à base de platina, mas o tratamento apresentou limitações devido à toxicidade e falta de efetividade para alguns pacientes (Sharma et al., 2017).

Em síntese, os tratamentos conservadores fornecem uma solução distante da ideal para maioria dos pacientes com CBNMI e, há uma enorme necessidade de terapias que realmente funcionem para o câncer de bexiga.

Experimentalmente, o tratamento combinado com imunoterapia intravesical com OncoTherad® e quimioterapia sistêmica com cisplatina evidenciou melhor recuperação histopatológica do estado de câncer e diminuição da progressão das lesões neoplásicas uroteliais em 71,4% dos animais induzidos quimicamente ao CBNMI, sendo que 42,9% apresentaram urotélio normal e 28,6% apresentaram lesão benigna caracterizada por hiperplasia plana (Fávaro & Duran, 2017).

Assim, os dados experimentais sugerem que a combinação de imunoterapia intravesical com OncoTherad® e cisplatina sistêmica pode ser considerada uma opção valiosa para o tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento padrão com BCG e/ ou que não satisfazem os critérios para cistectomia radical.

A descoberta e desenvolvimento de medicamentos, como o OncoTherad®, é um empreendimento complexo 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 e que acreditamos aparecer atualmente no Brasil.

Assim, os promissores resultados demonstrados com o OncoTherad® podem constituir uma importante alternativa terapêutica para o CBNMI, principalmente nos casos de pacientes refratários, recidivantes e intolerantes à imunoterapia com BCG ou inelegíveis à cistectomia radical.

Pela importância do desenvolvimento de novas drogas e/ou associações terapêuticas para câncer no Brasil, que sabidamente gasta grande parcela dos recursos do Sistema Único de Saúde (SUS) na compra de fármacos importados e, ainda no caso em particular do câncer de bexiga, em que se utiliza o BCG com todas

as suas conhecidas limitações no tratamento de pacientes à falta de substitutos adequados, o desenvolvimento desse projeto de pesquisa foi essencial levando-se em conta os objetivos propostos e os resultados projetados.

2.2- Objetivos

2.2.1- Gerais

a) Avaliar a eficácia do uso da imunoterapia com OncoTherad® através dos critérios de resposta patológica completa (RPC) e sobrevida livre de recidiva (SLR) em pacientes com CBNMI recidivado ao tratamento com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical;

b) Avaliar a segurança da imunoterapia com OncoTherad® através das análises dos possíveis efeitos tóxicos locais e/ ou sistêmicos nos pacientes com CBNMI recidivado ao tratamento com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical.

2.2.2- Específicos

a) Avaliar o tempo de recidiva da doença e a duração da resposta da imunoterapia com OncoTherad® em pacientes com CBNMI recidivado ao tratamento com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical;

b) Caracterizar os efeitos da imunoterapia com OncoTherad® nas vias de sinalização mediada por TLR4 (TLR4, TRIF, IRF3, IFN- γ e iNOS), por imunohistoquímica nos pacientes com CBNMI recidivado ao tratamento com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Produção e caracterizações físico-químicas do OncoTherad®

A produção do nanofármaco OncoTherad® foi realizada no Laboratório de Cultura de Células de Pele (LCCP), situado no Centro de Investigação em Pediatria CIPED FCM/ UNICAMP. O LCCP possui laudo técnico de avaliação emitido pelo Sistema de Informação em Vigilância Sanitária (SIVISA) autorizando a realização de técnicas avançadas de cultivo celular para uso em seres humanos, de acordo com os critérios de Boas Práticas de Manufatura exigidos.

Após a manufatura, os lotes de produção do nanofármaco OncoTherad® foram caracterizados por diferentes técnicas físico-químicas no Instituto de Química/ UNICAMP, sob a supervisão do Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero.

Os frascos estéreis contendo OncoTherad (processo de esterilização realizado no LCCP) foram encaminhados ao Ambulatório de Urologia do Hospital Municipal de Paulínia-SP.

3.2- Tratamento farmacológico de pacientes com CBNMI: uso da imunoterapia com OncoTherad®

Um total de 36 pacientes, provenientes do Ambulatório de Saúde do Homem do Hospital Municipal de Paulínia-SP (HMP), com câncer de bexiga não-músculo invasivo recidivado e não-responsivo ao tratamento com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) e/ ou quimioterapia intravesical, foi recrutado para o estudo. Contudo, 29 pacientes preencheram os critérios de inclusão e iniciaram o tratamento intramuscular e intravesical com o imunoterápico OncoTherad®.

Todos os pacientes inclusos foram submetidos previamente à ressecção transuretral (RTU) de bexiga, realizada no próprio Serviço do HMP ou no Serviço de origem do paciente (posteriormente encaminhados para avaliação do protocolo) sob anestesia (geral ou epidural) que dependeu da escolha do anestesista com o paciente.

O diagnóstico das biópsias vesicais foi realizado pelo Serviço de Patologia do HMP ou Serviço de Patologia de origem do paciente.

Após o diagnóstico, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 1**) e, receberam o tratamento com OncoTherad®. O esquema terapêutico com OncoTherad® consistiu em:

- Fase de Indução: uma aplicação semanal por seis semanas consecutivas de OncoTherad® pelas vias intravesical (120 mg/mL – manter intravesical por 1 hora) e intramuscular (25 mg/mL);

- Fase de Manutenção: uma aplicação quinzenal (intravesical e intramuscular) por 3 meses e uma aplicação mensal (intravesical e intramuscular) por mais 9 meses até completar 1 ano de tratamento. Depois, uma aplicação trimestral (intravesical e intramuscular) por mais 1 ano.

Todo o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/ UNICAMP (CAAE: 93619718.7.0000.5404 – **Anexo 2**) e registrado na plataforma do Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (**RBR-6swqd2** – <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-6swqd2/>) (**Anexo 3**).

3.3- Avaliação da eficácia terapêutica à imunoterapia OncoTherad®

Os principais critérios para avaliação da eficácia foram: resposta patológica completa (RPC), sobrevida livre de recidiva (SLR), tempo de recidiva da doença e duração da resposta. A RPC foi definida como a proporção de pacientes que não mostraram evidência de doença ou progressão da doença. SLR correspondeu ao tempo desde a data da primeira dose do tratamento com OncoTherad® até a recidiva da doença ou a morte como primeiro evento. A recidiva foi definida como qualquer recorrência tumoral comprovada histologicamente (qualquer grau).

O tempo de recidiva da doença correspondeu ao período desde a data da primeira dose do tratamento com OncoTherad® até a falha terapêutica. Já a duração da resposta foi definida como o tempo entre a RPC e a falha terapêutica.

Para avaliação da eficácia terapêutica, todos os pacientes foram acompanhados ambulatorialmente (Ambulatório de Saúde do Homem do Hospital Municipal de Paulínia-SP), sendo submetidos aos exames anatomopatológico, ultrassonografia de vias urinárias, cistoscopia e exames laboratoriais de três em três meses no 1º ano e, semestrais no 2º ano.

3.4- Critérios de inclusão e exclusão

3.4.1- Critérios de inclusão

Os inclusos foram os pacientes com lesão vesical que recidivaram após a terapia padrão com BCG. Além disso, foram inclusos os pacientes refratários ou intolerantes ao BCG, bem como os refratários à quimioterapia de primeira e segunda linhas aprovadas, os quais possuem maior risco de progressão para doença músculo invasiva e/ ou metastática.

- Aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Tumores múltiplos (> duas lesões) e/ou recorrentes e/ou grandes (>3 cm)

TaG1-2;

- Tumor não-músculo invasivo (pT1);
- Presença de carcinoma *in situ* (Cis);
- Carcinoma urotelial de bexiga grau 3.

3.4.2- Critérios de exclusão

Pacientes com lesão vesical suspeita de neoplasia maligna da bexiga e que não foram até então submetidos à Ressecção Transuretral (RTU), ou seja, pacientes virgens de tratamento para tumor vesical.

- Histologia: adenocarcinoma, carcinoma epidermóide.

3.5- Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas

Amostras da bexiga urinária de todos os pacientes, provenientes de biópsias por cistoscopias ou RTU, processadas pelo Serviço de Patologia do Hospital Municipal de Paulínia-SP ou Serviço de Patologia de origem do paciente, foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas e inclusas em parafina. Posteriormente, as amostras vesicais foram seccionadas com 5 µm de espessura em micrótomo semiautomático CUT5062 (SLEE MAINZ, Munique, Alemanha), coradas com Hematoxilina-Eosina e fotografadas no fotomicroscópio Leica DM2500, câmera DFC295 (Leica, Munique, Alemanha).

O diagnóstico das biópsias vesicais, ao longo de todo estudo, foi realizado pelo Serviço de Patologia do Hospital Municipal de Paulínia-SP ou Serviço de Patologia de origem do paciente. Somente nos casos de recidiva tumoral pós-tratamento com OncoTherad®, a releitura das lâminas foi realizada por um patologista sênior, Prof. Dr. Athanase Billis, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As lesões uroteliais foram classificadas conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein et al., 1998).

Após o diagnóstico histopatológico, foi evidenciado a presença de numerosos folículos linfoides primários (PLFs) nas amostras da bexiga urinária de 15 pacientes submetidos ao tratamento com OncoTherad®. Assim, para verificar a influência do OncoTherad® na formação dos PLFs, bem como, o papel dessas estruturas na modulação imune do microambiente tecidual da bexiga, as biópsias vesicais prévias e posteriores ao tratamento com OncoTherad® foram submetidas as análises imunohistoquímicas para os mediadores do sistema imune: TLR4, TRIF, IRF3, IFN- γ e iNOS. Para tais, as amostras vesicais foram seccionadas em micrótomo semiautomático CUT5062 (SLEE MAINZ, Munique, Alemanha), obtidos cortes com 5 μ m de espessura e, posteriormente coletados em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados com xilol, depois reidratados através de álcoois graduados e lavados em água deionizada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) a 100°C em microondas (800W de potência) por 20 minutos e, seguida por bloqueio endógeno da peroxidase com H₂O₂ a 0,3% por 15 minutos. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com solução bloqueadora contendo soro de cabra 5%, em tampão TBS-T por 30 minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente, a imunolocalização dos antígenos TLR4, TRIF, IRF3, IFN- γ e iNOS foi realizada por anticorpos primários específicos (**Tabela 2**), diluídos em soro de cabra 1% e incubados *overnight* a 4°C. O kit *Polymer HRP IHC kit EasyLink One* (EP-12-20504, EasyPath) 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 conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP) proveniente do kit *Polymer HRP IHC kit EasyLink One* por 40 minutos e, posteriormente revelados com o cromógeno 3-3' – diaminobenzidina tetrahidrocloro

(DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio *Leica DM2500*, câmera *DFC295* (*Leica*, Munique, Alemanha).

Tabela 2: Características dos anticorpos primários para imunomarcção.

Anticorpos Primários	Espécie Hospedeira	Código	Fonte
TLR2	Camundongo (monoclonal)	sc-10739	Santa Cruz Biotechnology, EUA
TLR4	Coelho (policlonal)	ABBI-251111	<i>Abbotec, EUA</i>
TRIF	Coelho (policlonal)	ab13810	Abcam, Cambridge, MA, EUA
IRF-3	Coelho (policlonal)	ab25950	Abcam, Cambridge, MA, EUA
INF- γ	Camundongo (monoclonal)	507802	<i>Biologend, EUA</i>
iNOS	Coelho (policlonal)	ab15323	Abcam, Cambridge, MA, EUA

Para avaliar a intensidade das imunorreações dos diferentes antígenos no tecido vesical, foram selecionados cinco campos com aumento de 400x para cada anticorpo. Os resultados das imunomarcções foram analisados utilizando o *software Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) em Análise de Perfil Macro a partir da seleção do urotélio e quantificação das células uroteliais positivas (adaptado de Garcia et al., 2016). Os dados quantitativos foram avaliados de duas maneiras: Imunorreatividade Total e Intensidade da Imunorreatividade. A imunorreatividade total foi obtida como o resultado da porcentagem de células uroteliais e/ ou estromais negativas para determinado anticorpo subtraídas de 100%, ou seja, os valores representam o total de células uroteliais e/ ou estromais no campo que apresentaram imunorreação para o anticorpo avaliado. A análise da Intensidade da Imunorreatividade foi realizada a partir da categorização da imunorreação ocorrente nas células uroteliais e/ ou estromais por critério de intensidade. As categorias definidas no *software Image J* em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células positivas.

3.6- Análises Toxicológicas da Imunoterapia com OncoTherad®

Para avaliar os possíveis tóxicos locais e/ ou sistêmicos da imunoterapia com OncoTherad®, todos os pacientes foram avaliados clinicamente de acordo com a Escala de Toxicidade proposta pelo *4th Common Terminology Criteria for Adverse Events* (Nacional Cancer Institute, 2010) (**Anexo 4**). Para tal, amostras de sangue e urina foram coletadas de três em três meses no 1º ano e semestral no 2º ano, para as seguintes avaliações: hemograma (hemoglobina e leucócitos); trombograma; níveis séricos de: glicose, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), gama glutamil transpeptidase (Gama GT), uréia, creatinina. Tais avaliações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Municipal de Paulínia-SP.

Os efeitos tóxicos locais foram avaliados através de achados inflamatórios durante a cistoscopia, presença de hematúria e a avaliação de Sintomas do Trato Urinário Inferior.

3.7- Análises Estatísticas

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo) das variáveis numéricas. Para verificar a resposta ao tratamento com OncoTherad® segundo gradação histológica, tamanho e focalidade dos tumores foram obtidas frequências (absolutas e percentuais) e utilizado teste exato de Fisher.

Para as análises de recidiva e parâmetros sorológicos bioquímicos antes e após o tratamento com OncoTherad®, as variáveis quantitativas foram apresentadas em valores de tendência central e de dispersão. A homogeneidade da variância e aderência para curva normal foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-smirnov, tendo em vista que as variáveis não apresentaram distribuição normal foi utilizado teste não paramétrico [Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)].

Para o tempo de sobrevida livre de recidiva foram obtidas medidas descritivas (média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo) segundo o tempo de resposta ao tratamento (resposta patológica completa). A curva de sobrevida livre de recidiva foi

elaborada com o método de Kaplan-Meier e apresentado, juntamente, resumo estatístico.

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

A ocorrência de reações adversas (Não ou Sim) segundo o grau de intensidade (1-2 ou 3-4) foi avaliada pelo teste de McNemar e, também, obtidas medidas descritivas para testar a diferença entre medianas do número total de reações graus 1-2 versus 3-4 com teste de Wilcoxon. Também foi avaliado cada tipo de reação individualmente e obtidas frequências (absoluta e percentual).

As análises estatísticas foram realizadas pelo Serviço de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP, utilizando os seguintes programas computacionais:

- *The SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA.
- *R versão 3.4.2. Copyright (C) 2017 The R Foundation for Statistical Computing.*

O nível de significância adotado para o estudo foi de 5% e, as referências bibliográficas utilizadas foram: Fleiss, 1981; Collet, 1994; Conover, 1994.

3.8- Financiamento

Os recursos financeiros para execução desse trabalho foram provenientes de Auxílios Regulares apoiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), em especial o Auxílio Pesquisa Regular:

- **Processo 2020/03419-6:** “EFEITOS TERAPÊUTICOS E TOXICOLÓGICOS DA IMUNOTERAPIA COM ONCOTHERAD (MRB-CFI-1) EM PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO RECIDIVADO NÃO RESPONSIVO À TERAPIA COM BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG)” (**Anexo 5**)

4. RESULTADOS

4.1- Características dos pacientes

Um total de 29 pacientes preencheram os critérios de inclusão e iniciaram o tratamento com OncoTherad®, no período de agosto de 2018 à julho de 2020, totalizando 24 meses de seguimento. No período de seguimento de 24 meses, nenhum paciente foi excluído do protocolo.

Do total de 29 pacientes incluídos no protocolo, 18 (62,1%) foram homens e 11 (37,9%) mulheres, com média de idade de 65 anos (**Tabela 3**).

Considerando os fatores de risco para câncer de bexiga, tabagistas atuais representaram 24,1% do total pacientes; ex-tabagistas 65,5% e; não tabagistas 10,4% (**Tabela 3**). Ainda, um dos pacientes mantinha constante contato com anilina na indústria de tintas (**Tabela 3**).

A maioria dos pacientes incluídos (86,2%) fizeram 2 cursos prévios de terapia intravesical com oncoBCG (**Tabela 3**). Sete pacientes incluídos (24,1%) fizeram uso prévio de quimioterapia intravesical com Gemcitabina, após falha ou falta de oncoBCG (**Tabela 3**).

