



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ISIS GALLANI AVANSINI KIEHL

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA DE RATOS
UTILIZANDO BACILO CALMETTE-GUERIN, NITAZOXANIDE E ASSOCIAÇÃO VIA
INTRAVESICAL

EVALUATION OF URINARY BLADDER CANCER TREATMENT OF RATS USING
INTRAVESICAL BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN, NITAZOXANIDE AND ASSOCIATION.

CAMPINAS

2020

ISIS GALLANI AVANSINI KIEHL

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO DO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA DE RATOS
UTILIZANDO BACILO CALMETTE-GUERIN, NITAZOXANIDE E ASSOCIAÇÃO VIA ORAL
E INTRAVESICAL

EVALUATION OF URINARY BLADDER CANCER TREATMENT OF RATS USING
INTRAVESICAL BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN, ORAL NITAZOXANIDE AND
ASSOCIATION.

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

Thesis presented to Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

Orientador: PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ISIS GALLANI AVANSINI KIEHL, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. LEONARDO
OLIVEIRA REIS

CAMPINAS

2020

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

K543a Kiehl, Isis Gallani Avansini, 1990-
Avaliação do tratamento do câncer de bexiga urinária de ratos utilizando bacilo Calmette-Guerin, Nitazoxanide e associação via intravesical / Isis Gallani Avansini Kiehl. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Leonardo Oliveira Reis.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da Bexiga. 2. Bacillus Calmette-Guérin. 3. Nitazoxanide. I. Reis, Leonardo Oliveira, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of urinary bladder cancer treatment of rats using intravesical bacillus Calmette-Guérin, Nitazoxanide and association

Palavras-chave em inglês:

Bladder neoplasms
Calmette-Guerin Bacillus
Nitazoxanide

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Leonardo Oliveira Reis [Orientador]
Rodolfo Borges dos Reis
Cristiane Tambascia Pereira

Data de defesa: 22-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1526-299X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3072312418609714>

COMISSÃO EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO

ISIS GALLANI AVANSINI KIEHL

ORIENTADOR: DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS

Membros

- 1. PROF. DR. LEONARDO OLIVEIRA REIS**
 - 2. PROF. DR. RODOLFO BORGES DOS REIS**
 - 3. PROF. DRA. CRISTIANE TAMBASCIA PEREIRA**
-

Programa de Pós- Graduação em Fisiopatologia Médica 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: 22/01/2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis, pela oportunidade, atenção e conhecimentos passados.

Aos professores envolvidos neste projeto, Prof. Mario José Abdalla Saad, Prof. José Barreto Campello Carvalheira

A todos os pesquisadores que me ajudaram e tornaram esse projeto possível, Heloisa Balan Assalin, Sandra Branbilla, Dioze Guadagnini, Guilherme Zweig Rocha, Karen Linares Ferrari, Gabriela Passos.

Aos funcionários do Núcleo de Cirurgia Experimental: William Adalberto Silva, Miguel Luís Candido e Valdemir Benedito Costa pela ajuda e experiências passadas na fase de manejo com os animais.

À secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo apoio durante esse período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Ao meu pai, Hermes Kiehl, modelo moral, de superação e força interior, minha mãe Rosemari Gallani Avansini fonte inesgotável de alegria e força de vontade, e meu companheiro, Douglas Fugita catalizador de uma versão melhor de mim a cada dia que passamos juntos.

RESUMO

O tratamento do Câncer de Bexiga (CB) com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) tem efeito comprovado na redução de recidiva e progressão tumoral, superior ao tratamento isolado pós ressecção, ou quimioterapia desde a década de 80 (ALEXANDROFF et al., 1999). Ainda que seja uma ótima opção de terapia, novas estratégias para atingir o melhor potencial contra o câncer de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) precisam ser exploradas. Nitazoxanide (NTZ) mostrou promissores resultados com efeito antitumoral utilizado isoladamente e em combinação com outros imunoterápicos. Baseado neste conceito, o presente estudo caracterizou e comparou efeitos antineoplásicos do NTZ e BCG em Câncer de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) em modelo animal. Um total de 30 ratos da linhagem Fisher 344 foi utilizado. Para a indução do CB, os animais foram anestesiados e induzidos quimicamente, dose intravesical de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) a cada 15 dias, totalizando 4 doses. Os animais foram então divididos em 3 grupos de tratamento via vesical por 5 semanas consecutivas: Grupo BCG (10^6 UFC – 1 mg de BCG); Grupo NTZ (300mg/kg- 45mg de NTZ); Grupo BCG+NTZ: tratamento simultâneo de BCG (10^6 UFC – 1 mg) e NTZ (300mg/kg- 45mg); Após 16 semanas do início do experimento, os animais foram eutanasiados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas, Imunohistoquímica e Western Blotting. Histopatologia mostrou 66,67% de incidência de CB em animais tratados com BCG; 62,50% em animais tratados com NTZ e 37,5% em animais tratados com NTZ+BCG. Western Blotting aponta para possível ação sinérgica entre NTZ e BCG, podendo estar relacionado com inibição de mTor, PI3k e 4E-BP, ao qual sugere intensa inibição de cMyc. Esse estudo é o primeiro a correlacionar NTZ, uma promissora droga, de fácil acesso, com efeito imunogênico para com lesões neoplásicas, e BCG como associação de imunoterapia, para tratamento de CB.

Palavras-chave: **Câncer de bexiga urinária, Bacilo Calmette-Guerin e Nitazoxanida.**

ABSTRACT

ABSTRACT:

PURPOSE: Nitazoxanide (NTZ) has shown promising antitumoral effect, current study compared the anti-neoplastic effects of intravesical NTZ and BCG plus NTZ in NMIBC animal model.

METHODS: 30 rats, Fisher 344 were instilled with 4 intravesical dose of 1.5 mg/kg of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) every 15 days for BC induction. The animals were divided in 3 groups (Group BCG 10^6 UFC – 1 mg of BCG; Group NTZ – 300 mg/kg of NTZ; Group NTZ+BCG – simultaneous treatment of BCG and NTZ) and received weekly intravesical treatment for 6 consecutive weeks. Animals were submitted to ultrasound imaging and euthanasia, their bladders were collected and histopathological, immunohistochemical tests (ki67 e cMyc) and Western Blotting (PI3K, mTOR and p-4E-BP) were performed.

RESULTS: Histopathological tests show 66.67% incidence of BC in animals treated with BCG; 62.5% incidence in animals treated with NTZ e 37.5% incidence in animals treated with NTZ+BCG. BC Positive animals presented 12.4% (IC 10.1-14.6%) nuclear area positivity for ki-67 in BCG group, followed by 13.2% (IC 10.5-15.9%) in NTZ group, and 8.8% (IC 6.0-11.6%) in NTZ+BCG group. BC positive animals presented higher percentage of high positive ki-67 marked when treated with NTZ alone (40.10%) and smaller percentage when treated with NTZ+BCG (19.9%). Blotting has shown mTOR and PI3K inhibition in the presence of BCG added to cMyc and 4-EBP inhibition in the presence of NTZ.

CONCLUSIONS: Results show possible synergy between the BCG gold standard treatment and NTZ for BC, in which cMyc and downstream mTOR, PI3K and p-4E-BP inhibition might play a role.