Em relação ao estadiamento e gradação histológica inicial, após tratamento com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical, a maioria dos tumores foram pTa alto grau (55,2%) seguidos de pT1 alto grau (34,5%) e pTis (10,3%) (**Tabela 4**). A maioria dos tumores apresentaram-se como lesões solitárias em 58,6% dos pacientes e, multifocais em 41,4% (**Tabela 4**). Tumores >3 cm ocorreram em 89,7% dos pacientes, enquanto tumores <3 cm ocorreram em 10,3% (**Tabela 4**).

A média de recidivas após curso prévio de oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical com Gemcitabina foi de 2,2 recidivas por paciente. A média e a mediana de tempo da última recidiva, considerando apenas os últimos 24 meses de tratamento com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical, foram de 10,3 e 8,0 meses, respectivamente (**Tabela 4**).

Tabela 3: Características básicas do estudo (N= 29).

Características	No. (%)
Tempo de Seguimento	24 meses (Agosto de 2018 à Julho de 2020)
Média de Idade (anos)	65 (34-96)
Gênero	
Homem	18 (62,1%)
Mulher	11 (37,9%)
Tabagismo	
Não-Tabagistas	03 (10,4%)
Ex-Tabagistas	19 (65,5%)
Tabagistas Atuais	07 (24,1%)
Contato com Anilina	01 (3,4%)
Número de Ciclos de oncoBCG Administrados	
1	04 (13,8%)
2	25 (86,2%)
Uso de Quimioterapia Intravesical	07 (24,1%)

Tabela 4: Frequências gerais das variáveis categóricas (estadiamento/ graduação histológica, focalidade e tamanho dos tumores) e medidas descritivas das variáveis quantitativas (número de recidivas e tempo da última recidiva) após tratamento com oncoBCG e/ ou quimioterapia

Variável	N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Estadiamento/ Gradação Histológica							
pT1 Alto Grau	10	34,5	-	-	-	-	-
pTa Alto Grau	16	55,2	-	-	-	-	-
pTis	03	10,3	-	-	-	-	-
Focalidade dos Tumores							
Multifocal	12	41,4	-	-	-	-	-
Solitária	17	58,6	-	-	-	-	-
Tamanho dos Tumores							
<3 cm	03	10,3	-	-	-	-	-
>3 cm	26	89,7	-	-	-	-	-
Número de Recidivas							
1	04	13,8	-	-	-	-	-
2	17	58,6	-	-	-	-	-
3	07	24,1	-	-	-	-	-
4	01	3,4	-	-	-	-	-
Total	29	100	2,2	0,7	1,0	2,0	4,0
Tempo da Última Recidiva (em 24 Meses)							
	29	100	10,3	5,5	3,0	8,0	24,0

intravesical.

4.2- Imunoterapia com OncoTherad® foi eficaz no tratamento do CBNMI, promovendo elevadas taxas de Resposta Patológica Completa (RPC) e aumento na Sobrevida Livre de Recidiva (SLR) e Tempo de Recidiva da Doença no seguimento de 24 Meses

No seguimento de 3 a 9 meses do tratamento com OncoTherad®, nenhum paciente apresentou recidiva (**Tabela 5**). Contudo, um total de 06 pacientes apresentou recidiva ao longo dos 24 meses de seguimento, sendo 03 pacientes no seguimento de 10 a 12 meses, 02 no seguimento de 13 a 18 meses e 01 no seguimento de 19 a 24 meses (**Tabela 5**).

Ainda, a imunoterapia com OncoTherad® foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$)* quando comparada com o tratamento prévio com OncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical para o número de recidivas (**Tabela 5; Figura 2**). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de recidivas nos períodos de seguimento com OncoTherad® ($p > 0,05$)* (**Figura 2**).

Em relação ao estadiamento/ graduação histológica, os tumores pTa baixo grau, pT1 alto grau e pTa alto grau ocorreram em 50,0%, 33,3% e 16,7% dos pacientes que recidivaram ao tratamento com OncoTherad® (**Tabela 5**). A imunoterapia OncoTherad® reduziu significativamente a gradação histológica em relação ao tratamento prévio com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical (**Tabela 6**). Tumores de alto grau ocorreram em 100% dos pacientes submetidos ao tratamento prévio com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical, enquanto no tratamento com OncoTherad®, 50,0% foram de alto grau e 50% de baixo grau (**Tabela 6**).

A maioria dos pacientes, 83,3% (05/06 pacientes), que recidivaram ao tratamento com OncoTherad® apresentaram lesões <3 cm, sendo que essas ocorreram de forma solitária (**Tabelas 5 e 6**). Similarmente a gradação histológica, a imunoterapia OncoTherad® reduziu significativamente o tamanho e a focalidade das lesões em relação ao tratamento prévio com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical (**Tabela 6**).

Um total de 23 pacientes (79,3%) apresentou resposta patológica completa (RPC) após 24 meses de seguimento com OncoTherad® (**Tabela 5; Quadro 1**). No seguimento de 24 meses, a SLR foi de 22,2 meses e a duração da resposta de 15,3 meses (**Tabela 5**).

A Curva de Kaplan-Meier para SLR no seguimento de 24 meses do tratamento com OncoTherad®, mostrou que o tempo médio para recidiva da doença foi de 20,6 meses (ou 618 dias) (**Quadro 1**).

Tabela 5: Frequências gerais das variáveis categóricas (estadiamento/ gradação histológica, focalidade e tamanho dos tumores, resposta patológica completa) e medidas descritivas das variáveis quantitativas (número de recidivas, sobrevida livre de recidiva e duração da resposta) durante os 24 meses de tratamento com OncoTherad®.

Variável	N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Número de Recidivas							
3 a 9 Meses de Seguimento	0	0	0	0	0	0	0
10 a 12 Meses de Seguimento	03	50,0	0,10	0,30	0	0	1
13 a 18 Meses de Seguimento	01	16,7	0,03	0,18	0	0	1
19 a 24 Meses de Seguimento	02	33,3	0,07	0,26	0	0	1
	Frequência Ausente= 23						
Total	06	20,7	0,20	0,40	0	0	1,0
Estadiamento/ Gradação Histológica							
pT1 Alto Grau	02	33,3%	-	-	-	-	-
pTa Alto Grau	01	16,7%	-	-	-	-	-
pTa Baixo Grau	03	50,0%	-	-	-	-	-
	Frequência Ausente= 23						
Focalidade dos Tumores							
Multifocal	01	16,7	-	-	-	-	-
Solitária	05	83,3	-	-	-	-	-
	Frequência Ausente= 23						
Tamanho dos Tumores							
<3 cm	05	83,3	-	-	-	-	-
>3 cm	01	16,7	-	-	-	-	-
	Frequência Ausente= 23						
Resposta Patológica Completa (RPC)							
	23	79,3	-	-	-	-	-
Sobrevida Livre de Recidiva (em 24 Meses)							
	29	100	22,2	4,1	10,0	24,0	24,0
Duração da Resposta (em 24 meses)							
	6	20,7	15,3	5,0	10,0	15,0	22,0

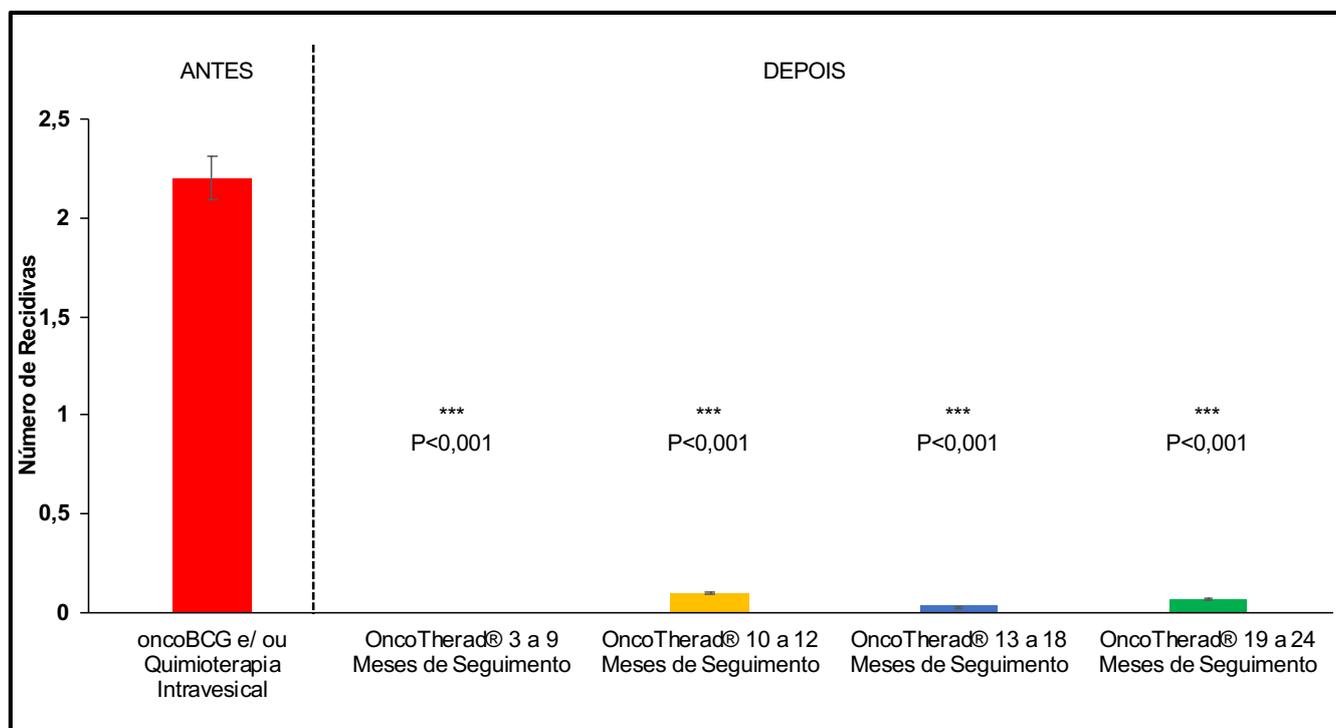


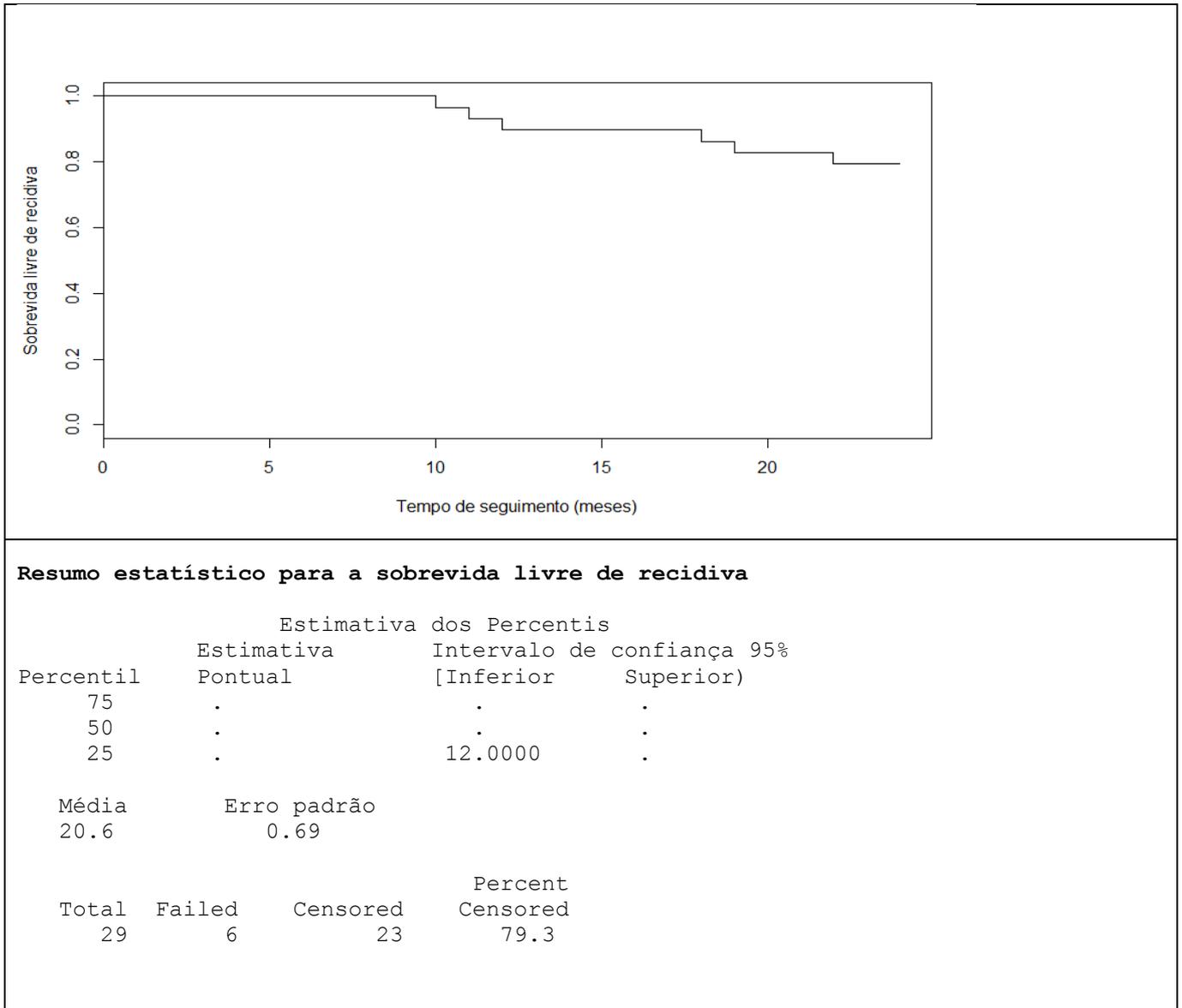
Figura 2: Avaliação do número de recidivas antes (oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical) e após o tratamento com OncoTherad® durante os 24 meses de seguimento.

Tabela 6: Avaliação da gradação histológica, tamanho e focalidade dos tumores antes (oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical) e após o tratamento com OncoTherad®.

Variável	oncoBCG e/ ou Quimioterapia Intravesical		OncoTherad®		Valor-P
	N	%	N	%	
Gradação Histológica					
Alto Grau	29	100	03	50,0 *	0,0055 (Fisher)
Baixo Grau	0	0	03	50,0 *	
			Frequência Ausente= 23		
Tamanho dos Tumores					
<3 cm	03	10,3	05	83,3 *	0,0055 (Fisher)
>3 cm	26	89,7	01	16,7 *	
			Frequência Ausente= 23		
Focalidade dos Tumores					
Multifocal	12	41,4	01	16,7 *	0,0055 (Fisher)
Solitária	17	58,6	05	83,3 *	
			Frequência Ausente= 23		

*Significância estatística

Quadro 1: Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva no seguimento de 24 meses do tratamento com OncoTherad®.



4.3- Imunoterapia com OncoTherad® promoveu alterações cistoscópicas e teciduais não-neoplásicas na bexiga urinária ao final dos 24 meses de seguimento

Os exames ultrassonográficos e/ ou cistoscópicos iniciais revelaram lesões neoplásicas >3 cm na bexiga urinária da maioria dos pacientes (89,7% - **Tabela 6**) submetidos ao tratamento prévio com oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical (**Figuras 3A, 3B, 4A, 5A, 5B**).

Ao final dos 24 meses de seguimento com OncoTherad®, 13,8% (**Tabela 7**) dos pacientes apresentaram ultrassonografia (**Figura 3C, 4B, 5C**), cistoscopia (**Figura 3D**) e histologia (**Figura 3E**) normais.

Alterações teciduais não-neoplásicas como cistite crônica folicular, cistite crônica discreta e hiperplasia urotelial plana com atipias reativas, ocorreram em 51,7%, 20,7% e 6,9% dos pacientes, respectivamente (**Tabela 7**). A cistite crônica folicular foi caracterizada pela presença de numerosas lesões planas dispersas na mucosa vesical durante as cistoscopias (**Figura 4C**). Histologicamente, as bexigas apresentaram numerosos folículos linfóides primários e secundários, sendo os folículos primários caracterizados pela presença de centro germinativo contendo linfócitos, além de centrócitos (pequenos e clivados), centroblastos (grandes e nucléolos evidentes) e macrófagos (**Figuras 4D, 4E**). Assim, um dos principais efeitos da imunoterapia com OncoTherad® foi a indução na formação de folículos linfóides, os quais podem estar relacionados com os efeitos imunoprotetores.