Key Words: **Bladder Cancer, Bacillus Calmette-Guerin and Nitazoxanide.**

LISTA DE ABREVIações

AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína adenosina-monofosfato-quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina
CB	Carcinoma de bexiga
CBNMI	Câncer de bexiga Não Musculo Invasivo
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
DAB	Solução cromógena de tetracloreto de diaminobenzidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FAP	Proteína de adesão à fibronectina
FDA	Food and Drug Administration
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FKBP12	FK506 ligante 12
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN	Interferon
IGF-1	GMCSF Fator estimulante de colônias de macrófagos
IL	Interleucina
Min	Minutos
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MNU	N-metil-N-Nitrosouréia
NaCl	Cloreto de Sódio
NK	Células natural killers
p70S6K1	Quinase 1 de proteína S6 ribossômica 70-kDa
pT1	Invasão da lâmina própria
pT2	Invasão da camada muscular própria
pTa	Confinado ao urotélio
pTis	Carcinoma in situ
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
Ph	Concentração de hidrogênio iônico
Rapa	Rapamicina

Raptor	Proteína da mTOR associada ao domínio regulatório
TNF- α	Fator de necrose tumoral
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
4E-BP1	Fator de iniciação eucariótico 4E ligante de proteína 1
%	Porcentagem
>	Maior
TM	Trademark
®	Registered Trademark
kDa	Quilodalton
mg	Miligrama
kg	Quilograma
mL	Mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônia
μ g	Micrograma
h	Horas
μ m	Micrômetro
x	Vezes
L	Litro
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
W	Voltz
<	Menor

ÍNDICE

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIACÕES	8
ÍNDICE	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 – CARCINOMA DE BEXIGA URINÁRIA	11
1.2 – VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR: PI3K, P-4E-BP1.....	12
1.3 – CMYC E ONCOGÊNESE.....	12
1.4 – IMUNOTERAPIAS NO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.2 ULTRASSONOGRRAFIA.....	19
4.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.	20
4.4 IMUNOHISTOQUIMICA (CMYC E GSTP1)	20
4.4.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE CMYC	21
4.4.2 IMUNOHISTOQUIMICA (KI-67).....	21
4.5 WESTERN BLOTTING.....	21
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO.....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
9. ANEXOS	51
9.1 CERTIFICADO CEUA.....	51
9.2 IMUNOHISTOQUIMICA- IMAGENS REPRESENTATIVAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
9.3 WESTERN BLOTTING- MTOR- FOTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
9.4. WESTERN BLOTTING- PI3K- FOTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
9.5. WESTERN BLOTTING - P-4E-BP- FOTOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 – CARCINOMA DE BEXIGA URINÁRIA

O segundo achado maligno mais comum do trato urinário é o carcinoma de bexiga urinária (CB) (REIS et al., 2009). Entre suas classificações, a incidência de CB papilífero é de cerca de 70% dos casos, sendo a ocorrência de doença invasiva menos frequente (OYASU, 1995; REIS et al., 2009). Há diversos fatores ambientais relacionados à ocorrência de CB, como por exemplo contato com agentes carcinógenos químicos. O tabagismo, dentre estes agentes carcinógenos conhecidos, está presente em cerca de um terço dos casos de CB (ZEEGERS et al., 2000).

A relevância clínica dos achados derivados de modelos *in vitro* para estudo de CB necessita de confirmação em modelos *in vivo* (BÖHLE; BRANDAU, 2003a; CRALLAN; GEORGOPOULOS; SOUTHGATE, 2006). Há modelos de pesquisa com desenvolvimento de neoplasia *in vivo* em animais muito semelhantes ao CB encontrado em pacientes humanos (REIS et al., 2009). Roedores além de apresentar estrutura semelhante ao de seres humanos, também desenvolvem CB em modelos de estudo de perfil de expressão gênica similares ao humano, de forma que este é um ambiente muito favorável para estudo desta doença (WILLIAMS; LEE; THEODORESCU, 2008).

Um carcinógeno usado para indução tumoral experimental já conhecido é o N-metil-N-nitrosouréia (MNU), tendo sua eficácia comprovada em 1972 (HICKS; WAKEFIELD, 1972), causando lesão citotóxica em urotélio e consequente resposta inflamatória, rápida proliferação, acúmulo e perpetuação de mutações. A indução tumoral em urotélio de roedores se dá por uma série de alterações morfológicas, tendo como início hiperplasia simples, seguida de hiperplasia nodular e papilar, podendo progredir para papiloma, carcinoma não invasivos e finalmente, a neoplasias invasivas (OYASU, 1995; COHEN, 2002).

Este processo de indução tumoral pode ocorrer no período de algumas semanas de aplicação (REIS et al., 2009), instilando-se diariamente via intravesical o agente carcinógeno de escolha (STEINBERG et al., 1990; CRALLAN; GEORGOPOULOS; SOUTHGATE, 2006). STEINBERG et al., 1990 determinaram utilização de 4 doses de (MNU), capaz de causar indução rápida de CB. Agindo como iniciador e promotor da neoplasia, este carcinógeno, um composto genotóxico, causa persistente metilação do DNA (KUNZE et al., 1989). Outra particularidade do MNU é que este pode agir sobre o urotélio diretamente, portanto sem depender de ativação metabólica (KUNZE et al., 1989;) (STEINBERG et al., 1990). Este modelo de indução tumoral com uso de MNU intravesical vem sendo aprimorado, e hoje é capaz de produzir tumores de bexiga de origem exclusivamente urotelial muito próximos dos observados na casuística humana. Em comparação com modelos de estudo de carcinogênese implantados, vale ressaltar a importância do modelo autóctone de aspecto

histológico equivalente ao carcinoma de células transicionais (PERABO et al., 2005; REIS et al., 2010a).

1.2 – VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR: PI3K, P-4E-BP1.

A sinalização da via PI3K/ AKT/mTOR está fortemente associada à proliferação desenfreada e sobrevivência de células tumorais. (GAO et al., 2003; MAKHLIN et al., 2011; SAMANT; SHEVDE, 2011; LAPLANTE; SABATINI, 2012). A via de mTOR envolve um complexo proteico que pertence a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) – relacionada à família quinase que se relaciona com uma série de proteínas formando complexos distintos: mTORC1 e 2 (LAPLANTE; SABATINI, 2012).

Tendo em vista avaliar a inibição *usptream* da via mTOR e quais substratos seriam mais importantes seriam PI3K (para avaliação da ativação inicial de cascata e conhecidos e possíveis *feedbacks*) e 4EBP1. O controle de proteínas, iniciação de tradução tem importante relação com estes dois substratos (NAWROTH et al., 2011). A avaliação da atividade da via 4EBP1 é também importante devido à confluência com a via cMyc (POURDEHNAD et al., 2013). A progressão do ciclo celular após fase G1 é permitido uma vez que há a fosforilação de 4E-BP(NAWROTH et al., 2011)0.

1.3 – CMYC E ONCOGÊNESE

cMyc é um proto-oncogene com expressão aumentada em células em fases de proliferação celular, comuns em tecido embrionário e tecido neoplásico, por exemplo. Sua expressão é reduzida em fases de diferenciação celular, e há superexpressão sob estimulação mitótica. Não conflitante, sua expressão está presente em neoplasias de bexiga, assim como em outras neoplasias de origem epitelial(SCHMITZ-DRÄGER et al., 1997; CHRISTOPH et al., 1999; SCHULTZ et al., 2010a; FAN-MINOQUE et al., 2013; KLUK et al., 2016).

Há indícios de ligação entre a via mTOR e ativação de cMyc: a fosforilação(ativação) de 4E-BP1 é necessária para sobrevivência e iniciação de células tumorais hematológicas dependentes de cMyc (POURDEHNAD et al., 2013). Ainda não há estudos que relacionam estes achados em neoplasias de origem urotelial. NTZ está entre os poucos mais potentes compostos capazes de atividade anti cMyc administrado via oral (FAN-MINOQUE et al., 2013). O uso tópico/ intravesical de NTZ, e seu metabólito hidrolisado, Tiazoxanida, ainda não foi testado, e esta potente inibição de cMyc ainda precisa ser validada neste ambiente. Nesse contexto seria de grande interesse observar potencial sinérgico entre o NTZ para inibição de cMyc em conjunto com o tratamento de BCG.

1.4 – IMUNOTERAPIAS NO CÂNCER DE BEXIGA URINÁRIA

A maioria (cerca de 70%) dos CB não invadem a túnica muscular da bexiga, porém podem apresentar progressão em 20-30% dos casos, e recorrência de 70% em casos tratados exclusivamente com ressecção transuretral (RTU). Esta recorrência pode reduzir de 70% para 31% com o uso de instilação de BCG intravesical.

O sucesso no tratamento de bacilo Calmette-Guerin (BCG) para câncer vesical superficial foi comprovado em 1976 por Morales e colaboradores. O tratamento com BCG é na atualidade, e desde essa época, a conduta padrão ouro para tratamento de CB superficial de alto risco. Ainda que permaneça relevante por muito tempo, esta conduta é a que apresenta melhores resultados em reduzir recorrência e progressão tumoral, considerada superior à quimioterapia intravesical (BÖHLE; BRANDAU, 2003a). O BCG causa indução de expressão de citocinas (podendo estar presentes tanto na urina quanto na bexiga), e influxo de células inflamatórias na parede vesical, gerados por intensa resposta imune.

O uso de BCG pode vir acompanhado de efeitos colaterais, uma vez que podem ocorrer: de sintomas irritativos leves, à complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas, associadas principalmente ao uso de organismos vivos e atenuados (BÖHLE; BRANDAU, 2003 ; WALSH et al., 2007).

O BCG tem se mostrado eficaz na redução da recorrência da doença, mas não há eficácia comprovada na prevenção a progressão de forma precisa. Alguns pacientes também são refratários ao tratamento com BCG e podem sofrer rápida recorrência do tumor com alto risco de desenvolver câncer de bexiga musculo-invasivo (SEAGER et al., 2009).

Di Santo; Ehrisman, 2014, já discutiram a possibilidade de uso de NTZ como potencial tratamento de câncer ovariano. A possibilidade de sinergia entre imunoterápicos e suposto agonismo com BCG geram interesse de estudo de fármacos com efeito imunomodulador. Inicialmente o NTZ foi exaltado pela sua eficiência cestodicida, mas já há relatos na literatura sobre suas propriedades imunomoduladoras. Este composto é descrito na literatura por seu promissor potencial de ação anti-tumoral (SHI et al., 2014).

O NTZ é possui dois sítios ativos, com funções distintas. O sítio nitrila teria atuação contra parasitas extracelulares, podendo ser convertido em compostos livres de oxigênio e induzir apoptose (HEMPHILL; MUELLER; ESPOSITO, 2006), também atuando na inibição da enzima piruvato-ferrooxidina oxirredutase na ação contra bactérias anaeróbicas (SISSON et al., 2002).

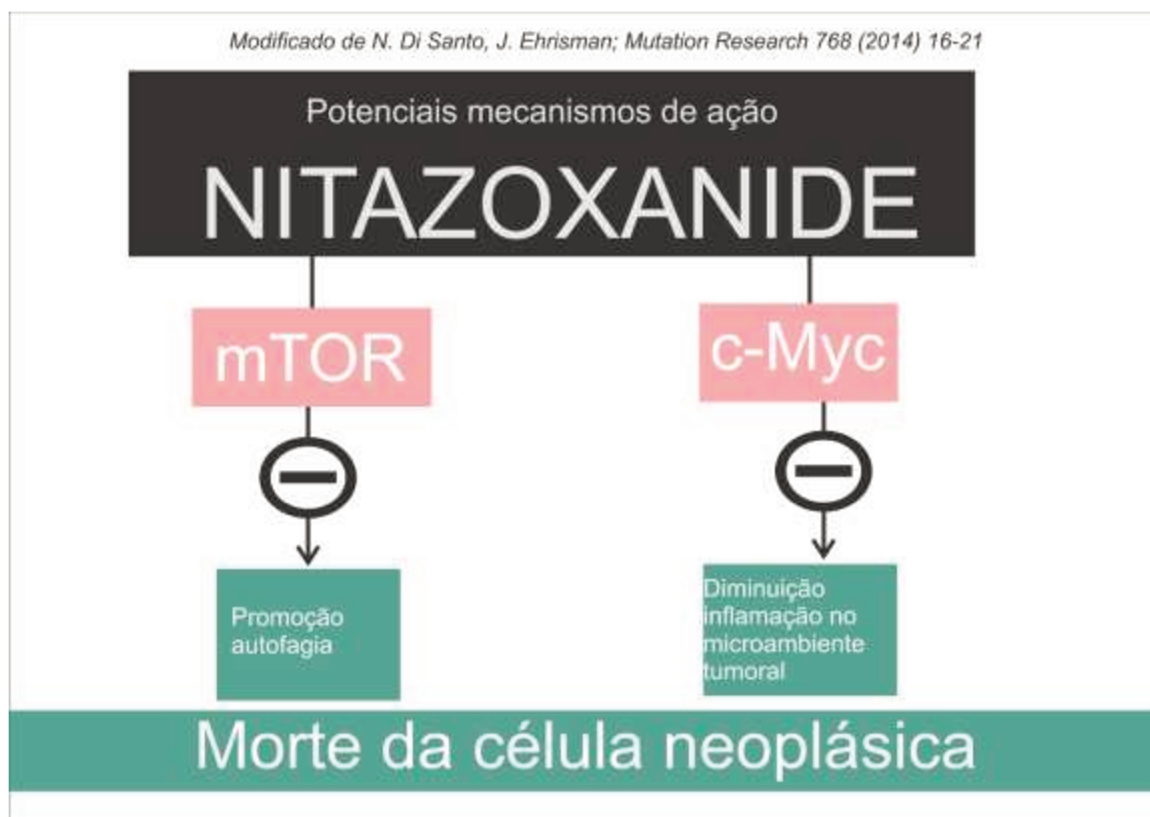


Figura 1- Ilustração dos mecanismos de ação do Nitazoxanide com potencial ação imunomoduladora. Esquema Adaptado de N. Di Santo, J. Ehrisman; *Mutation Research* 768 (2014) 16-21 Ilustrando.

Acredita-se que um dos mecanismos que proporciona imunomodulação indireta é a inibição da via mTOR, cascata responsável pela regulação de crescimento celular e autofagia, sensível à fatores de crescimento (insulina, IGF-1), várias citocinas, sinais co-estimuladores, *Toll-like receptor* (TLR), quantidade de energia no citoambiente, hipóxia, presença de aminoácidos e dano ao DNA (TARANTINO et al., 2016). Tal bloqueio proporciona aumento da autofagia, e redução do crescimento celular, efeito o qual tem se mostrado extremamente eficiente em tratamentos de tumores de células epiteliais, como tumor de ovário (DI SANTO; EHRISMAN, 2013). Igualmente a rapamicina, o NTZ inibe a sinalização *upstream* mTORC1, mas não tem ação sob a via mTORC2. Diferentemente da Rapamicina, que inibe irreversivelmente a via mTOR, o NTZ inibe fortemente a via mTOR após 4h de exposição *in vitro*, mas após a retirada da droga sua ação regride lentamente até se equiparar a valores encontrados para células não tratadas por NTZ.

A Inibição da via cMyc – uma família de fatores de transcrição moduladores de múltiplos genes de proliferação e crescimento celular (COLLER et al., 2000; MENSSEN; HERMEKING, 2002) muito comumente hiper-expressa em neoplasias como carcinoma urotelial (ONODERA; HASHIMOTO; YAGIHASHI, 1997; SCHMITZ-DRÄGER et al., 1997; CHRISTOPH et al., 1999; ZAHARIEVA et al., 2005; HANSEL et al., 2008; MASSARI et al., 2015) por NTZ já foi observada em culturas de células para câncer colorretal, e acredita-se que esteja associada à inibição indireta de múltiplas vias *usptream*, como GSTP1/MAPK8 e mTOR. Nesta última, acredita-se que cMyc e mTOR convirjam diretamente na fosforilação do

composto 4E-BP, o que ativa fatores de transcrição nuclear cap-independentes como eIF4E (POURDEHNAD et al., 2013). Não há estudos sobre a inibição de cMyc especificamente em carcinomas uroteliais.