Cistite crônica erosiva com tecido de granulação ocorreu em 6,9% dos pacientes (**Tabela 7**), sendo caracterizada nas cistoscopias pela presença de projeções curtas e esparsas (**Figura 5D**) e, histologicamente pela presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com fragmentos de tecido de granulação (**Figuras 5E, 5F**).

Tabela 7: Respostas terapêuticas teciduais (não-neoplásicas) do OncoTherad® ao final dos 24 meses de seguimento (N= 29).

Respostas Terapêuticas	N	%
Histologia Normal	04	13,8
Alterações Histológicas Não-Neoplásicas		
Cistite Crônica Folicular	15	51,7
Cistite Crônica Discreta	06	20,7
Cistite Erosiva + Tecido Granulação	02	6,9
Hiperplasia Urotelial Plana + Atipia Reativa	02	6,9

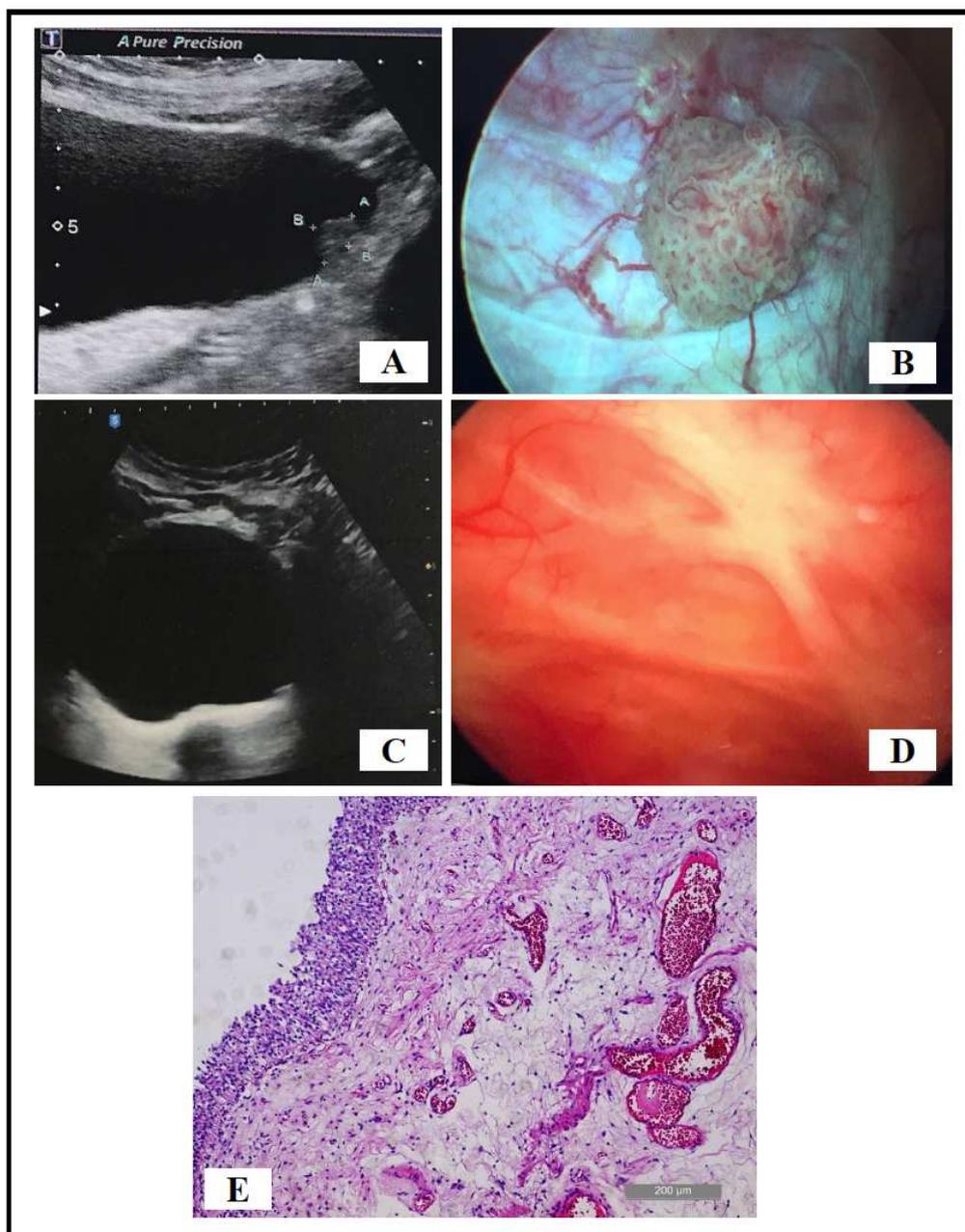


Figura 3: Ultrassonografias, Cistoscopias e Fotomicrografia representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hipercólica ovalada de contornos levemente ovalados, medindo 3,0 x 1,0 x 0,9 cm na parede lateral esquerda; (B) imagem cistoscópica confirmando lesão vegetante > 3 cm na parede lateral esquerda. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (C), (D) bexiga com paredes regulares e mucosa vesical livre de lesões vegetantes, apresentando apenas cicatrizes prévias de Ressecção Transuretral (RTU). (E) Histologia normal: Urotélio composto por 2-4 camadas: uma camada apical composta por células em guarda-chuva, uma camada intermédia de células e uma camada de células basais; Lâmina própria composta por fibras colágenas, fibras musculares lisas e vasos sanguíneos.

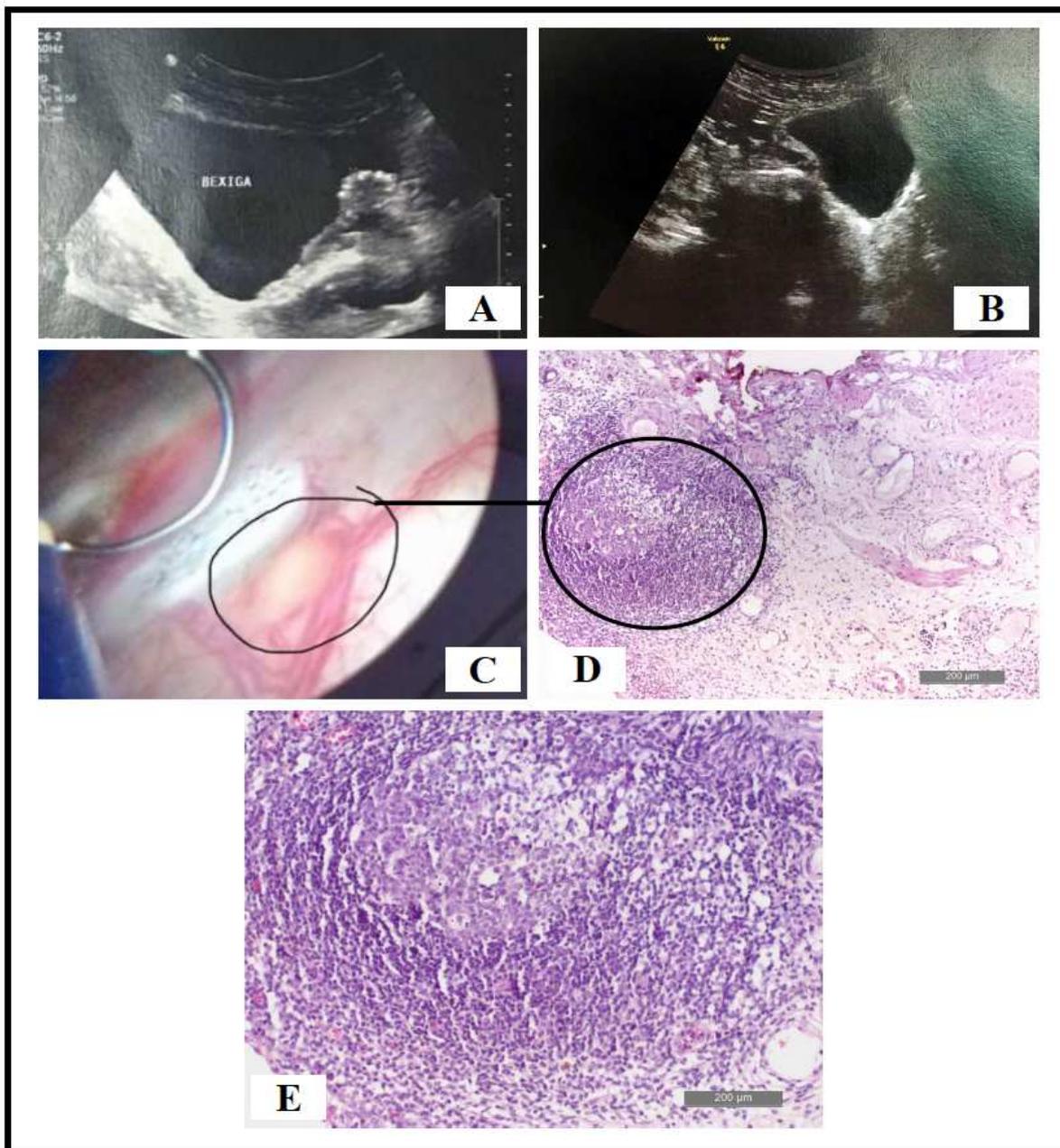


Figura 4: Ultrassonografias, Cistoscopia e Fotomicrografias representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hiperecótica, medindo 3,1 x 1,44 cm no assoalho vesical. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (B) imagem ultrassonográfica revelando bexiga de paredes finas e delgadas, com conteúdo anecótico e homogêneo; (C) imagem cistoscópica revelando lesão plana (círculo) < 3cm em assoalho vesical, caracterizada por cistite crônica folicular; (D), (E) Fotomicrografias da mesma lesão plana encontrada na cistoscopia: folículo linfóide primário (círculo) caracterizado pela presença de centro germinativo contendo linfócitos, além de centrócitos (pequenos e clivados), centroblastos (grandes e nucléolos) e macrófagos.

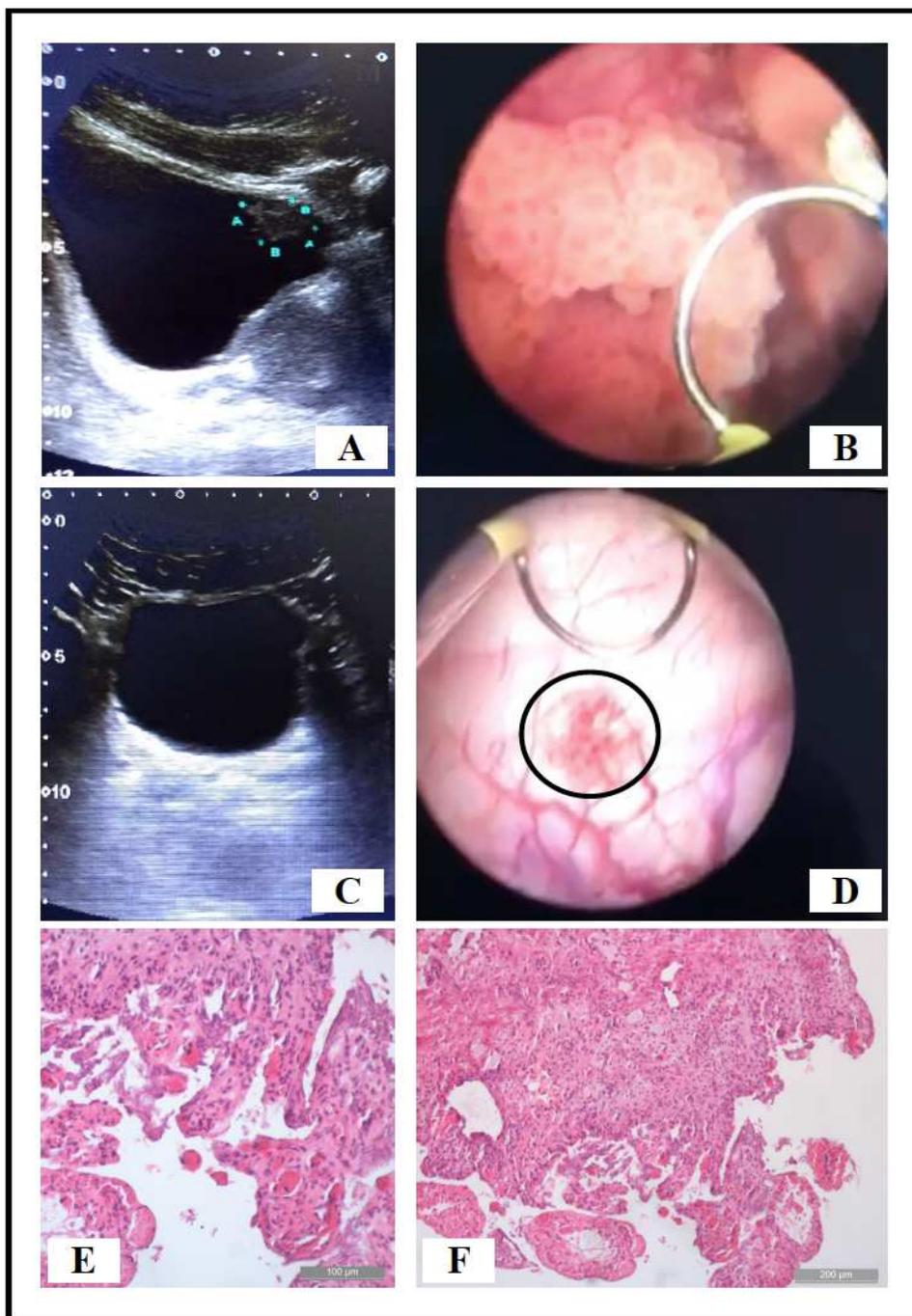


Figura 5: Ultrassonografias, Cistoscopias e Fotomicrografias representativas da bexiga urinária. Antes do tratamento com OncoTherad®: (A) imagem ultrassonográfica revelando lesão hiperecótica ovalada de contornos levemente ovalados, medindo 4,2 x 1,6 x 2,2 cm na parede anterossuperior; (B) imagem cistoscópica confirmando lesão vegetante volumosa > 3 cm na parede anterossuperior. Após seguimento de 24 meses com OncoTherad®: (C) imagem ultrassonográfica revelando bexiga de paredes finas e delgadas, com conteúdo anecóico e homogêneo; (D) mucosa vesical apresentando lesão com projeções curtas e esparsas (círculo), caracterizada histologicamente em (E), (F) como tecido de granulação (cistite erosiva + tecido de granulação).

4.4- Imunoterapia com OncoTherad® estimulou a via de sinalização do TLR4 para produção de interferon e induziu a formação de folículos linfóides primários após 24 meses de seguimento

A imunoterapia com OncoTherad® induziu a formação de folículos linfóides primários (**Figuras 4D, 4E**) na maioria dos pacientes (51,7% - **Tabela 6**) após os 24 meses de seguimento. Assim, considerando a importância da formação dos folículos linfóides primários (PLFs) no tecido vesical, as reações e análises imunohistoquímicas após o seguimento de 24 meses com OncoTherad®, foram realizadas nas regiões da bexiga urinária dos 15 pacientes (51,7%) que apresentaram os PLFs.

As imunorreatividades para TLR2 (**Figura 6a**) foram significativamente fracas (**Tabela 8**) nas biópsias que antecederam o tratamento com OncoTherad®. Similarmente, as imunorreatividades para TLR4 (**Figura 6c**), TRIF (**Figura 6e**), IRF-3 (**Figura 6g**), IFN- γ (**Figura 6i**) e iNOS (**Figura 6k**) foram significativamente fracas (**Tabela 8**) nas biópsias que antecederam o tratamento com OncoTherad®.

Em contraste, as imunorreatividades para TLR2 (**Figura 6b**), TLR4 (**Figura 6d**), TRIF (**Figura 6f**), IRF-3 (**Figura 6h**), IFN- γ (**Figura 6j**) e iNOS (**Figura 6l**) foram significativamente intensas (**Tabela 8**) nas regiões dos PLFs presentes na bexiga urinária de pacientes tratados com OncoTherad®, após 24 meses de seguimento.

Tabela 8: Média da intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos na bexiga urinária Antes e Após o tratamento com OncoTherad®.