A NTZ é facilmente absorvida via oral. Após ingestão é hidrolisada, e transforma-se no seu metabólito ativo denominado *diacetil-nitazoxanida*, ou Tiazoxanida. A Tiazoxanida é conjugada no plasma e atinge seu pico neste ambiente em um período de cerca de 1- 4 horas. Sua excreção se dá por fezes, bile e urina.

Estudos *invitro* demonstram a eficácia do NTZ em redução da carcinogênese (LAM et al., 2012), evidenciando a independência de metabolização e exigência de administração oral para que ocorra hidrólise e sua forma ativa se torne presente. Portanto levantou-se neste trabalho ainda a possibilidade de administração via intravesical associado ao BCG, potencializando ação entre os imunoterápicos e reduzindo ainda mais o risco de toxicidade e reações adversas.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo justifica-se frente a existência de indícios literários sobre o potencial antitumoral de NTZ (DI SANTO; EHRISMAN, 2014) especialmente dos mecanismos de o bloqueio da via mTOR, cMyc, e a possibilidade de agonismo entre o Bacilo Calmette-Guérin (BCG) - tratamento padrão ouro para carcinoma urotelial - e a Nitazoxamida. No entanto, nenhum material sobre estudos do efeito de NTZ no tratamento de carcinomas urotelial foi encontrado e os estudos se concentram *in vitro*.

Adicionalmente, há a necessidade de aprimoramento no tratamento desta malignidade, especialmente em casos refratários ao BCG, além da possibilidade de administração tópica (intravesical) do princípio ativo, que é também altamente atrativa, por possuir grande potencial translacional no futuro desenvolvimento de Nitazoxanida como compostos anticâncer, com toxicidade limitada ao local da lesão neoplásica, menores efeitos colaterais e melhor qualidade de vida para o paciente.

3. OBJETIVOS

Avaliar em modelo imunocompetente o impacto de NTZ intravesical isolada e em associação ao BCG, comparada com o tratamento padrão ouro por comparação de:

- a) Presença de lesões benignas, pré-neoplásicas e neoplásicas, avaliadas por análise histológica comparativamente entre os grupos de estudo;
- b) Proliferação celular por imunohistoquímica, utilizando marcação de Ki67 comparativamente entre os grupos de estudo;
- c) Nível de ativação da via mTOR, quantificando via Western Blotting a ativação de mTOR, p-4EBP e PI3K comparativamente entre os grupos de estudo;
- d) Nível de ativação de cMyc utilizando imunohistoquímica comparativamente entre os grupos de estudo;

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.

Foram utilizados 30 ratos isogênicos, fêmeas, da linhagem Fisher 344, com cerca de 7 semanas de idade, pesando em média 120 gramas, obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP- em anexo). O protocolo experimental seguiu os princípios éticos em pesquisa animal conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal local (CEUA/ UNICAMP).

Seguindo protocolo de indução de CB já padronizado por REIS e colaboradores (2009), a indução ocorreu por *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU) administrado por via intravesical. Para a indução os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*), mantidos nesse estado por 45 minutos. Para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5 mg/kg de *N-metil-N-nitrosouréia* (MNU - *Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em 0,2 mL de solução fisiológica a cada 15 dias (semana 0, 2, 4, 6), totalizando 4 doses (REIS et al., 2012).

- a) **Grupo BCG (Bacilo Calmette-Guerin):** após indução, cada animal recebeu uma dose intravesical de 10^6 UFC – 1 mg de BCG (*Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil*) diluída em 0,2 mL de solução fisiológica por 6 semanas consecutivas (REIS et al., 2012);
- b) **Grupo NTZ intravesical (Nitazoxanida):** após indução, cada animal recebeu uma dose intravesical de 300mg/Kg, ou seja, 45 mg de NTZ (MURPHY; FRIEDMANN, 1985) diluída em 0,2ml de solução fisiológica na mesma frequência do “Grupo BCG”.
- c) **Grupo BCG-NTZ intravesical (Bacilo Calmette-Guerin e Nitazoxanida):** após indução, cada animal recebeu uma dose intravesical de 10^6 UFC – 1 mg de BCG (*Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brasil*) e 300mg/Kg (LIU et al., 2015), ou seja, 45 mg de NTZ diluída em 0,2 ml de solução fisiológica por 6 semanas consecutivas (REIS et al., 2012);

Após 16 semanas de tratamento os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico utilizando (1mg/Kg) Cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstrictor intraperitoneal 10 minutos antes de Tiopental sódico (90mg/kg) dose única intraperitoneal. As bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas e Western Blotting. Durante a coleta foi observado lesões evidentes macroscopicamente, e levando em consideração simetria a bexiga foi dividida em duas partes mais próximas da igualdade possível. Uma metade foi reservada em formol, e a outra congelada em nitroglicerina líquida.

4.2 ULTRASSONOGRAFIA

No momento da eutanásia, os animais foram submetidos à avaliação sonográfica do aparelho gênito-urinário. Os animais já sedados foram então preparados para a ultrassonografia, posicionando-os em decúbito dorsal, e então tricotomizado em toda a área de abdômen ventral.

Para a avaliação sonográfica foi utilizado aparelho de ultrassom Mindray® Z5 uso veterinário, transdutor linear de 10mHz, e aparelho de ultrassom General Electric®, modelo Logiq E, transdutor linear de 12mHz. Com uso de gel condutor o transdutor linear foi posicionado em região hipogástrica sagital em posição longitudinal e então realizado movimento de varredura latero-lateral identificando a vesícula urinária, tal manobra é necessária pois a bexiga em repleção satisfatória para o exame pode se deslocar lateralmente, inclusive durante a varredura. Após avaliação longitudinal, o transdutor foi posicionado transversalmente e é feita a varredura crânio caudal da bexiga.

Para avaliação dinâmica de ejeção de fluido na bexiga o transdutor é posicionado longitudinalmente, como descrito anteriormente, e é possível identificar o aumento da silhueta do órgão, bem como presença de movimentação de sedimentos em seu interior. Interpretação sonográfica foi graduada em “**Normal**” (sem alterações, apresentando espessamento de parede, cristais, celularidade ou urólitos); “**+**” (lesão única de menos de 0,30cm de diâmetro, presença de perda de estratificação da parede vesical), “**++**” (lesão de tamanho moderado, mais de 0,40cm de diâmetro, ou múltiplas lesões, com presença de perda de estratificação da parede vesical) e “**+++**” (lesões diversas, difuso espessamento de parede com perda de estratificação intenso de parede vesical).

4.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.

As metades das bexigas dos animais coletadas ficaram fixadas em paraformaldeído por 48h em temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas e inclusos em cassetes com parafina, previamente identificados.

Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha) com espessura de 5µm e corados em Hematoxilina-Eosina no seguinte procedimento: as lâminas contendo cortes de 5µm dos blocos de parafina serão desparafinizadas em estufa e reidratadas na seguinte bateria de banhos: xilol 100% (3x de 10min), álcool etílico 100% (3x de 5min), álcool etílico 95% (5min), álcool etílico 80% (5 min), álcool etílico 70% (5min) e água destilada (5 min). Em seguida, as lâminas foram: imersas em hematoxilina de Erlich por 1 minuto, lavadas 3 vezes em água corrente e em água destilada, e imersas em eosina alcoólica 0,5% por 1-2 minutos. Após a coloração, as lâminas serão desidratadas por meio da seguinte sequência de banhos (de 5 minutos cada): álcool etílico 95%, álcool etílico 100% (3x), álcool etílico/xilol 1:1, xilol 100% (2x). Finalmente as lâminas serão montadas utilizando-se resina Entelan® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Posteriormente as lâminas foram foto documentadas e os diferentes grupos experimentais foram avaliados e classificados em colaboração por um patologista, conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde (MONTIRONI; LOPEZ-BELTRAN, 2005). Dado a menor quantidade de animais nos grupos e grande variedade de diagnósticos histológicos, os achados foram agrupados em: “Benigno”, compreendendo achados benignos, urotélios sem alterações patológicas, ou com achados inflamatórios, como hiperplasia e metaplasia escamosa; “Pré- Neoplásica”, composta por achados de displasia discreta, displasia moderada e displasia moderada focal; e “Neoplásica”, com presença de lesões carcinogênicas como carcinoma não papilífero *in situ* (pTis), carcinoma papilífero *in situ* (pTA), carcinoma papilífero de baixo grau (pTa), carcinoma não papilífero de baixo grau (pTa), carcinoma papilífero de alto grau (pT1), carcinoma não papilífero de alto grau (pT1).

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA (CMYC E GSTP1)

O mesmo material coletado para análise histopatológica foi também cortado com 6µm de espessura para análise imunohistoquímica. As lâminas foram incubadas em solução de 0,3% de H₂O₂, em seguida em solução de bloqueio a temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas. Anticorpo primário Sc-789 (Santa Cruz, USA) foi utilizado para marcação de cMyc e primário *rabbit polyclonal* anti-Ki-67 (AB9260, Millipore, USA). Ambos foram diluídos em solução 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) e aplicadas nas lâminas *overnight*

a 4 °C. Ligação de anticorpo foi detectado utilizando HRP kit (*Dako citomation Inc., USA*), aplicado por 40min a temperatura ambiente. As Lâminas foram então recoradas com *Harri's hematoxylin*.

As lâminas foram fotografadas em microscópio *Carl Zeiss Axio-Imager® A1* (*Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha*) utilizando o programa *AxioVision®* (*Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha*). Foram fotografados 10 campos aleatórios de cada lâmina no aumento de 40x, nas mesmas condições de iluminação. Foi feita então análise computadorizada de intensidade de marcação celular e nuclear usando o programa ImageJ na função “*Threshold*” para isolar as células uroteliais do fundo da lâmina.

4.4.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE CMYC

Foi utilizado anticorpo anti-cmyc Ig-G monoclonal 200µg/mL (Santa Cruz Sc-40 9E10) na diluição de 1:300 sobre base de EDTA em pH 6,7. Foi realizada também a marcação com anticorpos anti-Myc (A-14) (Santa Cruz), na concentração de 0,56µg/ml, em semelhança de modelos já existentes na literatura (KLUK et al., 2016).

Para determinar marcação de intensidade do anticorpo anti-cmyc, foi utilizado “plug-in” IHC Profiler (Varghese et al., 2014). A análise computacional dividiu as lâminas em 4 categorias de intensidade de marcação celular: 0 (sem marcação - negativo); 1 (marcação levemente positiva); 2 (marcação positiva); 3 (marcação fortemente positiva). Os níveis de marcação foram expressos na porcentagem do total de pixels analisados.

4.4.2 IMUNOHISTOQUIMICA (KI-67).

Foi utilizado anticorpo monoclonal anti-ki-67 (Agilent - Dako) na diluição de 1:400 sobre base de EDTA pH 6,7. Para análise de núcleos marcados por campos do anticorpo anti-ki67, foi utilizado “plug-in” *ImmunoRatio* (Tuominen et al., 2010). A porcentagem de pixels da área nuclear em cada lâmina foi dividida em duas categorias: Positivo, ou negativo.

4.5 WESTERN BLOTTING.

As segundas metades das bexigas coletadas foram transportadas em nitrogênio líquido. Em seguida foram homogeneizadas em solução buffer (100 mM Tris-hydroxymetil-aminometano pH7.4, 10mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM ácido etilenodiaminotetracético, 10mM ortovanato de sódio, 2mM *phenylmethylsulfonyl fluoride*, 0,1 mg/ml aprotinina and 10% Triton-X 100) usando TissueLyser II (QiagenR, USA).

Os extratos obtidos foram centrifugados à 4°C por 40 minutos à 11.000 rpm, e a proteína sobrenadante foram quantificadas usando *Bicinchoninic Acid Kit* (Sigma-Aldrich) na *Synergy HT Microplate Reader* (BioTek). As amostras foram adicionadas à solução Laemmli, contendo 100 mM *dithiothreitol* e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Alíquotas contendo 60ug de proteína foram separadas por eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida em géis de poliacrilamida a 6,5%, 10% e 15% (como descrito na Tabela -1). Após Eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Ligações inespecíficas foram reduzidas incubando as membranas em tampão de bloqueio (5% de albumina sérica bovina (BSA), 10 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,02% Tween 20) por uma hora em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas à 4 °C durante a noite com anticorpo primário (Quadro1) diluídos 1:1000 in 3%BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0,02% Tween 20, em constante agitação: mTOR (07-23 Upstate Rabbit); PI3K (Upstate Rabbit 06-195u); p-4-EBP (9452/9644 Cell Rabbit); and β -actina (4967 Cell Signalling Rabbit).

As membranas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos com anticorpo secundário *anti-rabbit* (*Pierce goat anti-rabbit horserasish* peroxidase conjugada, *Thermo Scientific*), diluído 1:5000 em 3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,02% Tween 20. Bandas imunorreativas foram detectadas usando método de quimiluminescência (*Clarity Western ECL Substrate*, *Bio Rad*) no programa *Imager XRS Gel Doc Bio Rad* (Califórnia, USA), e as intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria no programa *Image Lab v.6.0.1* (*Bio Rad*). β -actina foi usada como controle endógeno. Os resultados foram apresentados como média entre as intensidades da banda e a β -actina.

Tabela 1 Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcação e *Western Blotting*.

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Concentração	Código	Peso Molec.	Contração do Gel	Fonte
m-Tor	Coelho	1:1000	07-231	289Kda	6,5%	upstate
PI3K	Coelho	1:1000	06-195	85Kda	10%	upstate
4ebp1	Coelho	1:1000	9452	20Kda	15%	cell
p-4E-BP1(T70)	Coelho	1:1000	9455	70Kda	15%	cell
Beta actina	Coelho	1:1000	4967	43Kda	*10%-15%	cell

5. RESULTADOS**ARTIGO SUBMETIDO****Boosting Bladder Cancer Treatment Using Intravesical Nitazoxanide and Bacillus Calmette-Guérin Association**

Isis G.A. Kiehl¹; Eduardo Ricetto¹; Ana C.C. Salustiano¹; Marina V. Ossick¹; Karen L. Ferrari, Heloisa B. Assalin¹; Leonardo O. Reis²

¹University of Campinas, Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

²Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas) and UroScience, School of Medical Sciences, University of Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Key words: urinary bladder cancer; bacillus Calmette-Guérin; nitazoxanide;

Correspondence to:

Leonardo Oliveira Reis, MD, MSc, PhD

Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas)

R. John Boyd Dunlop, s/n

Campinas – São Paulo - Brasil - CEP: 13060-904

E-mail: reisleo.l@gmail.com

ABSTRACT:

PURPOSE: Nitazoxanide (NTZ) has shown promising antitumoral effect, current study compared the anti-neoplastic effects of intravesical NTZ and BCG plus NTZ in NMIBC animal model.