Antígenos	Grupos	
	Antes Tratamento com OncoTherad® (n=15)	Após Tratamento com OncoTherad® (n=15)
TLR2	1 (9,8%)	3 (88,5%)*
TLR4	1 (11,9%)	3 (95,2%)*
TRIF	1 (17,4%)	3 (87,6%)*
IRF-3	1 (12,1%)	3 (92,3%)*
IFN- γ	1 (21,2%)	3 (94,8%)*
iNOS	1 (8,6%)	3 (96,9%)*

0, ausência de reatividade; 1, fraca imunorreatividade (1% – 35% células positivas); 2, moderada imunoreatividade (36% – 70% células positivas); 3, intensa imunoreatividade (> 70% células positivas).

*Significância estatística (teste de proporção, $P < 0,0001$)

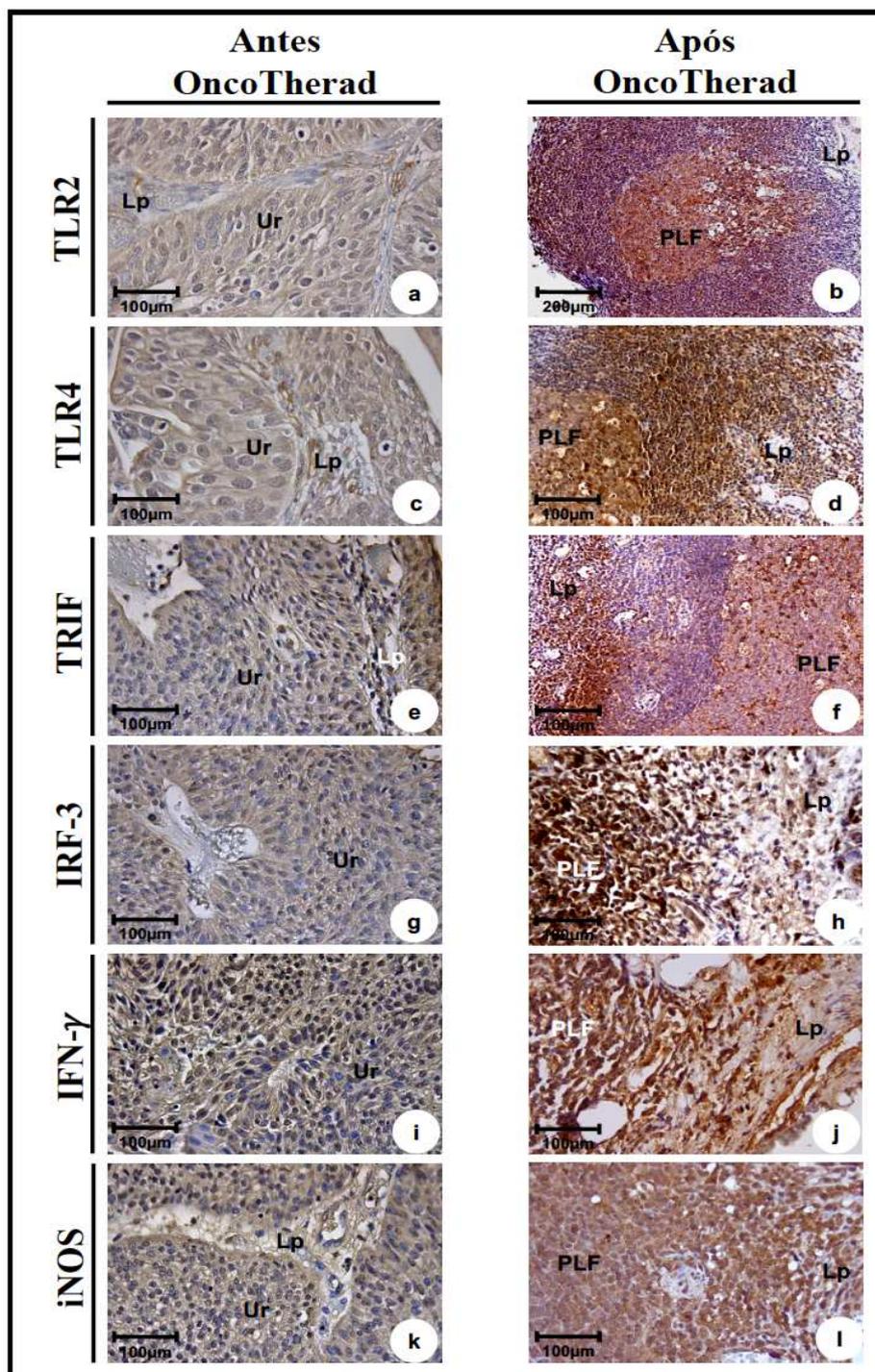


Figura 6 (6a – 6l): Imunomarcações representativas da bexiga urinária antes do tratamento com OncoTherad® (a, c, e, g, i, k) e após o seguimento de 24 meses com OncoTherad® (b, d, f, h, j, l). (a), (b) Imunomarcações para TLR2 no urotélio e região do PLF. (c), (d) Imunomarcações para TLR4 no urotélio e região do PLF. (e), (f) Imunomarcações para TRIF no urotélio e região do PLF. (g), (h) Imunomarcações para IRF-3 no urotélio e região do PLF. (i), (j) Imunomarcações para IFN- γ no urotélio e região do PLF. (k), (l) Imunomarcações para iNOS no urotélio e região do PLF. a – l: Lp – lâmina própria, PLF – folículo linfóide primário, Ur – urotélio.

4.5- Imunoterapia com OncoTherad® causou efeitos colaterais leves e moderados durante os 24 meses de seguimento

Um total de 22 pacientes (75,9%) apresentaram reações adversas decorrentes do tratamento com OncoTherad®, enquanto 7 pacientes (24,1%) não apresentaram qualquer efeito adverso (**Quadro 2**).

As reações adversas de Graus 1-2 foram significativamente mais frequentes em relação as reações de Graus 3-4 (**Tabela 9; Quadro 2**). Um total de 18 pacientes (62,1%) apresentou somente reações adversas de Graus 1-2, enquanto 4 pacientes (13,8%) apresentaram reações adversas tanto de Graus 1-2 quanto de Graus 3-4 (**Quadro 2**).

As reações adversas de Graus 1-2 mais comuns ($\geq 20\%$) foram disúria (51,7%), prurido (44,8%), cistite (34,5%), fadiga (27,6%) e *rash* cutâneo (27,6%) (**Tabela 9**).

As reações adversas mais comuns de Graus 3-4 ($\geq 2\%$) foram diarreia, dor abdominal, *rash* cutâneo, tosse e dispnéia (**Tabela 9**).

Ainda, as análises sorológicas bioquímicas para glicose, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, TGO, TGP, GamaGT, uréia e creatinina não mostraram diferenças significativas antes e após o tratamento com OncoTherad® (**Tabela 10**). Portanto, esses resultados indicaram que o tratamento com OncoTherad® não apresentou sinais de toxicidade sistêmica na dose terapêutica proposta.

Quadro 2: Ocorrência de algum tipo de reação adversa segundo o grau de intensidade.

(Teve reação - Grau 1 e 2)				Desvio						
(Teve reação - Grau 3 e 4)				Variável	N	Média	Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Frequency				Total reações Grau 1-2	29	3.07	2.96	0.00	2.00	10.00
Percent	N	S	Total	Total reações Grau 3-4	29	0.21	0.56	0.00	0.00	2.00
-----+-----+-----+				-----+-----+-----+						
N	7	0	7	Teste para comparar as medianas (Wilcoxon): Valor-p < 0.0001						
	24.1	0.00	24.1							
-----+-----+-----+										
S	18	4	22							
	62.1	13.8	75.9							
-----+-----+-----+										
Total	25	4	29							
	86.2	13.8	100.00							
Teste de McNemar: Valor-p < 0.0001										

Tabela 9: Reações adversas em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga submetidos ao tratamento intravesical e intramuscular com OncoTherad®.

Reações Adversas	OncoTherad® N= 29	
	Graus 1-2 N (%)	Graus 3-4 N (%)
Geral		
Fadiga	8 (27,6%)	0
Edema Periférico	3 (10,3%)	0
Febre	5 (17,2%)	0
Trato Gastrointestinal		
Diarréia	2 (6,9%)	1 (3,4%)
Náusea	2 (6,9%)	0
Vômito	2 (6,9%)	0
Constipação	2 (6,9%)	0
Dor Abdominal	5 (17,2%)	1 (3,4%)
Trato Urinário		
Disúria	15 (51,7%)	0
Cistite	10 (34,5%)	0
Tecido Musculoesquelético e Conjuntivo		
Artralgia	8 (27,6%)	0
Pele e Tecido Subcutâneo		
Prurido	13 (44,8%)	0
<i>Rash</i>	8 (27,6%)	2 (6,9%)
Trato Respiratório, Tórax e Mediastino		
Tosse	4 (13,8%)	1 (3,4%)
Dispneia	2 (6,9%)	1 (3,4%)

Tabela 10: Comparação dos parâmetros sorológicos bioquímicos antes e após o tratamento com OncoTherad®.

Parâmetros		Tratamentos		Valor-P
		Antes Tratamento com OncoTherad®	Após Tratamento com OncoTherad®	
Glicose (mg/dL)	N	29	29	> 0,05
	Média	120,7	92,3	
	DP	37,2	5,0	
	Máximo	215,0	101,0	
	Mínimo	87,0	82,0	
Hemoglobina (g/dL)	N	29	29	> 0,05
	Média	14,2	14,4	
	DP	2,1	2,2	
	Máximo	17,8	18,0	
	Mínimo	10,7	10,5	
Leucócitos (mm ³)	N	29	29	> 0,05
	Média	7035,1	7975,8	
	DP	2614,5	2803,4	
	Máximo	12300,0	13400,0	
	Mínimo	2567,0	3601,0	
Plaquetas (mm ³)	N	29	29	> 0,05
	Média	249286,7	230433,7	
	DP	79714,2	95086,2	
	Máximo	423000,0	420800,0	
	Mínimo	115000,0	118630,0	
TGO (U/L)	N	29	29	> 0,05
	Média	31,7	27,0	
	DP	17,2	7,4	
	Máximo	102,6	42,1	
	Mínimo	15,9	15,8	
TGP (U/L)	N	29	29	> 0,05
	Média	23,7	21,6	
	DP	11,7	10,3	
	Máximo	53,1	46,4	
	Mínimo	8,0	7,0	
Uréia (mg/dL)	N	29	29	> 0,05
	Média	41,4	38,7	
	DP	14,3	5,6	
	Máximo	94,0	51,0	
	Mínimo	27,0	27,0	
Creatinina (mg/dL)	N	29	29	> 0,05
	Média	1,1	0,9	
	DP	0,5	0,2	
	Máximo	2,8	1,4	
	Mínimo	0,5	0,6	
GamaGT (U/L)	N	29	29	> 0,05
	Média	46,3	31,6	
	DP	22,3	12,3	
	Máximo	89,0	57,0	
	Mínimo	10,0	11,0	

DP= Desvio padrão. Valores de referência: Glicose: 65 – 99 mg/dL; Hemoglobina: 12 – 18 g/dL; Leucócitos: 4.000 – 11.000/mm³; Plaquetas: 150.000 – 400.000/mm³; TGO: até 38 U/L; TGP: até 37 U/L; Uréia: 15 – 50 mg/dL; Creatinina: 0,5 – 1,2 mg/dL; GamaGT: 8 – 61 U/L.

5. DISCUSSÃO

Os tumores CBNMI de alto risco incluem todos os tumores minimamente invasivos (T1) e não-invasivos de alto grau (Ta alto grau), bem como carcinoma *in situ* (CIS). Cerca de 20% dos CBNMI atendem a essa descrição (Babjuk et al., 2013). Outros 50% dos CBNMI são de baixo risco. São tumores solitários primários de baixo grau Ta que podem recorrer, mas têm menor probabilidade de progredir. Os 30% restantes dos CBNMI incluem tumores Ta recorrentes ou múltiplos de baixo grau, classificados como de risco intermediário.

Para CBNMI de alto grau, inúmeras metanálises revisadas por pares apoiam o uso de 1 a 3 anos de imunoterapia intravesical para reduzir o risco de recorrência (Shelley et al., 2001; Böhle et al., 2003; Shelley et al., 2004; Sylvester et al., 2005; Malmström et al., 2009), progressão (Sylvester et al., 2002; Böhle & Bock, 2004; Malmström et al., 2009) e morte. A terapia de manutenção com BCG continua sendo a terapia de primeira linha mais eficaz, melhorando significativamente a sobrevida livre de recorrência por pelo menos 120 meses em comparação com o BCG de indução isolado (Lamm et al., 2000).

A terapia com BCG diminui a recorrência do CBNMI, retarda a progressão e melhora a sobrevida, com toxicidade moderada, mas geralmente aceitável. No entanto, mais de 50% dos pacientes acabam falhando em dois ou mais cursos de BCG e, como resultado, 35% morrem de câncer de bexiga. A recorrência do CBNMI após ciclo completo de BCG (indução e manutenção) é considerada falha do BCG (von Rundstedt & Lerner, 2015). Pacientes que recidivam após um intervalo livre de doença de menos de 6 meses são considerados recidivantes precoces e devem ser direcionados à cistectomia ou, em alguns casos, a ensaios clínicos. Pacientes que permanecem livres de tumor por mais de 2 anos antes da recorrência (recidiva tardia) podem ser re-induzidos com segurança com um segundo curso de BCG. Pacientes que recaem em um ponto intermediário representam uma área cinzenta de incerteza. Além disso, alguns tumores CBNMI são completamente refratários à terapia com BCG.

A não-resposta ao BCG é um momento seminal para um paciente. Os dados indicam claramente que um terceiro curso de BCG não tem valor e a seleção de terapia agressiva de segunda linha sobre cistectomia pode levar à progressão do tumor e à morte. A cistectomia, no entanto, aumenta a comorbidade e pode

representar tratamento excessivo. É crucial discutir cuidadosamente essas decisões que alteram a vida dos pacientes. Infelizmente, as diretrizes da Associação Americana de Urologia (AUA) oferecem pouca orientação. Dada a falta de dados rigorosos, muitos especialistas em CBNMI veem a cistectomia como a opção mais segura para CBNMI de alto grau não-responsivo a BCG e para pacientes com CBNMI de alto grau que não podem tolerar indução e manutenção de BCG em dose completa.

Quando o CBNMI recidiva apesar da terapia adequada com BCG, a primeira pergunta a ser feita é se há tempo para tentar outra coisa antes de proceder à cistectomia radical. Os dados sugerem que a maioria dos pacientes realmente tem cerca de 1 ano antes da queda do prognóstico (Jäger et al., 2011). Em outro estudo, os pesquisadores não encontraram diferença nas taxas de sobrevida global ou específica de câncer em cinco anos entre os pacientes que se inscreveram em ensaios clínicos e aqueles que procederam imediatamente à cistectomia (Haas et al., 2016). Pacientes com qualquer grau de invasão linfovascular ou envolvimento uretral prostático tiveram um desempenho ruim, no entanto, e provavelmente não devem ser considerados para terapia de segunda linha.

Além de todos os problemas relacionados a toxicidade e falha terapêutica de oncoBCG em pacientes com CBNMI de alto grau, a escassez na produção e as constantes interrupções na distribuição dessa imunoterapia agravam sobremaneira o prognóstico dos pacientes. Ourfali et al. (2019) estimaram o efeito clínico da escassez de oncoBCG no período de 2013 a 2016 em suas unidades de tratamento. Esses autores encontraram uma taxa significativamente maior de recorrência da doença em 24 meses após a RTU nos pacientes com CBNMI de riscos intermediário e alto quando comparada aos pacientes diagnosticados e tratados durante os três anos anteriores à escassez de oncoBCG. Além do atendimento ao paciente, os ensaios clínicos foram afetados e a escassez de BCG afetou até mesmo parcialmente os programas mundiais de imunização para prevenção da tuberculose em crianças (*Working Group on BCG Vaccines S*, 2017).

Do ponto de vista econômico, Ourfali et al. (2019) também encontraram um aumento de custo devido à diminuição da produção de oncoBCG estimada em aproximadamente € 783 por paciente com um novo diagnóstico de CBNMI durante o período de oferta restrita. Além disso, os preços dos quimioterápicos utilizados para terapia do CBNMI aumentou drasticamente durante a escassez de oncoBCG em 2014 (Ourfali et al., 2019). Na verdade, naquele ano, o preço da mitomicina aumentou quase

100%. Dados registrados nos EUA demonstraram que o valor gasto com mitomicina nos EUA entre 2012 e 2015 aumentou de \$ 4,3 milhões para \$ 15,8 milhões (Davies et al., 2017).