METHODS: 30 rats, Fisher 344 were instilled with 4 intravesical dose of 1.5 mg/kg of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) every 15 days for BC induction. The animals were divided in 3 groups (Group BCG 10^6 UFC – 1 mg of BCG; Group NTZ – 300 mg/kg of NTZ; Group NTZ+BCG – simultaneous treatment of BCG and NTZ) and received weekly intravesical treatment for 6 consecutive weeks. Animals were submitted to ultrasound imaging and euthanasia, their bladders were collected and histopathological, immunohistochemical tests (ki67 e cMyc) and Western Blotting (PI3K, mTOR and p-4E-BP) were performed.

RESULTS: Histopathological tests show 66.67% incidence of BC in animals treated with BCG; 62.5% incidence in animals treated with NTZ e 37.5% incidence in animals treated with NTZ+BCG. BC Positive animals presented 12.4% (IC 10.1-14.6%) nuclear area positivity for ki-67 in BCG group, followed by 13.2% (IC 10.5-15.9%) in NTZ group, and 8.8% (IC 6.0-11.6%) in NTZ+BCG group. BC positive animals presented higher percentage of high positive ki-67 marked when treated with NTZ alone (40.10%) and smaller percentage when treated with NTZ+BCG (19.9%). Blotting has shown mTOR and PI3K inhibition in the presence of BCG added to cMyc and 4-EBP inhibition in the presence of NTZ.

CONCLUSIONS: Results show possible synergy between the BCG gold standard treatment and NTZ for BC, in which cMyc and downstream mTOR, PI3K and p-4E-BP inhibition might play a role.

INTRODUCTION

Since 1976, *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) is the gold standard treatment for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) (MORALES; EIDINGER; BRUCE, 2002; BÖHLE; BRANDAU, 2003b; BABJUK et al., 2017). The flipside of living and attenuated organisms is the difficulty in predicting patient response and side effects (BÖHLE; BRANDAU, 2003b).

As an alternative, Nitazoxanida (2-(acetyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl) benzamide) (NTZ), initially used as an antiprotozoal drug, has been described as potential antitumor drug (FAN-MINOGUE et al., 2013; DI SANTO; EHRISMAN, 2014) especially directed to blockade cMyc oncogene, a super expressed gene in many different types of cancer cells (DANG et al., 2006) and a cell proliferative key pathway, Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), also shared by the BCG effect (REIS et al., 2012; FERRARI et al., 2015; PASSOS et al., 2018).

We evaluate for the first time the histological and molecular (mTOR and cMyc oncogene pathway) efficiency of intravesical NTZ in NMIBC, compared to BCG and the association of both treatments in immunocompetent model with great ability to reproduce human NMIBC characteristics (REIS et al., 2011).

METHODS

Experimental Proceedings

After ethics committee approval, 30 isogenic female Fisher 344 rats 7 weeks old, were anesthetized with 2% Xylazine Hydrochloride (5 mg/kg; König, Brazil) and 10% of Ketamine Hydrochloride (60 mg/kg, Fort Dodge, USA), and received four intravesical doses of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) (1.5 mg/kg; Sigma-Aldrich) dissolved in 0.2 ml of saline via a 22-gauge angiocatheter every 15 days (week 0, 2, 4, 6) (REIS et al., 2012). The anesthetized animals remained sedated for 45 minutes after bladder catheterization to prevent spontaneous micturition and to abdominal ultrasonography tumor induction monitorization.

At week 8, the rats were randomly divided into 3 groups of weekly intravesical instillations for 6 weeks as follows: BCG group (n = 10) 2×10^6 CFU of Connaught BCG in 0.2 ml saline (Ataulpho de Paiva Foundation, Brazil) (REIS et al., 2010b), NTZ group (n = 10) 300 mg/kg of Nitazoxanide (MURPHY; FRIEDMANN, 1985), (LIU et al., 2015) and BCG+NTZ group (n = 10) received BCG and NTZ simultaneously at the same concentrations in 0.2 ml saline.

Post-treatment (week 15) the animals were euthanized, urinary bladders collected and submitted to microscopical, histopathological, immunohistochemical (cMyc and ki67) and Western Blotting (mTOR, PI3K and p-4E-BP) analysis.

Ultrasound

Real time imaging was used to observe carcinogenesis, as well as to guarantee intravesical instillation. Images acquired were capable of registering papillary lesions as well as other bladder findings, such as wall thickening and urine cellularity. For imaging, a General Electric® Logiq E GE equipment was used, with a linear 12 Hz probe. Animals were trichotomized in ventral region, and transversal and longitudinal imaging of the bladder was made. Ultrasound results were graded as:

NA: preservation of wall architecture;

+: small unique lesion (maximum approximate 0.35 cm diameter);

++: moderate size unique lesion (at least approximate 0.36 cm diameter), or multiple lesions;

+++: big (at least approximate 0.50 cm) diameter, or diffuse wall thickening with loss of wall architecture.

Histopathological analysis

The urinary bladders were divided into two halves each, and the urothelium inspected for macroscopic lesions. One half of each bladder was fixed in 4% formaldehyde and embedded in Paraplast Plus® (St. Louis, EUA), cut into 6 µm sections and stained with

hematoxylin-eosin for classification according to World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus (MONTIRONI; LOPEZ-BELTRAN, 2005). The uropathologist who interpreted the hematoxylin and eosin stains was blinded to treatment groups.

For better evaluation, neoplastic lesions were clustered in: **Benign** - no lesion, benign, hyperplasia or papillary hyperplasia; **Pre Neoplastic** - dysplasia; **Neoplastic** - carcinoma *in situ*, low- or high-grade papillary carcinoma.

Immunohistochemistry performed for cMyc and ki-67

The same bladders that were used for histopathological analysis were also cut with 6 µm thick for immunohistochemistry. Sections were incubated in 0.3% H₂O₂ and blocking solution at room temperature to block non-specific binding. Primary rabbit polyclonal antibody Sc-789 (Santa Cruz, Brazil) for cMyc and primary rabbit polyclonal anti-ki-67 (AB9260, Millipore, USA), were diluted in 1% BSA (bovine serum albumin) and applied to the sections overnight at 4°C. Bound antibody was detected with HRP kit (Dako citomation Inc., USA), applied for 40 min at room temperature. Peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen mixture. The sections were lightly counterstained with Harris' hematoxylin and photographed with a Zeiss Axiophot A2 (Carl Zeiss, Germany) photomicroscope. The images were taken with 40× magnification.

The ki-67 nuclear area staining positivity and cMyc cytoplasmatic area staining intensity (high positive, positive, low positive and negative) of carcinoma positive individuals were obtained using ImageJ 1.50b (National Institute of Health, USA) by using a color deconvolution algorithm for separating the staining components (diaminobenzidine and hematoxylin). ImmunoRatio was calibrated using cell counts defined visually as the gold standard (training set, n=x) (TUOMINEN et al., 2010).

Western Blotting performed for mTOR, PI3K, p-70 and p-4E-BP

The remaining half bladders were homogenized in solubilization buffer (100 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane pH7.4, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 10mM ethylenediaminetetraacetic acid, 10mM sodium vanadate, 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg/ml aprotinin and 10% Triton-X 100) using TissueLyser II (QiagenR, USA).

Samples were centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 40 minutes and the supernatant proteins were quantified using the Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich) at the Synergy HT Microplate Reader (BioTek). The samples were mixture with Laemmli buffer containing 100 mm dithiothreitol and heated at 100°C for 5 minutes.

Aliquots containing 60 ug protein were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% to 15% polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific protein binding was reduced by incubating the membrane for 1 hour at ambient temperature in blocking buffer (5% bovine serum albumin, BSA). Membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted 1:1000 in 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.02% Tween 20, under constant agitation: mTOR (07-23 Upstate Rabbit); PI3K (Upstate Rabbit 06-195u); p-4-EBP (9452/9644 Cell Rabbit); and β -actin (4967 Cell Signalling Rabbit).