Corroborando com todas as informações supracitadas relacionadas a falha terapêutica, tamanho das lesões e gradação histológica, nosso estudo demonstrou que 86,2% dos pacientes fizeram pelo menos 2 cursos prévios de oncoBCG antes de serem incluídos no protocolo com OncoTherad®. Ainda, considerando a falha terapêutica e a escassez de oncoBCG, 24,1% dos pacientes foram submetidos a quimioterapia intravesical com gemcitabina antes de iniciarem nosso estudo clínico. A média de recidivas após curso prévio de oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical foi de 2,2 recidivas por paciente, sendo que todos os pacientes incluídos apresentaram progressão para estadios mais altos (pTa e pT1 alto grau, pTis). A maioria desses pacientes apresentaram tumores >3 cm, muitos dos quais apresentaram-se como lesões solitárias em 58,6% dos casos e, multifocais em 41,4%. Assim, pode-se afirmar que mesmo após o 2º. ciclo de oncoBCG e/ ou uso de quimioterapia intravesical, as condutas não foram efetivas em evitar a recidiva e a progressão da doença, restando apenas a cistectomia radical como opção terapêutica para esses pacientes, os quais não possuíam condições clínicas e/ ou refutaram o procedimento.

As opções de segunda linha atualmente disponíveis para o CBNMI que não responde ao BCG são insuficientes. Vários agentes quimioterápicos convencionais estão sendo utilizados, incluindo gemcitabina, mitomicina, gemcitabina + mitomicina, docetaxel e valrubicina. No entanto, nenhum desses esquemas terapêuticos demonstraram superioridade sobre o BCG e, permanecem em investigação. Estudos com terapias de preservação da bexiga após recidiva de BCG, relataram que cursos de instilações intravesicais de uma variedade de agentes únicos incluindo quimioterapias e preparações biológicas, mostraram taxas de sobrevida livre de recidiva <25% em dois anos e, a combinação de quimioterapias, geralmente gemcitabina com mitomicina C ou docetaxel, forneceram taxas de sobrevida livre de recidiva ≤35% em dois anos (Messing, 2017). A valrubicina, um análogo intravesical da doxorubicina, o único medicamento aprovado pela FDA para essa finalidade, tem uma taxa de 1 ano sem evidência de doença (SED) de apenas 8% (Steinberg et al., 2000). Opções *off-label* de segunda linha incluem interferon-alfa (taxa de 1 ano sem evidência de doença, 12%) (Williams et al., 1996; O'Donnell et al., 2004), gemcitabina (21%) (Dalbagni et al., 2006) e mitomicina C (23%) (Malmström et al., 1999). Quando

vários estudos relataram taxas de SED em 5 anos de 20% a 40% para cistectomia radical, a cistectomia claramente continua sendo a opção mais segura.

A associação de BCG com interferon merece menção. Um estudo multicêntrico desse regime em pacientes que não receberam BCG ou falharam na terapia com BCG não encontrou diferença estatística na sobrevida livre de recorrência durante o período médio de 24 meses de acompanhamento (57% vs. 42%; $p = 0,06$) (O'Donnell et al., 2004; Joudi et al., 2006). Uma análise mais detalhada dos dados mostrou, no entanto, que apenas 44% dos pacientes apresentaram falha de oncoBCG nos casos de CBNMI de alto grau e 61% receberam apenas um curso de BCG. Os pacientes que não responderam ao BCG não apresentaram resposta satisfatória com a combinação de BCG e interferon; e essa opção não deve ser considerada para esses pacientes.

A terapia gênica intravesical é promissora no CBNMI. A bexiga como um órgão ideal para terapia gênica: o vetor tem contato direto com o tumor, e a urina e o tecido podem ser facilmente amostrados para estudos e monitoramento correlatos. Modelos animais também estão disponíveis para otimizar a terapia. Trabalhos iniciais indicaram que, quando administrado com Syn3 (uma molécula surfactante), o gene do interferon adenoviral alfa (Ad-IFN α) induziu a regressão de células do câncer de bexiga humano em camundongos atímicos; a dosagem a cada 3 meses levou a altos níveis terapêuticos sustentados de interferon alfa (Benedict et al., 2004; Connor et al., 2005). Em um estudo fase I de 14 pacientes CBNMI de alto grau que falharam ao BCG, a terapia gênica Ad-IFN α / Syn3 induziu resposta completa em seis pacientes em 3 meses de seguimento, e 36% da coorte total apresentaram resposta completa durável em 12 meses (Dinney et al., 2013).

Os inibidores de “*checkpoints*” imunológicos são opções de crescente interesse para a comunidade do câncer de bexiga. Questões importantes de segurança incluem se os inibidores de “*checkpoints*” podem retardar ou alterar o plano operatório, com implicações negativas para os pacientes, e se a toxicidade é proporcional à letalidade do CBNMI. Atualmente, estão em andamento estudos para os inibidores da PDL-1 atezolizumab e pembrolizumab no CBNMI não-responsivo a terapia com BCG. Alane et al. (2019) conduziram um estudo de fase I de associação de BCG intravesical com pembrolizumab sistêmico (*clinical trial: MK-3475-676/ KEYNOTE-676*) em 9 pacientes com CBNMI recidivado e não-responsivo ao BCG. Os eventos adversos mais comuns da combinação BCG e pembrolizumab foram fadiga e cistite, e todos os casos foram de graus 1 ou 2. Dois pacientes morreram durante o período experimental. Um

paciente morreu devido à progressão do CBNMI para o trato urinário superior. O outro paciente morreu após cistectomia (por doença progressiva) devido a causas não relacionadas ao tratamento experimental. Dos 9 pacientes tratados, 6 não apresentaram evidências de doença na bexiga e 1 teve uma resposta mista (progressão apenas no trato urinário superior) nas 19 semanas de seguimento. Os resultados desse estudo são encorajadores, porém o número de pacientes é baixo e o tempo de seguimento curto, o que limita cientificamente qualquer tipo de conclusão a despeito dessa associação terapêutica. Outro importante estudo, *KEYNOTE-057 (clinical trial: NCT0262596)*, avaliou o uso de pembrolizumab como monoterapia em 108 pacientes CBNMI recidivado e não-responsivo a oncoBCG (Balar et al., 2019). A taxa de resposta completa foi de 41,2% no seguimento de 13,5 meses. Nenhum dos pacientes progrediu para doença músculo invasiva ou metástase durante o tratamento (Balar et al., 2019).

O FDA e o *International Bladder Cancer Group* criaram um conjunto de diretrizes para orientar ensaios clínicos que envolvam braço único para avaliação de novas terapias, considerando a falta de braço controle aceitável (*US Food and Drug Administration*, 2018). O FDA recomenda a resposta completa (RC) como desfecho primário de eficácia do tratamento e estipula que os pacientes devam ser acompanhados a cada 3 meses no primeiro ano, semestralmente no segundo ano e anualmente a partir de então (*US Food and Drug Administration*, 2018). O *International Bladder Cancer Group* recomenda o uso de RC para tumores CIS e sobrevida livre de recidiva (SLR) para tumores papilífero de alto grau como desfecho primário de eficácia (Kamat et al., 2017).

Assim, nosso estudo com a imunoterapia com OncoTherad® foi consistente com as orientações do FDA e *International Bladder Cancer Group*, uma vez que utilizamos como desfecho primário a RPC (ou simplesmente RC) e a SLR, além do acompanhamento clínico trimestral no primeiro ano e semestral no segundo ano. A imunoterapia com OncoTherad®, a qual mostra novas propriedades terapêuticas em comparação com os tratamentos padrão, parece ser um candidato valioso no tratamento do CBNMI, em especial na condição de falha da oncoBCG. Em nossos estudos anteriores, mostramos várias propriedades e efeitos terapêuticos benéficos do OncoTherad® (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a, Fávaro et al., 2019b; Fávaro & Duran, 2020). Nos ensaios pré-clínicos, o OncoTherad® demonstrou uma efetividade antitumoral em torno de 80% e

uma clara superioridade sobre o BCG, em estudos comparativos de eficácia e segurança (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a, Fávaro et al., 2019b; Fávaro et al., 2020).

Com os resultados de segurança e eficácia em estudos pré-clínicos, nosso grupo desenvolveu um ensaio clínico-veterinário em cães com câncer de bexiga espontâneo. Os animais receberam uma aplicação semanal por seis semanas consecutivas de OncoTherad® pelas vias intravesical (44 mg/mL) e intramuscular (22 mg/mL); depois uma aplicação quinzenal (intravesical e intramuscular) por 6 meses e uma aplicação mensal (intravesical e intramuscular) por mais 6 meses, totalizando 24 aplicações. Após as três primeiras aplicações de OncoTherad®, 83,3% dos pacientes apresentaram doença estável e, 16,7% remissão parcial da doença. Após a 24ª aplicação, 100% dos pacientes apresentaram remissão parcial da doença. A taxa de sobrevida livre de recidiva/ progressão foi de 100% ao longo dos 402 dias de seguimento com OncoTherad®. Ainda, o tratamento com OncoTherad® não apresentou sinais de toxicidade sistêmica nas doses terapêuticas propostas (Fávaro & Duran, 2017; Böckelmann et al., 2019; Fávaro & Duran, 2020).

No presente estudo, a RC (ou resposta patológica completa) foi de 79,3% no seguimento de 24 meses da imunoterapia com OncoTherad®. Ainda, a SLR foi de 22,2 meses e a duração da resposta de 15,3 meses. Já o tempo médio para recidiva da doença foi de 20,6 meses (ou 618 dias). Assim, considerando os dados em conjunto, os efeitos antitumorais da imunoterapia com OncoTherad® foram muito superiores ao tratamento padrão com oncoBCG, bem como superiores aos outros esquemas terapêuticos utilizados para doença não-responsiva a oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical, o que coloca essa imunoterapia como uma opção terapêutica valiosa no tratamento do CBNMI.

Em relação aos efeitos colaterais, 75,9% dos pacientes apresentaram reações adversas decorrentes do tratamento com OncoTherad®, enquanto 7 pacientes (24,1%) não apresentaram qualquer efeito adverso. As reações adversas mais comuns desencadeadas pela imunoterapia com OncoTherad® foram de Graus 1-2, tais como: disúria, prurido, cistite, fadiga e *rash* cutâneo. Já, as reações adversas mais comuns de Graus 3-4 foram diarreia, dor abdominal, *rash* cutâneo, tosse e dispnéia. Ainda, os níveis séricos de glicose, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, TGO, TGP, GamaGT, uréia e creatinina não mostraram diferenças significativas após o tratamento com OncoTherad®.

A toxicidade da oncoBCG pode ser dividida em efeitos colaterais locais e sistêmicos. As toxicidades locais são geralmente mais frequentes e menos graves que a toxicidade sistêmica, mas são mais frequentemente a causa da interrupção do tratamento (van der Meijden et al., 2003). No entanto, a maioria dos efeitos colaterais locais são breves (O'Donnell & Böhle, 2006). A incidência de efeitos colaterais locais é semelhante com ou sem terapia de manutenção. Para pacientes que recebem ou não recebem terapia de manutenção, respectivamente, incluem sintomas do trato urinário inferior (57-71%, 38-59%) e hematúria (20%, 29%) (Hall et al., 2007).

Da mesma forma, outros estudos não encontraram diferença nos efeitos colaterais sistêmicos entre os grupos de manutenção e não-manutenção (Böhle et al., 2003) e até reduziram a toxicidade no período após os primeiros 6 meses de tratamento (van der Meijden et al., 2003). Os efeitos colaterais sistêmicos podem ser divididos em tipos infecciosos (cistite bacteriana, epididimite, prostatite, infecção sistêmica) e não-infecciosos (artralgias, reações cutâneas, anafilaxia). As toxicidades sistêmicas mais comuns relatadas incluem febre, calafrios e sintomas de gripe (22 a 30%, 19 a 26%); epididimite, prostatite e infecções uretrais (4%, 4%); e infecção sistêmica (7%, 1%) para pacientes tratados com manutenção *versus* nenhuma manutenção, respectivamente. Toxicidade sistêmica menos severa, como febre (>39,5°C), erupção cutânea, artralgias e BCGites (infecção estabelecida por BCG com manifestação em outro órgão ocorreu a uma taxa de 2 a 6% (O'Donnell & Böhle, 2006; Hall et al., 2007).

Os efeitos adversos do pembrolizumab como monoterapia foram avaliados em 102 pacientes, sendo que 97,1% deles tiveram pelo menos um evento adverso, 65,7% tiveram eventos adversos relacionados ao tratamento e 29,4% tiveram eventos adversos de graus 3-5 (Balar et al., 2019).

Assim, o presente estudo demonstrou que a imunoterapia com Oncotherad® promoveu efeitos adversos de intensidades e frequências menores aos encontrados na terapia padrão com oncoBCG e uso de inibidores de “*checkpoints*” imunológicos, o que torna essa imunoterapia segura e eficaz no manejo de pacientes com CBNMI.

Os agonistas de TLRs são objeto de intensa pesquisa e desenvolvimento para o tratamento do câncer, incluindo o CB (Steinberg et al., 2011; Fávaro et al., 2012; Favaro & Duran, 2020). Os TLRs, que são expressos tanto em células imunes quanto em algumas células epiteliais, desempenham um papel importante na ativação de respostas imunes inatas e adaptativas (Steinberg et al., 2011; Ayari et al., 2011; LaRue

et al., 2013). Estudos pré-clínicos, clínico-veterinários e clínicos em seres humanos Fase I/ II demonstraram que a imunoterapia com OncoTherad® levou à ativação distinta do sistema imune inato mediada por TLRs-2 e 4, resultando no aumento dos mediadores da via de sinalização para produção de interferon, culminando com a maior eficácia desse nanocomposto no tratamento do CBNMI em relação ao tratamento com oncoBCG (Fávaro & Duran, 2017; Duran et al., 2019; Fávaro et al., 2019a; Fávaro & Duran, 2020). Em experimentos com roedores e cães, o mesmo grupo demonstrou que o OncoTherad® foi capaz de diminuir a expressão do sistema RANK/RANK-L e, conseqüentemente impedir a formação de metástases e/ ou impedir a progressão das mesmas (Fávaro & Duran, 2017; Fávaro et al., 2019a; Fávaro & Duran, 2020).

Um dos mecanismos imunes para detecção e controle da proliferação de células tumorais, envolve a produção de citocinas inflamatórias mediada por TLR4 em macrófagos (Shankaran et al. 2001; Luo et al., 2004). A via de sinalização não-canônica do TLR4 é responsável pela indução da produção de IFNs, os quais possuem efeitos antitumorais por indução de TRAIL, um potente indutor da morte celular de células neoplásicas malignas (Luo et al., 2004). A ação supressora tumoral do sistema imune depende das ações do IFN- γ , o qual estimula várias vias antiproliferativas e tumoricidas em macrófagos e em linhagens de células tumorais (Shankaran et al., 2001), além de desempenhar papel precoce na proteção contra metástases (Li et al., 2007; Martini et al., 2010; Alshaker & Matalaka, 2011; Tate et al., 2012).

Ainda, os IFNs estão envolvidos nos mecanismos de ativação do sistema imune inato para detecção de tumores e modulação das respostas de células T (Woo et al., 2014). A ativação de linfócitos TCD8⁺ contra tumores foi prejudicada em camundongos que não possuíam STING. Woo et al. (2014) demonstraram, *in vitro*, que através de STING e IRF-3, a produção de IFNs e a ativação de DCs foram desencadeadas por DNA proveniente de células neoplásicas, indicando o envolvimento de um mecanismo de detecção de DNA citosólico. Em modelos *in vivo*, o DNA de células neoplásicas malignas foi detectado no interior de células APC do hospedeiro, sendo que tal resultado se correlacionou com a produção de IFNs e ativação de STING (Woo et al., 2014).

Corroborando com os resultados pré-clínicos e clínico veterinário em câncer de bexiga, o presente estudo demonstrou que a imunoterapia com OncoTherad® aumentou as imunorreatividades dos mediadores via de sinalização de interferon mediada por TLR4, a qual induziu a formação de folículos linfóides primários (PLFs) na maioria dos pacientes (51,7%), o que evidencia a efetividade dessa via de sinalização na eficácia do tratamento.

Os PLFs são a espinha dorsal da formação de redes de células dendríticas foliculares, as quais são importantes para as reações do centro germinativo, durante as quais a maturação por afinidade cria anticorpos otimizados nas respostas imunes adaptativas (Deshane & Chaplin, 2010). A expressão dos TLRs por células da linhagem mielóide fornece uma ponte entre as respostas imunes inatas e adaptativas em células dendríticas e células de linhagem de macrófagos-monócitos que expressam TLRs, melhorando a função celular apresentadora de antígenos e a liberação de citocinas e citocinas essenciais para a ativação de células T CD8⁺ e CD4⁺ (Manicassamy & Pulendran, 2009; Deshane & Chaplin, 2010). Essas descobertas estabeleceram TLRs como ativadores principais de processos que levam à imunidade celular totalmente desenvolvida. TLR4 está implicado na maturação de células dendríticas foliculares e no desenvolvimento do centro germinativo no folículo linfóide (Deshane & Chaplin, 2010).

Há uma crescente percepção de que os TLRs também aumentam as respostas imunes humorais. Isso ocorre diretamente no nível da célula B e indiretamente através da ação de outras células que cooperam com as células B. As células B expressam TLRs e podem ser estimuladas policlonalmente por ligantes de TLR (Deshane & Chaplin, 2010), como por exemplo o OncoTherad®, para proliferar e se diferenciar em células secretoras de imunoglobulinas. A sinalização de TLR permite o tráfico e o agrupamento de linfócitos B nos PLFs e, assim, promove a proliferação sustentada de células B e a geração de células B de memória e células B plasmáticas (Deshane & Chaplin, 2010). Além disso, a sinalização TLR indiretamente promove a indução de respostas de células B dependentes de células T, através da cooperação com células T CD4⁺.

Embora o papel dos TLRs na indução de respostas imunes humorais esteja bem estabelecido para células T auxiliares e programas intrínsecos de ativação de células B, pouco se sabe sobre possíveis ações dos ligantes de TLR nos PLFs e células dendríticas foliculares. Assim, o presente estudo demonstrou um importante

efeito da ativação da via de sinalização do TLR4 desencadeada pelo OncoTherad® na formação e organização dos PLFs, os quais podem estar relacionados com os feitos imunoprotetores no tecido vesical.

Em conclusão, a imunoterapia com OncoTherad® pode ser considerada como opção terapêutica segura e eficaz em pacientes com CBNMI recidivado a oncoBCG e/ ou quimioterapia intravesical, podendo fornecer benefícios para a prevenção da recidiva tumoral, além de evitar ou adiar a necessidade de cirurgia radical nesses pacientes.

6. CONCLUSÕES

- 1) O tratamento com OncoTherad® promoveu resposta completa em 79,3% dos pacientes e sobrevida livre de recidiva de 22,2 meses no seguimento de 24 meses, demonstrando que essa imunoterapia foi superior ao tratamento padrão com BCG e/ ou quimioterapia intravesical, bem como superior aos outros esquemas terapêuticos utilizados para doença não-responsiva a oncoBCG, o que coloca o OncoTherad® como uma opção terapêutica valiosa no tratamento do CBNMI de alto grau;
- 2) A imunoterapia com OncoTherad® promoveu efeitos colaterais de intensidades e frequências menores aos encontrados na terapia padrão com oncoBCG e uso de inibidores de “*checkpoints*” imunológicos, o que torna essa imunoterapia segura e eficaz no manejo de pacientes com CBNMI;
- 3) A imunoterapia com OncoTherad® aumentou as imunorreatividades da via de sinalização de interferon mediada por TLR4, a qual induziu a formação de folículos linfóides primários (PLFs) na maioria dos pacientes, o que evidencia a efetividade dessa via de sinalização na eficácia do tratamento para CBNMI;
- 4) A ativação da via de sinalização do TLR4 desencadeada pelo OncoTherad® foi fundamental na formação e organização dos PLFs, os quais podem estar relacionados com os feitos imunoprotetores no tecido vesical;
- 5) A imunoterapia com OncoTherad® pode ser considerada como opção terapêutica segura e eficaz em pacientes com CBNMI recidivado a BCG e/ ou quimioterapia intravesical e, pode fornecer benefícios para a prevenção da recidiva tumoral, além de evitar ou adiar a necessidade de cirurgia radical nesses pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar P, Giglio AD, Perry LA, Penny-Dimri J, Babiker H, Tadokoro H, et al. Cost-effectiveness and budget impact of lung cancer immunotherapy in South America: strategies to improve access. *Immunotherapy* 2018;10:887-97.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499–511.
- Alanee S, Zawahry AE, Sana S, McVary K, Robinson K, Rao K A. Abstract CT047: Phase I trial of intravesical Bacillus Calmette-Guérin combined with intravenous Pembrolizumab in high grade nonmuscle invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2019;79:(13 Suppl):Abstract nr CT047.
- Alshaker HA, Matalka KZ. IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: the significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer Cell Int* 2011; 11: 33.
- American Cancer Society. Overview: bladder cancer. In: What are the key statistics about bladder cancer? American Cancer Society, Atlanta. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer.html>. Acesso em: 22/05/2020.
- Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017; 71:96–108.
- Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018; 379:2342-50.
- Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder cancer immunotherapy: BCG and beyond. *Adv Urol* 2012; 2012:181987.
- Ayari C, Bergeron A, LaRue H. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. *J Urol* 2011; 185:1915-21.
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Bohle A, Palou-Redorta J. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2008; 54: 303-14.
- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn VWG, Comperat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 2013; 64:639-53.
- Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Compérat EM, Hernández V, Kaasinen E, Palou J, Rouprêt M, van Rhijn BW, Shariat SF, Soukup V, Sylvester

- RJ, Zigeuner R. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol* 2017; 71:447-461.
- Balar AV, Kulkarni GS, Uchio EM, Boormans J, Mourey L, Krieger LEM, et al. Keynote 057: Phase II trial of Pembrolizumab (pembro) for patients (pts) with high-risk (HR) nonmuscle invasive bladder cancer (NMIBC) unresponsive to bacillus calmette-guérin (BCG). *J Clin Oncol* 2019; 37: (7-Supl.): 350-50.
- Benedict WF, Tao Z, Kim CS, Zhang X, Zhou JH, Adam L, et al. Intravesical Ad-IFNalpha causes marked regression of human bladder cancer growing orthotopically in nude mice and overcomes resistance to IFN-alpha protein. *Mol Ther* 2004;10:525-32.
- Berry DL, Blumenstein BA, Magyary DL, Lamm DL, Crawford ED. Local toxicity patterns associated with intravesical bacillus Calmette-Guerin: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Urol* 1996; 3: 98-100.
- Böckelmann PK, Tizziani SHS, Durán N, Fávoro WJ. New therapeutic perspective for bladder cancer in dogs: Toxicological and clinical effects of oncotherad nanostructured immunotherapy. *J Phys Conf Ser* 2019; 1323: 012022.
- Boeri L, Soligo M, Frank I, et al. Cigarette smoking is associated with adverse pathological response and increased disease recurrence amongst patients with muscle-invasive bladder cancer treated with cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy: a single-centre experience. *BJU Int* 2019; 123:1011–1019.
- Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in *Bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003; 170: 964-69.
- Böhle A, Bock PR. Intravesical bacille Calmette-Guérin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology* 2004; 63:682-86.
- Böhle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 2003; 169: 90-5.
- Bourquin C, Pommier A, Hotz C. Harnessing the immune system to fight cancer with Toll-like receptor and RIG-I-like receptor agonists. *Pharmacol Res.* 2020; 154:104192.
- Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, Atkins MB, Brassil KJ, Caterino JM, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune

- checkpoint inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2018; 36:1714-68.
- Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:1649-59.
- Brausi M, Oddens J, Sylvester R, Bono A, Van De Beek C, Van Andel G, et al. Side effects of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) in the treatment of intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of the EORTC genitourinary cancers group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol* 2014; 65: 69-76.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394-424.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54 631-51.
- Carlo MI, Ravichandran V, Srinivasan P. Cancer Susceptibility Mutations in Patients with Urothelial Malignancies. *J Clin Oncol* 2019; 38:JCO1901395.
- Cernuschi T, Malvolti S, Nickels E, Friede M. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine: A global assessment of demand and supply balance. *Vaccine* 2018; 36:498-506.
- Chang SS, Boorjian SA, Chou R, Clark PE, Daneshmand S, Konety BR, Pruthi R, Quale DZ, Ritch CR, Seigne JD, Skinner EC, Smith ND, McKiernan JM. Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol* 2016; 196:1021-9.
- Chang SS. Re: Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *J Urol* 2016; 196:1637-8.
- Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1310-6.
- Chowdhury EH, Akaike T. Bio-functional inorganic materials: an attractive branch of gene-based nano-medicine delivery for 21st century. *Curr Gene Ther* 2005; 5:669-76.
- Collett D. Modelling Survival Data in Medical Research. Chapman & Hall, Londres, 1994.
- Connor RJ, Anderson JM, Machemer T, Maneval DC, EDngler H. Sustained intravesical interferon protein exposure is achieved using an adenoviral-mediated

- gene delivery system: a study in rats evaluating dosing regimens. *Urology* 2005; 66: 224-9.
- Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. 3^a ed. John Wiley & Sons Inc. New York, 1999.
- Corrales L, Glickman LH, MCwhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE, et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity. *Cell Rep* 2015; 11: 1018-30.
- Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis: a comparison of exposures and meta-analysis of incidence and mortality risks. *Eur Urol* 2016; 70:458–466.
- Cumberbatch MG, Jubber I, Black PC, et al. Epidemiology of bladder cancer: a systematic review and contemporary update of risk factors in 2018. *Eur Urol* 2018; 74:784–795.
- Dalbagni G, Russo P, Bochner B, et al. Phase II trial of intravesical gemcitabine in bacille Calmette-Guérin-refractory transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Oncol* 2006; 24(18):2729-2734.
- Davies BJ, Hwang TJ, Kesselheim AS. Ensuring Access to Injectable Generic Drugs - The Case of Intravesical BCG for Bladder Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376:1401-1403.
- DeGeorge KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder cancer: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2017; 96:507–514.
- Deshane J, Chaplin DD. Follicular dendritic cell makes environmental sense. *Immunity* 2010; 33: 2-4.
- Dinney CP, Fisher MB, Navai N, O'Donnell MA, Cutler D, Abraham A, et al. Phase I trial of intravesical recombinant adenovirus mediated interferon- α 2b formulated in Syn3 for Bacillus Calmette-Guérin failures in nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2013; 190:850-56.
- Drake CG. Combination immunotherapy approaches. *Ann Oncol*. 2012; 23(Suppl 8): 41-6.
- Dranitsaris G, Zhu X, Adunlin G, Vincent MD. Cost effectiveness vs. affordability in the age of immuno-oncology cancer drugs. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2018; 18:351-7.
- Durán N, Dias QC, Fávaro WJ. OncoTherad: A new nanobiological response modifier, its toxicological and anticancer activities. *J Phys Conf Ser* 2019; 1323: 012018.

- Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 2003; 4:748-59.
- Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:579-91.
- Epstein JI. The new World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) classification for TA, T1 bladder tumors: is it an improvement? *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 47: 83-9.
- Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial (transitional) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1435-48.
- Fávaro, W., Durán N. Process of obtaining a nanostructured complex (CFI-1), associated to nanostructured CFI-1 with a protein (MRB-CFI-1) and its use. Brazil Patent No. PIBR 2017; 10.2017.012768.0.
- Fávaro WJ, Iantas SR, Gonçalves JM, Socca EAR, Durán N, Billis A, et al. Single-arm phase I/II study of the safety and efficacy of OncoTherad immunomodulator in patients BCG-refractory or relapsed non-muscle invasive bladder cancer. *J Clin Oncol* 2019a; 37: e16000.
- Fávaro WJ, Iantas SR, Gonçalves JM, Dias QC, Reis IB, Billis A, et al. Role of OncoTherad immunotherapy in the regulation of toll-like receptors-mediated immune system and RANK/RANKL signaling: New therapeutic perspective for non-muscle invasive bladder cancer. *J Clin Oncol* 2019b; 37:e16004.
- Fávaro WJ, Duran N. A method for producing a nanostructured complex (cfi-1), a protein-associated nanostructured complex (mrb-cfi-1) and use. US Patent App. 16/617,493, 2020.
- Ferguson FM, Gray NS. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 353-77.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:809-19.
- Fleiss JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. New York: John Wiley & Sons, 2nd ed., 1981.

- Guallar-Garrido S, Julián E. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. *Immunotargets Ther* 2020; 9:1-11.
- Galli R, Starace D, Busà R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, et al. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol* 2010; 184: 6658-69.
- Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378:2078-92.
- Garcia PV, Seiva FRF, Carniato AP, De Mello W, Durán N, Macedo AM, et al. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer* 2016; 16:422,
- Garcia, P.V.; Apolinário, L.M.; Böckelmann, P.K.; Nunes, I.S.; Durán, N.; Fávaro, W.J. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:4427-43.
- Haas CR, Barlow LJ, Badalato GM, De Castro GJ, Benson MC, McKiernan JM.. The timing of radical cystectomy for *bacillus Calmette-Guérin* failure: Comparison of outcomes and risk factors for prognosis. *J Urol* 2016; 195:1704-09.
- Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, et al. Guideline for the management of non-muscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 2007; 178: 2314-30.
- Han J, Gu X, Li Y, Wu Q. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. *Biomed Pharmacother* 2020; 129:110393.
- Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12:20-37.
- Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer -- an example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 592-601.
- Hu J, Chen JB, Cui Y. Association of metformin intake with bladder cancer risk and oncologic outcomes in type 2 diabetes mellitus patients: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97:e11596.

- INCA, Instituto Nacional de Câncer. Câncer de bexiga. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>. Acesso em 22/05/2020.
- International Union Against Cancer (UICC). *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th ed. Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C.H.; eds. New York: Wiley; 2009.
- Ishida K, Hsieh MH. Understanding urogenital schistosomiasis-related bladder cancer: an update. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5:223.
- Jahrreiss V, Pradere B, Laukhtina E, Mori K, Shariat SF. Catalog of exogenous risk factors for bladder carcinogenesis. *Curr Opin Urol* 2020; 30:449-456.
- Jäger W, Thomas C, Haag S, Hampel C, Salzer A, Thuroff JW, et al. Early vs delayed radical cystectomy for 'high-risk' carcinoma not invading bladder muscle: delay of cystectomy reduces cancer-specific survival. *BJU Int* 2011; 108:E284-E88.
- Javid N, Choi S. Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 2020; 12:297.
- Joudi FN, Smith BJ, O'Donnell MA. National BCG-Interferon Phase 2 Investigator Group. Interim results from a national multicenter phase II trial of combination *Bacillus Calmette-Guerin* plus interferon alfa-2b for superficial bladder cancer. *Urol Oncol* 2006; 24: 344-48.
- Junt T, Barchet W. Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:529-44.
- Juvet T, Mari A, Lajkosz K, Wallis CJ, Kuk C, Erlich A, Krimus L, Fleshner NE, Kulkarni GS, Zlotta AR. Sequential administration of *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) and Electromotive Drug Administration (EMDA) of mitomycin C (MMC) for the treatment of high-grade nonmuscle invasive bladder cancer after BCG failure. *Urol Oncol* 2020; 22:S1078-1439(20)30318-5.
- Kamat AM, Colombel M, Sundi D, Lamm D, Boehle A, Brausi M, et al. BCG-unresponsive non-muscle-invasive bladder cancer: recommendations from the IBCG. *Nat Rev Urol* 2017; 4: 244-55.
- Kamat AM, Lerner SP, O'Donnell M, Georgieva MV, Yang M, Inman BA, Kassouf W, Boorjian SA, Tyson MD, Kulkarni GS, Chang SS, Konety BR, Svatek RS, Balar A, Witjes JA. Evidence-based Assessment of Current and Emerging Bladder-sparing Therapies for Non-muscle-invasive Bladder Cancer After *Bacillus Calmette-Guerin* Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol* 2020; 3:318-340.