The membranes were then incubated for 1 hour and 30 minutes with anti-rabbit secondary antibody (Pierce goat anti-rabbit horserasish peroxidase conjugated, Thermo Scientific) diluted 1:5000 in 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl and 0.02% Tween 20. Immunoreactive bands were detected using the chemiluminescence method (Clarity Western ECL Substrate, BioRad) in Imager XRS Gel Doc BioRad (California, USA) and the bands intensities quantified by densitometry through the Image Lab Software v.6.0.1 (BioRad). β -actin was used as endogenous control. The results were expressed as means between the bands compared to the intensity of β -actin labeling.

Statistical Analysis

Data are shown as the mean $\pm$ SEM (standard error of the mean) of at least 3 independent experiments.

Differences between groups were analyzed by ANOVA and the Bonferroni post hoc test for multiple non-pairwise comparison of means with significance considered at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 25 animals (9 in BCG group, 8 in NTZ group and 8 in NTZ+BCG group) survived all the procedures and were submitted to analysis as described.

Ultrasound

Between ultrasound imaging and histological findings there was 16% of incongruity results. This might be due to limitations in ultrasound imaging in identifying very small lesions, or even pathologies that doesn't cause evident macroscopic irregularity of mucosa.

Macroscopic and Histopathological analysis

Neoplastic lesions predominated in isolated treatments (BCG - 66.70% and NTZ - 62.50% groups) and decreased almost by half in the association NTZ+BCG group (37.50%). A trend to normal urothelium were more common in NTZ+BCG group (37.50%), followed by BCG group (22.22%) and NTZ group (12.50%). Pre neoplastic findings predominated equally (25%) in NTZ and association NTZ+BCG groups, compared to 11.11% in BCG group (**Figure 1**).

Immunohistochemistry

Ki-67 immunohistochemistry positivity of carcinoma slides were 8.40% in NTZ+BCG group, 12.4% in the BCG and 13.2% in NTZ group ($p=0.063$), **Figure 2**.

Between animals with carcinoma cMyc strong positive area where 40.10% in NTZ, 32.2% in BCG and 19.90% in the NTZ+BCG group, $p < 0.001$ and low positive area 26.6% in NTZ+BCG, 21% in BCG and 16% in the NTZ group, ($p = 0.002$), **Figure 3**.

Western Blotting

Presence of BCG (BCG and BCG+NTZ) significantly decreased the mTOR and PI3K proteins expression ($p=0.0473$ and $p=0.0349$, respectively) compared to NTZ alone treatment.

Presence of NTZ (NTZ and BCG+NTZ) significantly decreased p-4E-BP phosphorylation ($p=0.0004$) compared to BCG alone treatment, **Figure 4**.

DISCUSSION

The treatment landscape for BC has been changing dramatically, as immune-oncology introduces new checkpoint inhibitors into clinical practices (BOEGEMANN et al., 2017). In this scope, immunotherapy drugs have been researched, including Nitazoxanide, a cestocide drug with immuno-anti-carcinogenic action, and promising inhibiting effects on mTOR pathway and cMyc oncogene (DI SANTO; EHRISMAN, 2013, 2014; FAN-MINOGUE et al., 2013).

Our study is the first to test NTZ and BCG, the gold standard treatment, as association immunotherapy for BC treatment. It is noteworthy that our work used a solid orthotopic and autochthonous carcinogenic model (STEINBERG et al.,; REIS et al., 2010b, 2011, 2012) compared to heterotopic and non-autochthonous models described in previous studies (SHE et al., 2010; MAKHLIN et al., 2011), confirmed by the well-characterized development of neoplastic lesions followed by ultrasound.

Histopathological and immunohistochemical results points to an effective reduction in the occurrence of carcinoma in animals treated with NTZ+BCG. Association treatment had lower percentage of neoplastic lesions (37.50%) compared to BCG (66.67%) or NTZ alone (62.50%).

NTZ successfully reduced cMyc expression when added to BCG. This oncogene suppression seems potential target for carcinogenesis reduction in BC (CHRISTOPH et al., 1999; MASSARI et al., 2015), and other neoplasias considering that c-Myc gene is overexpressed in human cancer (DI SANTO; EHRISMAN, 2013; LIU et al., 2017).

cMyc gene suppression is described as indirect, with no binding target in the gene itself and many pathways may be involved such as AKT/mTor, with important interference on downstream molecules like 4E-BP (DI SANTO; EHRISMAN, 2014)(DANG et al., 2006).

mTOR pathway regulates a series of molecules responsible for protein synthesis and cell growth, such as 4E-BP, and it is frequently activated in neoplasms. The pathway has been

also related to cMyc interference, and it's upstream and downstream targets, such as P53 and 4E-BP, also connected to cMyc overexpression on tumor survival (FAN-MINOUE et al., 2013; POURDEHNAD et al., 2013).

4E-BP is a downstream protein target of mTOR pathway strongly related to BC treatment with potential prognostic value (SCHULTZ et al., 2010b; FERRARI et al., 2015) and its activation culminates in protein synthesis and cell proliferation (LAPLANTE; SABATINI, 2012) and is linked to multiple pathways, besides mTOR (PASSOS et al., 2018).

NTZ isolated treatment successfully reduced p-4E-BP, as well as association treatment, leading to the assumption that presence of NTZ was responsible for decreased 4E-BP phosphorylation when compared to non NTZ treated groups in this experiment. Similarly to our *in vivo* findings, high doses of NTZ has shown potential to reduce 4E-BP phosphorylation *in vitro* colorectal cancer cells (SENKOWSKI et al., 2015),

Activation of mTOR and PI3K molecule, one of its upstream targets, on the other hand was more evident in NTZ treatment alone but reduced in the presence of BCG (BCG alone and association treatment) (GAO et al., 2003), confirming the fact that although BCG's mechanism of action is centered on the immune response, its action on signaling pathways responsible for physiological maintenance, cell survival and uncontrolled proliferation of neoplasms includes the PI3K/AKT/mTOR pathway (Samant and Shevde, 2011) and, in association, might corroborate for downregulation of one of the best-defined substrates of the pathway, 4E-BP.

The role of PI3K in regulation of c-Myc has been supported by several recent reports showing that inhibition of PI3K activity resulted in amplification or overexpression of c-Myc, and that c-Myc overexpression could confer resistance to PI3K inhibitors, although the underlying mechanism was not elucidated in these reports (Wen-Bin Tsai et al., 2012).

Curiously, even though NTZ is described as responsible for cMyc's attenuation (DI SANTO; EHRISMAN, 2014), and efficient cMyc inhibitor can also stimulate mTOR via negative feedback (CHANG et al., 2017), association treatment is an even better cMyc inhibitor, assuming that BCG might be responsible for canceling the loop feedback caused by cMyc's

inhibition. If this synergic relation between NTZ and BCG was caused by inhibition of cMyc feedback towards mTOR, or if it started initially in mTOR, to posteriorly cause cMyc inhibition, current data is not sufficient to conclude.

CONCLUSION

This work has pointed to a new potential synergy between the gold standard treatment for non-muscle invasive urothelial carcinoma, BCG and other immunotherapies such as NTZ. Histological, immunohistochemistry and blotting tests showed that the drug association is beneficial and causes better histological results, more efficient cMyc and p-4E-BP inhibition by NTZ and mTOR and PI3K inhibition by BCG than both isolated treatments. Further studies are needed to confirm the results obtained, and further elucidate NTZ action towards cMyc, 4E-BP, mTOR pathway.