- Kang SP, Gergich K, Lubiniecki GM, de Alwis DP, Chen C, Tice MAB, et al. Pembrolizumab KEYNOTE-001: an adaptive study leading to accelerated approval for two indications and a companion diagnostic. *Ann Oncol* 2017; 28:1388-98.
- Kispert S, Marentette J, McHowat J. Cigarette smoking promotes bladder cancer via increased platelet-activating factor. *Physiol Rep* 2019; 7:e13981.
- Keller AM, Mennel RG, Georgoulas VA, Nabholz JM, Erazo A, Lluch A, et al. Randomized phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin versus vinorelbine or mitomycin C plus vinblastine in women with taxane-refractory advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22:3893-901.
- Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, Moore JM, Vanoosten RL, Moses B, et al. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 2005; 106: 3474-82.
- Klaassen Z, Kamat AM, Kassouf W, Gontero P, Villavicencio H, Bellmunt J, van Rhijn BWG, Hartmann A, Catto JWF, Kulkarni GS. Treatment Strategy for Newly Diagnosed T1 High-grade Bladder Urothelial Carcinoma: New Insights and Updated Recommendations. *Eur Urol* 2018; 74:597-608.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30:16-34.
- Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, Montie JE, Goittesman JE, Lowe BA, et al. Maintenance *bacillus Calmette-Guerin* immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 2000; 163:1124-29.
- Lamm D, Persad R, Brausi M, Buckley R, Witjes JA, Palou J, Böhle A, Kamat AM, Colombel M, Soloway M. Defining progression in nonmuscle invasive bladder cancer: it is time for a new, standard definition. *J Urol* 2014; 191:20–27.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373:23-34.
- LaRue H, Ayari C, Bergeron A, Fradet Y. Toll-like receptors in urothelial cells--targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol* 2013; 10:537-45.
- Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology. *An NY Acad Sci* 2008; 1143: 123-150.

- Li Z, Pradera F, Kammertoens T, Li B, Liu S, QIN, Z. Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection. *J Immunol* 2007; 179:1568-76.
- Liedberg, F. Early complications and morbidity of radical cystectomy. *Eur Urol Suppl.* 2010; 9: 25-30.
- Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 922:1-10.
- Liu Y, Yin H, Zhao M, Lu Q. TLR2 and TLR4 in Autoimmune diseases: A comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2014; 47: 136-47.
- Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004; 6: 297-305.
- Lynch CF, Cohen MB. Urinary system. *Cancer* 1995; 75:(1 Suppl) 316-29.
- Malm IJ, Bruno TC, Fu J, Zeng Q, Taube JM, Westra W, Pardoll D, et al. Expression profile and in vitro blockade of programmed death-1 in human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2014; 37:1088-95.
- Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus *bacillus Calmette-Guérin* for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009; 56:247-56.
- Malmström PU, Wijkström H, Lundholm C, Wester K, Busch C, Nirlen BJ. 5-year followup of a randomized prospective study comparing mitomycin C and *bacillus Calmette-Guerin* in patients with superficial bladder carcinoma. Swedish-Norwegian Bladder Cancer Study Group. *J Urol* 1999; 161: 1124-27.
- Manicassamy S, Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2009; 21: 185-93.
- Martini M, Testi MG, Pasetto M, Picchio MC, Innamorati G, Mazzocco M. IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 2010; 28: 3548-57.
- Massari F, Santoni M, Ciccarese C, Brunelli M, Conti A, Santini D, et al. Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: implications for future strategies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 96: 81-90.
- McNamara MA, Nair SK, Holl EK. RNA-based vaccines in cancer immunotherapy. *J Immunol Res* 2015; 2015:794528.

- Messing EM. Bladder sparing therapy for BCG failures - I - intravesical immunotherapy. *Bladder Cancer* 2017; 3: 313-14.
- Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell therapy: A new era in cancer immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2018; 19:5-18.
- Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003; 42:463-78.
- Moradi-Marjaneh R, Hassanian SM, Fiuji H, Soleimanpour S, Ferns GA, Avan A, et al. Toll like receptor signaling pathway as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *J Cell Physiol* 2018; 233:5613-22.
- Morales A; Eidinger D; Bruce AW. *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. *J Urol* 1976; 115: 377-80.
- Moriwaki Y, Begum NA, Kobayashi M, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T. Mycobacterium bovis *Bacillus Calmette-Guerin* and its cell wall complex induce a novel lysosomal membrane protein, SIMPLE, that bridges the missing link between lipopolysaccharide and p53-inducible gene, LITAF(PIG7), and estrogen-inducible gene, EET-1. *J Biol Chem* 2001; 276:23065-76.
- Neves H, Kwok HF. Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clin* 2015; 3:280-8.
- Nesi G, Nobili S, Cai T, et al. Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch* 2015; 467:623–633.
- Nie S. Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine* (Lond). 2010; 5: 523-8.
- O'Donnell MA, Lilli K, Leopold C. National *Bacillus Calmette-Guerin*/Interferon Phase 2 Investigator Group. Interim results from a national multicenter phase II trial of combination *bacillus Calmette-Guerin* plus interferon alfa-2b for superficial bladder cancer. *J Urol* 2004;172: 888-93.
- O'Donnell MA, Bohle A. Treatment options for BCG failures. *Worl J Urol* 2006; 24: 481-87.
- Ojea A, Noqueira JL, Solsona E, Flores N, Gomez JMF, Molina JR, et al. A multicentre, randomised prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: Low-dose *bacillus Calmette-Guerin* (27 mg) versus very low-dose *bacillus Calmette-Guerin* (13.5 mg) versus mitomycin C. *Eur Urol* 2007; 52: 1398-1406.

- Ourfali S, Ohannessian R, Fassi-Fehri H, Pages A, Badet L, Colombel M. Recurrence Rate and Cost Consequence of the Shortage of Bacillus Calmette-Guérin Connaught Strain for Bladder Cancer Patients. *Eur Urol Focus* 2019; 17:S2405-4569(19)30109-9.
- Packiam VT, Johnson SC, Steinberg GD. Non-muscle-invasive bladder cancer: Intravesical treatments beyond Bacille Calmette-Guérin. *Cancer* 2017; 123:390-400.
- Patel MR, Ellerton J, Infante JR, Agrawal M, Gordon M, Aljumaily R, et al. Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2018; 19:51-64.
- Patnaik A, Kang SP, Rasco D, Papadopoulos KP, Elassaiss-Schaap J, Beeram M, et al. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4286-93.
- Perabo FGE, Willert PL, Wirger A, Schmidt DH, Von Ruecker A, Mueller SC. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 3565-73.
- Pezzuto A, Citarella F, Croghan I, Tonini G. The effects of cigarette smoking extracts on cell cycle and tumor spread: novel evidence. *Fut Sci OA* 2019; 5:FSO394.
- Pook SH, 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* 2002; 168:780-5.
- Poon, S. L.; Huang, M. N.; Choo, Y.; McPherson JR, Yu W, Heng HL, et al. Mutation signatures implicate aristolochic acid in bladder cancer development. *Genome Med* 2015; 7:1-10.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Rev Cancer* 2008; 9:57.
- Reale A, Vitiello A, Conciatori V, Parolin C, Calistri A, Palù G. Perspectives on immunotherapy via oncolytic viruses. *Infect Agent Cancer* 2019; 14:5.
- Renema N, Navet B, Heymann MF, Lezot F, Heymann D. RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci Rep.* 2016; 36: e00366.
- Reynders K, Illidge T, Siva S, Chang JY, De Ruyscher D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat Rev* 2015; 41:503-10.

- Rink M, Crivelli JJ, Shariat SF, et al. Smoking and bladder cancer: a systematic review of risk and outcomes. *Eur Urol Focus* 2015; 1:17–27.
- Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am* 1992; 19: 435-53.
- Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015; 372:30-9.
- Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364:2517-26.
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, et al. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol* 1999; 17:968-75.
- Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, Van Der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387: 1909-20.
- Rosenquist TA., Grollman AP. Mutational signature of aristolochic acid: Clue to the recognition of a global disease. *DNA Repair* 2016; 44:.205-11.
- Rosiello G, Palumbo C, Knipper S, et al. Unmarried men have worse oncologic outcomes after radical cystectomy for nonmetastatic urothelial bladder cancer. *Urol Oncol* 2020; 38:76.e1–e9.
- Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, et al. European association of urology guidelines on upper urinary tract urothelial carcinoma: 2017 update. *Eur Urol* 2018; 73:111–122.
- Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol Spectr* 2016; 4:MCHD-0040-2016.
- Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2015; 33:1889-94.

- Schamhart DH, Boer EC, Reijke TM. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol* 2000; 37:16.
- Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2108-21.
- Schwartz RN, Stover L, Dutcher JP. Managing toxicities of high-dose interleukin-2. *Oncology* 2002; 16(11 Suppl 13):11-20.
- Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol* 2017; 18:e143-e52.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN gamma and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107–11.
- Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 312-22.
- Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Cioles B, Burgon K, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int* 2001; 88:209-16.
- Shelley MD, Wilt TJ, Barber J, Mason MD. A meta-analysis of randomised trials suggests a survival benefit for combined radiotherapy and radical cystectomy compared with radical radiotherapy for invasive bladder cancer: are these data relevant to modern practice? *Clin Oncol* 2004; 16:166-71.
- Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 2018; 362: k3529.
- Shirota Y, Shirota H, Klinman DM. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2012; 188:1592-99.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:10-29.

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:7-30.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69:7-34.
- Silva MD; Favaro WJ; Dias Q, Durán N. Caracterização dos efeitos da imunoterapia com OncoTherad no câncer de bexiga não-músculo invasivo: análise da regressão tumoral e sobrevida pós-tratamento. *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP* 2019; 27:1-1.
- Sokolova V, Epple M. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells. *Angew Chem Inter Ed* 2008; 47:1382-95.
- Steinberg G, Bahnson R, Brosman S, Middlenton R, Wajzman Z, Wehle M. Efficacy and safety of valrubicin for the treatment of *Bacillus Calmette-Guerin* refractory carcinoma in situ of the bladder. The Valrubicin Study Group. *J Urol*. 2000;163(3):761-767.
- Steinberg GD, Smith ND, Ryder K, Strangman NM, Slater SJ. Factors affecting valrubicin response in patients with *bacillus Calmette-Guérin*-refractory bladder carcinoma in situ. *Postgrad Med* 2011; 123: 28-34.
- Stern MC, Lin J, Figueroa JD, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the international consortium of bladder cancer. *Cancer Res* 2009; 69:6857–6864.
- Stopiglia RM, Matheus WE, Garcia PV, Billis A, Castilho MA; Figueiredo de Jesus VH, et al. Molecular assessment of non-muscle invasive and muscle invasive bladder tumors: Mapping of putative urothelial stem cells and toll-like receptors (TLR) signaling. *J Cancer Therapy* 2015; 6:129-40.
- Sullivan RJ, Flaherty KT. Pembrolizumab for treatment of patients with advanced or unresectable melanoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21:2892-7.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical *bacillus Calmette-Guerin* reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: A meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2002; 168:1964-70.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K. *Bacillus calmette-guerin* versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 2005;174:86-91.

- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49:466–75.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16: 3-9.
- Tarhini A. Immune-mediated adverse events associated with ipilimumab ctla-4 blockade therapy: the underlying mechanisms and clinical management. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013:857519.
- Tate Jr DJ, Patterson JR, Velasco-Gonzalez C, Carroll EN, Trinh J, Edwards D, et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 1109-20.
- Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4: 127ra137.
- Taube JM, Galon J, Sholl LM, Rodig SJ, Cottrell TR, Giraldo NA, et al. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Mod Pathol* 2018; 3: 214-34.
- US Food and Drug Administration. 2018. Acesso em: <https://www.fda.gov/media/101468/download>.
- Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360:1408-17.
- Van der Meijden APM, Sylvester RJ, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono AV. Maintenance *Bacillus Calmette-Guerin* for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: Results from a European Organization for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol* 2003; 44: 429-34.
- Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, Zlotta AR. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009; 56:430–42.
- Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Eng J Med* 2013; 369:1691-703.

- von Rundstedt FC, Lerner SP. *Bacille-Calmette-Guerin* non-responders: How to manage. *Transl Androl Urol* 2015; 4:244-53.
- Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci* 2006; 61:1027-40.
- Xu Y, Huo R, Chen X. Diabetes mellitus and the risk of bladder cancer: a PRISMA-compliant meta-analysis of cohort studies. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e8588.
- Wang C, Zhuang Y, Zhang Y, Luo Z, Gao N, Li P, et al. Toll-like receptor 3 agonist complexed with cationic liposome augments vaccine-elicited antitumor immunity by enhancing TLR3-IRF3 signaling and type I interferons in dendritic cells. *Vaccine* 2012; 30:4790-9.
- Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2018; 4:1721-8.
- Weber J. Ipilimumab: Controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58:823-30.
- Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov* 2018; 8:1069-86.
- Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:317-27.
- Weiner S, Wagner HD. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Ann Rev Mat Sci* 1998; 28:271-98.
- Wells CA, Ravasi T, Faulkner GJ, Carninci P, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Sweet M, Wainwright BJ, Hume DA. Genetic control of the innate immune response. *BMC Immunol* 2003; 4:5.
- Williams R, Gleason D, Smith AY. Pilot study of intravesical alfa-2b interferon for treatment of bladder carcinoma in situ following BCG failure [abstract]. *J Urol* 1996; 155:494.
- Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11:282-98.
- Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leun MY, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 2014; 41:830-42.

- Working Group on BCG Vaccines S, WHO. Report on BCG Vaccine Use for Protection against Mycobacterial Infections Including Tuberculosis, Leprosy, and Other Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Infections Prepared by the SAGE Working Group on BCG Vaccines and WHO Secretariat; 2017.
- Yafi FA, North S, Kassouf W. First- and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Curr Oncol* 2011; 18:e25-34.
- Yang Y, Feng R, Wang YZ, Sun HW, Zou QM, Li HB. Toll-like receptors: Triggers of regulated cell death and promising targets for cancer therapy. *Immunol Lett* 2020; 223:1-9.
- Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *N Engl J Med* 2017; 377: 2500-1.
- Yu DS, Lee CF, Chang SY. Immunotherapy for orthotopic murine bladder cancer using *bacillus Calmette-Guerin* recombinant protein Mpt-64. *J Urol* 2007; 177: 738-42.
- Zeegers MP, Tan FE, Dorant E. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*, 2000; 89: 630-39.
- Zeng B, Shi H, Liu Y. A versatile pH-responsive platform for intracellular protein delivery using calcium phosphate nanoparticles. *J Mat Chem B* 2015; 3:9115-21.
- Zhao, S.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Wang, F.; Zhang, D. Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol* 2014; 5: 352.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EFEITOS DO MODIFICADOR DE RESPOSTA BIOLÓGICA – COMPLEXO FOSFATO INORGÂNICO 1 (MRB-CFI-1), ONCOTHERAD, NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO RECIDIVADO NÃO RESPONSIVO À TERAPIA COM BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

Dr. João Carlos Cardoso Alonso (Pesquisador)
Prof. Dr. Wagner José Fávaro (Orientador)
Número do CAAE: 93619718.7.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

O câncer de bexiga urinária (CB) representa a segunda doença maligna mais comum do trato urinário, e uma das neoplasias que apresentam os maiores custos para o Sistema Único de Saúde. O tratamento primário do câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral, seguido da imunoterapia intravesical (leia-se: “dentro da bexiga urinária”) com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), para diminuição da recidiva e prevenção da progressão tumoral. Entretanto, a utilização do BCG está associada à efeitos colaterais de intensidades variadas, desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave, o que contribui para a interrupção do tratamento além de apresentar um índice de recorrência pós-tratamento de até 30%. A opção cirúrgica, cistectomia (leia-se: “retirada da bexiga urinária”) parcial ou total, está frequentemente associada às altas taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, para alguns pacientes, a cistectomia não constitui uma opção disponível devido à presença de comorbidades (leia-se: “doenças”) concomitantes. No Brasil, desde novembro de 2017 até os dias atuais, a fabricação da vacina OncoBCG para tratamento do câncer de bexiga foi suspensa pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A falta da vacina OncoBCG pode causar impacto negativo no tratamento dos pacientes com câncer de bexiga. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que previnam a progressão da doença, permitam a preservação do órgão e a qualidade de vida dos pacientes e, finalmente, que forneçam uma opção para aqueles que são inelegíveis à cistectomia. Considerando a importância do desenvolvimento de fármacos que possam ser administrados por via intravesical e que atuem como moduladores do sistema imune, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um composto sintético nanoestruturado com

propriedades antitumorais e imunológicas, denominado MRB-CFI-1 (Modificador de Resposta Biológica – Complexo Fosfato Inorgânico 1), ou OncoTherad. Os estudos pré-clínicos e clínico-veterinários do nosso grupo demonstraram que no tratamento do CBNMI induzido quimicamente induzido em roedores e espontâneo em cães, os animais tratados com OncoTherad apresentaram significativa inibição da progressão tumoral em 70% - 80% dos casos. Ainda, nossos estudos demonstraram que a imunoterapia intravesical (leia-se: “dentro da bexiga urinária”) com OncoTherad levou à ativação distinta do sistema imune inato mediada por receptores do sistema *Toll-like receptors* (TLRs) 2 e 4, resultando no aumento da via de sinalização para interferon, a qual está relacionada com a maior eficácia desse nanocomposto no tratamento do CBNMI em relação ao tratamento padrão com BCG. O presente projeto trata-se de um estudo prospectivo que objetiva caracterizar os efeitos histopatológicos e imunológicos do nanofármaco OncoTherad no tratamento de pacientes com CBNMI recidivado não responsivo à terapia com BCG, bem como verificar os mecanismos celulares desencadeados por essa terapia.

Procedimentos:

Participando do estudo você estará autorizando a coleta de material para biópsia proveniente da cirurgia de ressecção transuretral (RTU – leia-se: “procedimento de raspagem”) da bexiga urinária, além da coleta de sangue e urina para avaliações clínicas e toxicológicas decorrentes do tratamento; e cistoscopias. Estes procedimentos serão realizados no Ambulatório de Urologia do Hospital Municipal de Paulínia-SP. A realização de citologia urinária e cistoscopia ocorrerá de três em três meses no 1º ano, semestral no 2º ano e anual a partir do 3º ano (término do seguimento), com biópsias semestrais, para avaliar recorrência da doença. Você poderá ser submetido à Re-RTU ou cistoscopia ao redor de 4 semanas após a primeira intervenção, conforme os critérios já existentes. A RTU será realizada em Centro Cirúrgico, após avaliação clínica, sob bloqueio anestésico raquimedular. As biópsias necessárias para o estudo, serão realizadas no momento da RTU. Os fragmentos coletados da bexiga urinária serão fixados em formaldeído 10% e transferidos para o Serviço de Patologia do Hospital Municipal de Paulínia e, posteriormente, para o Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia da UNICAMP, onde serão reavaliados e armazenados.

As amostras de sangue e urina serão coletadas de três em três meses no 1º ano, semestral no 2º ano e anual a partir do 3º ano (término do seguimento), para as seguintes avaliações: hemograma completo; coagulograma; níveis séricos de: sódio/ potássio, glicose, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico- pirúvica (TGP), gama glutamil transpeptidase (Gama GT), uréia, creatinina; urina I; clearance de creatinina; proteínas totais na urina. Tais avaliações serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Municipal de Paulínia-SP.

A imunoterapia com OncoTherad será aplicada pelas vias intravesical (leia-se: “dentro da bexiga urinária”) e intramuscular, seguindo o regime terapêutico: uma aplicação semanal por seis semanas consecutivas de OncoTherad pelas vias intravesical (120 mg/mL – manter intravesical por 1 hora) e intramuscular (25 mg/mL). Para a terapia de manutenção será realizada uma aplicação quinzenal (intravesical e intramuscular) por 3 meses e uma aplicação mensal (intravesical e intramuscular) por mais 9 meses até completar 1 ano de tratamento. Depois, uma aplicação trimestral (intravesical e intramuscular) por mais 1 ano e, semestralmente (intravesical e intramuscular) até o terceiro ano.

Desconfortos e riscos:**1- Relacionados ao procedimento cirúrgico de Ressecção Transuretral (RTU):**

- a. Dor ou desconforto na região suprapúbica (região abaixo da cicatriz umbilical) ou perineal (região dos genitais externos) requerendo medicamentos analgésicos.
- b. Risco de lesão dos órgãos adjacentes à bexiga durante a ressecção (cirurgia).
- c. Estreitamento da uretra requerendo dilatações ou futuros procedimentos.
- d. Suspensão do ato cirúrgico por impossibilidade de realização do bloqueio anestésico raquimedular (anestesia na coluna vertebral) na eventualidade da anestesia geral estar contraindicada.
- e. Possibilidade de infecção urinária, requerendo futuro tratamento.
- f. Necessidade de transfusão de sangue durante e/ou após a operação.
- g. Necessidade de converter a cirurgia endoscópica em cirurgia aberta por dificuldades técnicas ou complicações durante o procedimento.
- h. Possibilidade de necessitar repetir o tratamento futuramente.
- i. Possibilidade de embolia pulmonar (coágulos de sangue oriundos das veias).
- j. Possibilidade de absorção do líquido de irrigação durante o procedimento cirúrgico podendo ocorrer síndrome absorptiva.
- k. Caso seja necessário a conversão para cirurgia aberta, as seguintes complicações podem ocorrer:
 - Implante de células tumorais na via de acesso cirúrgico à bexiga.
 - Possibilidade de saída de urina pela ferida operatória por algum tempo (fistula).
 - Possibilidade de formação de hérnia ou flacidez no local da cirurgia.
 - Possibilidade de infecção na incisão cirúrgica, requerendo tratamento.
 - Possibilidade de perda da função renal como sequela da cirurgia.
 - Possibilidade de sensação de dormência em torno da região operada.

2- Relacionados à Aplicação da Imunoterapia com OncoTherad Dentro da Bexiga Urinária:

Reações transitórias leves a moderadas: As reações descritas abaixo são geralmente leve a moderadas, normalmente não durando mais que 2 dias, e acredita-se que seja o resultado de uma resposta imune positiva ao OncoTherad. Efeitos colaterais locais tais como disúria, frequência urinária aumentada e cistite são comuns. Reações sistêmicas tais como febre e calafrios são infrequentes e podem ocorrer em um número pequeno de casos.

Benefícios:

Os principais benefícios esperados para a população a ser estudada serão a redução da recidiva e da progressão do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo, além da diminuição dos efeitos colaterais.

Acompanhamento e assistência:

Os participantes da pesquisa têm direito à assistência integral frente a dano comprovadamente decorrente da pesquisa, mesmo que estes sejam eventuais e não possam ser previstos.

O acompanhamento será realizado no Hospital Municipal de Paulínia-SP, seguindo o protocolo pré-estabelecido.

Qualquer intercorrência decorrente do tratamento, entrar em contato com o pesquisador Dr. João Carlos Cardoso Alonso, no celular: (011) 99975-9002, a qualquer horário (24 horas).

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. O resultado do estudo fará parte do prontuário médico.

Ressarcimento e Indenização:

Os participantes da pesquisa poderão solicitar ressarcimento de custeio para transporte e alimentação durante os retornos à instituição.

Os voluntários terão direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

As amostras serão armazenadas em biorrepositório no Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia/ Área de Anatomia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/ Instituto de Biologia/ UNICAMP. O material biológico será armazenado *in natura* ou na forma de blocos de parafina, RNA, DNA ou proteína. Parte das amostras será armazenada em equipamentos de congelação (*Freezers -80°C*) específicos e utilizados somente para este fim. Estas amostras serão utilizadas para o presente projeto específico. A utilização futura de amostra armazenada em novos projetos está condicionada a: apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/CONEP, e obrigatoriamente, ao consentimento do participante da pesquisa por meio de um TCLE específico, referente ao novo projeto de pesquisa. Do contrário, ao final do presente projeto, as amostras serão destruídas (Vide Regulamento em vigor do Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia/ Área de Anatomia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional/ Instituto de Biologia/ UNICAMP desde 03/10/2017).

Portanto, o voluntário manifesta:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa; devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; por iniciativa da instituição; e pela dissolução do Biorrepositório.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.
(pedir para o participante indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Participação Voluntária

Sua participação neste estudo é completamente voluntária e poderá desistir de seu consentimento em qualquer momento, sem que isso traga prejuízo para o senhor(a) ou prejuízo na assistência sanitária que o senhor(a) necessita. Os efeitos da desistência não se aplicam às pesquisas prévias que já foram realizadas. Decida ou não participar, isso não afetará de nenhuma maneira a assistência médica que o Hospital lhe oferece.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores **Dr. João Carlos Cardoso Alonso**, e-mail: jccalonso@hotmail.com, e **Dr. Wagner José Fávaro**, e-mail: wjfavaro@gmail.com

Qualquer intercorrência decorrente do tratamento, entrar em contato com o pesquisador **Dr. João Carlos Cardoso Alonso**, no celular: **(011) 99975-9002**, a qualquer horário (24 horas).

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante:

Contato telefônico:

e-mail (opcional):

 Data: ____/____/____.
 (Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____ / ____ / ____.

(Assinatura do pesquisador)

ANEXO 2 – Parecer CEP UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA IMUNOTERAPIA INTRAVESICAL COM ONCOTHERAD NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO RECIDIVADO NÃO RESPONSIVO À TERAPIA COM BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG)

Pesquisador: Wagner José Fávoro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93619718.7.0000.5404

Instituição Proponente: Instituto de Biologia - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.820.147

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO:

1.1- Câncer de Bexiga Urinária (CB) O Câncer de Bexiga (CB) é o segundo tipo de câncer mais comum do trato urinário em homens, sendo superado pelo câncer de próstata, e o segundo mais comum do trato urinário em mulheres ficando atrás do câncer de rim e da pelve renal (American Cancer Society, 2018). A Sociedade Americana para o Câncer estimou para 2018 cerca de 81.190 novos casos de CB nos Estados Unidos, sendo 62.380 em homens e 18.810 em mulheres. A estimativa também previu 16.390 mortes por CB, sendo 12.520 homens e 4.720 mulheres (American Cancer Society, 2018). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018) a estimativa para o Brasil no biênio de 2018 a 2019 será de 9.480 novos casos de CB por ano, sendo 6.690 homens e 2.790 mulheres. Em 2015 foram notificadas 3.903 mortes por CB, sendo 2.663 homens e 1.240 mulheres, o que demonstra o drástico aumento na prevalência desse tipo de tumor (INCA, 2018). Mais de 70% da incidência do CB é superficial (pTis, pTa e pT1), câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI), e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional (Askeland et al., 2012). Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo (Askeland et al., 2012). O CB acomete preferencialmente indivíduos adultos e idosos, na proporção de 3:1 para homens e mulheres,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.820.147

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura.pdf	06/08/2018 12:06:14	Wagner José Fávaro	Aceito
Outros	Vinculo.pdf	10/07/2018 16:32:08	Wagner José Fávaro	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/07/2018 08:55:08	Wagner José Fávaro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Urologia.pdf	07/07/2018 08:23:08	Wagner José Fávaro	Aceito
Outros	OncoTherad.pdf	07/07/2018 08:14:30	Wagner José Fávaro	Aceito
Outros	Anvisa.pdf	07/07/2018 08:03:54	Wagner José Fávaro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HMP.pdf	07/07/2018 08:02:11	Wagner José Fávaro	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	07/07/2018 08:00:42	Wagner José Fávaro	Aceito
Folha de Rosto	Rosto.pdf	07/07/2018 07:59:40	Wagner José Fávaro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 14 de Agosto de 2018

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 3 – Registro Brasileiro de Ensaio Clínico

The screenshot shows the top section of the website. On the left, there is a logo for 'Saúde Ministério da Saúde' and the main title 'REGISTRO BRASILEIRO DE Ensaios Clínicos'. On the right, there is a login form with fields for 'USUÁRIO' and 'SENHA', an 'ENTRAR' button, and links for 'Esqueceu a senha?' and 'Registrar-se'. Below the login form are links for 'PT | ES | EN'. A navigation bar contains 'NOTÍCIAS | SOBRE | AJUDA | CONTATO' and a search bar with a 'Buscar ensaios' button and a link for 'BUSCA AVANÇADA'. At the bottom of the header, there is a breadcrumb trail: 'HOME / ENSAIOS REGISTRADOS /'.

RBR-6swqd2

Efeitos da Imunoterapia Intravesical com Oncotherad no tratamento de pacientes com Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo Recidivado Não-Responsivo à terapia com Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

Data de registro: 16 de Jan. de 2019 às 21:25

Last Update: 20 de Ago. de 2019 às 13:36

Tipo do estudo:

Intervenções

Título científico:

PT-BR
Efeitos da Imunoterapia Intravesical com Oncotherad no tratamento de pacientes com Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo Recidivado Não-Responsivo à terapia com Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

EN
Effects of Oncotherad Intravesical Immunotherapy in the treatment of Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Refractory and Relapsed Non-Muscle Invasive Bladder Cancer patients

Identificação do ensaio

Número do UTN: U1111-1226-9096

Título público:

PT-BR
Efeitos da Imunoterapia com Oncotherad no Tratamento de pacientes com Câncer de Bexiga Não-Músculo Invasivo Recorrente Não-Responsivo à Terapia com Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

EN
Effects of Oncotherad Immunotherapy in the Treatment of Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Recurrent and Relapsed Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

Acrônimo científico:

Acrônimo público:

Identificadores secundários:

No. 2.820.147

Órgão emissor: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas

No. 93619718.7.0000.5404 - CAAE

Órgão emissor: Plataforma Brasil

ANEXO 4 – Critério para Efeitos Adversos NCI

Fonte: 4th Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) do National Cancer Institute (NCI)

	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Anemia	VN a 10 g/dL	10 a 8 g/dL	< 8 g/dL	Ameaçador a vida	Óbito
Fadiga	Melhora com repouso	Limita atividades diárias	Limita autos cuidados	-	-
Neutropenia	VN a 1500/mm ³	1500 a 1000/mm ³	1000 a 500/mm ³	< 500/mm ³	-
Plaquetopenia	VN a 75.000/mm ³	75.000 a 50.000/mm ³	50.000 a 25.000/mm ³	< 25.000/mm ³	-
Nauseas	Perda do apetite, sem perda do hábito alimentar	Redução da ingestão, sem perda de peso ou desidratação	Redução da Ingestão	-	-
Vômitos	1 a 2 episódios (separados por 5 min) em 24hrs	3 a 5 episódios (separados por 5 min) em 24hrs	>=6 episódios (separados por 5 min) em 24hrs	Ameaçador a vida	Óbito
Extravasamento de Quimioterápico	-	Eritema com sintomas (edema, dor, endurecimento)	Ulceração ou Necrose	Ameaçador a vida	Óbito
Diarréia	Aumento de até 4 evacuações do hábito normal	Aumento de 4 a 6 evacuações do hábito normal	Aumento >=7 evacuações do hábito normal; OU incontinência	Ameaçador a vida	Óbito
Diarréia (ostomia)	Leve aumento	Moderado aumento	Aumento importante	Ameaçador a vida	Óbito
Mucosite Oral	Assintomático ou leve	Dor moderada, sem interferir com alimentação	Dor importante que interfere na alimentação	Ameaçador a vida	Óbito
Mialgia	Leve	Dor moderada, interfere em atividades diárias	Dor intensa, interfere em autos cuidados	-	-
Neuropatia Motora Periférica	Assintomático ou leve	Limitante nas atividades diárias	Limitante em autos cuidados	Ameaçador a vida	Óbito
Neuropatia Sensitiva Periférica	Perda de reflexo de tendões profundos OU parestesia	Limitante nas atividades diárias	Limitante em autos cuidados	Ameaçador a vida	Óbito
Alopécia	Perda de < 50% cabelos	Perda > 50% dos cabelos	-	-	-
Síndrome Mão Pé (Eritrodisestesia Palmo Plantar)	Alteração mínima da pele (eritema, edema, hiperqueratose)	Alteração da pele com dor ou limitante nas atividades diárias	Alterações graves (sangramento, descamação) com dor e limitantes nos autos cuidados	-	-
Insuficiência Renal Aguda	Aumento de creatinina > 0,3 mg/dl; 1,5 a 2,0x o baseline	Creatinina 2 a 3 x o baseline	Creatinina > 3x baseline ou creatinina > 4,0 mg/dl	Ameaçador a vida	Óbito

VN: Valor Normal

Atividades Diárias: preparar refeições, compras de roupas ou alimentos, usar telefone, manusear dinheiro.

Autos Cuidados: banhar, vestir e despir, ir ao banheiro, tomar remédios.

ANEXO 5 – Financiamento FAPESP



Para uso exclusivo da FAPESP	
Processo: 2020/03419-6	
Data impressão:	31/07/2020 11:38:22
Folha:	_____
Volume:	_____
Rubrica:	_____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2020/03419-6

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1.OUTORGADO:	Wagner José Fávaro CPF: 286.246.388-44 RG: 334787774-SSP/SP
2.Correspondência:	A/C Wagner José Fávaro, Avenida Bertrand Russell, s/no. Depto. de Biologia Estrutural e Funcional - Bloco A (Anatomia), Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas/SP, CEP 13083-865 wjfavaro@gmail.com
3.Instituição Sede:	Instituto de Biologia/IB Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP
4.Projeto de Pesquisa:	EFEITOS TERAPÊUTICOS E TOXICOLÓGICOS DA IMUNOTERAPIA COM ONCOTHERAD (MRB-CFI-1) EM PACIENTES COM CÂNCER DE BEXIGA NÃO-MÚSCULO INVASIVO RECIDIVADO NÃO RESPONSIVO À TERAPIA COM BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN (BCG)
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Morfologia Anatomia
7.Coordenação:	Saúde IV