REFERENCES

- ALEXANDROFF, A. B. et al. BCG Immunotherapy of Bladder Cancer: 20 Years On. **The Lancet**, v. 353, n. 9165, p. 1689–1694, maio 1999.
- BABJUK, M. et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **European Urology**, v. 71, n. 3, p. 447–461, mar. 2017.
- BOEGEMANN, M. et al. Prospects and Progress of Immunotherapy for Bladder Cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, p. 1–15, 23 ago. 2017.
- BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 3, p. 964–969, set. 2003a.
- BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. **Journal of Urology**, v. 170, n. 3, p. 964–969, set. 2003b.
- CHANG, T.-M. et al. The Regulatory Role of Aberrant Phosphatase and Tensin Homologue and Liver Kinase B1 on AKT/MTOR/c-Myc Axis in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. **Oncotarget**, v. 8, n. 58, 17 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/20956>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- CHRISTOPH, F. et al. Over-expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. **International journal of cancer**, v. 84, n. 2, p. 169–173, 1999.

COHEN, S. M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 6, p. 663–671, 2002.

COLLER, H. A. et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3260–3265, 2000.

CRALLAN, R. A.; GEORGOPOULOS, N. T.; SOUTHGATE, J. Experimental Models of Human Bladder Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 374–381, 1 mar. 2006.

DANG, C. V. et al. The C-Myc Target Gene Network. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 4, p. 253–264, ago. 2006.

DI SANTO, N.; EHRISMAN, J. Research Perspective: Potential Role of Nitazoxanide in Ovarian Cancer Treatment. Old Drug, New Purpose? **Cancers**, v. 5, n. 3, p. 1163–1176, 10 set. 2013.

DI SANTO, N.; EHRISMAN, J. A Functional Perspective of Nitazoxanide as a Potential Anticancer Drug. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 768, p. 16–21, out. 2014.

FAN-MINOGUE, H. et al. A C-Myc Activation Sensor-Based High-Throughput Drug Screening Identifies an Antineoplastic Effect of Nitazoxanide. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 9, p. 1896–1905, 1 set. 2013.

FERRARI, K. L. et al. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Efficiently Reduces P70S6K1 but Not 4E-BP1 Phosphorylation in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. **Journal of Urology**, v. 193, n. 2, p. 682–689, fev. 2015.

GAO, N. et al. Role of PI3K/AKT/MTOR Signaling in the Cell Cycle Progression of Human Prostate Cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 4, p. 1124–1132, out. 2003.

HANSEL, D. E. et al. *HER2* Overexpression and Amplification in Urothelial Carcinoma of the Bladder Is Associated With *MYC* Coamplification in a Subset of Cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 2, p. 274–281, ago. 2008.

HEMPHILL, A.; MUELLER, J.; ESPOSITO, M. Nitazoxanide, a Broad-Spectrum Thiazolide Anti-Infective Agent for the Treatment of Gastrointestinal Infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 7, p. 953–964, maio 2006.

HICKS, R. M.; WAKEFIELD, J. S. J. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea I. Histology. **Chemico-biological interactions**, v. 5, n. 2, p. 139–152, 1972.

KLUK, M. J. et al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 2, p. 166–179, fev. 2016.

LAM, K. K. Y. et al. Nitazoxanide Stimulates Autophagy and Inhibits MTORC1 Signaling and Intracellular Proliferation of Mycobacterium Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002691, 10 maio 2012.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, abr. 2012.

LIU, C. et al. In Vivo and in Vitro Efficacies of Mebendazole, Mefloquine and Nitazoxanide against Cyst Echinococcosis. **Parasitology Research**, v. 114, n. 6, p. 2213–2222, jun. 2015.

LIU, P. et al. A Functional MTORC1 Signaling Is Indispensable for C-Myc Driven Hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, mar. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.29183>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

MAKHLIN, I. et al. The MTOR Pathway Affects Proliferation and Chemosensitivity of Urothelial Carcinoma Cells and Is Upregulated in a Subset of Human Bladder Cancers: MTOR PATHWAY AND UROTHELIAL CARCINOMA. **BJU International**, v. 108, n. 2b, p. E84–E90, jul. 2011.

MASSARI, F. et al. Prognostic Value of Beta-Tubulin-3 and c-Myc in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127908, 5 jun. 2015.

MENSSEN, A.; HERMEKING, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6274–6279, 2002.

MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. **International journal of surgical pathology**, v. 13, n. 2, p. 143–153, 2005.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. **Journal of Urology**, v. 167, n. 2 Part 2, p. 891–894, fev. 2002.

MURPHY, J. R.; FRIEDMANN, J.-C. Pre-clinical toxicology of nitazoxanide—a new antiparasitic compound. **Journal of Applied Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 49–52, 1985.

NAWROTH, R. et al. S6K1 and 4E-BP1 Are Independent Regulated and Control Cellular Growth in Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27509, 15 nov. 2011.

ONODERA, T.; HASHIMOTO, Y.; YAGIHASHI, S. C-Myc, c-ErbB-1 and c-ErbB-2 Expressions in Urothelial Carcinoma. **Pathology International**, v. 47, n. 4, p. 209–216, abr. 1997.

OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 9, p. 747–755, 1995.

PASSOS, G. R. et al. Intravesical Thalidomide Boosts Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Treatment. **Medical Oncology**, v. 35, n. 1, jan. 2018.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12032-017-1067-2>>. Acesso em: 28 jul. 2019.

PERABO, F. G. et al. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 25, n. 5, p. 3565–3573, 2005.

POURDEHNAD, M. et al. Myc and MTOR Converge on a Common Node in Protein Synthesis Control That Confers Synthetic Lethality in Myc-Driven Cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 29, p. 11988–11993, 16 jul. 2013.

REIS, L. O. et al. Experimental Animal Model and RNA Interference: A Promising Association for Bladder Cancer Research. **World Journal of Urology**, v. 27, n. 3, p. 353–361, jun. 2009.

REIS, L. O. et al. Evolution on Experimental Animal Model for Upper Urothelium Carcinogenesis. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 4, p. 499–505, ago. 2010a.

REIS, L. O. et al. Evolution on Experimental Animal Model for Upper Urothelium Carcinogenesis. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 4, p. 499–505, ago. 2010b.

REIS, L. O. et al. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 106–110, 2011.

REIS, L. O. et al. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 187, n. 2, p. 438–445, fev. 2012.

SAMANT, R. S.; SHEVDE, L. A. Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 3, p. 122–134, 2011.

SCHMITZ-DRÄGER, B. J. et al. C-Myc in Bladder Cancer. Clinical Findings and Analysis of Mechanism. **Urological Research**, v. 25 Suppl 1, p. S45-49, 1997.

SCHULTZ, L. et al. Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder after Cystectomy. **Cancer**, v. 116, n. 23, p. 5517–5526, 1 dez. 2010a.

SCHULTZ, L. et al. Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder after Cystectomy. **Cancer**, v. 116, n. 23, p. 5517–5526, 1 dez. 2010b.

SEAGER, C. M. et al. Intravesical Delivery of Rapamycin Suppresses Tumorigenesis in a Mouse Model of Progressive Bladder Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 12, p. 1008–1014, 1 dez. 2009.

SENKOWSKI, W. et al. Three-Dimensional Cell Culture-Based Screening Identifies the Anthelmintic Drug Nitazoxanide as a Candidate for Treatment of Colorectal Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 1504–1516, 1 jun. 2015.

SHE, Q.-B. et al. 4E-BP1 Is a Key Effector of the Oncogenic Activation of the AKT and ERK Signaling Pathways That Integrates Their Function in Tumors. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 39–51, jul. 2010.

SHI, Z. et al. Nitazoxanide inhibits the replication of Japanese encephalitis virus in cultured cells and in a mouse model. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 10, 2014.

SISSON, G. et al. Enzymes Associated with Reductive Activation and Action of Nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in Helicobacter Pylori. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2116–2123, 1 jul. 2002.

STEINBERG, G. D. et al. Characterization of an N-methyl-N-nitrosourea-induced autochthonous rat bladder cancer model. **Cancer research**, v. 50, n. 20, p. 6668–6674, 1990.

STEINBERG, G. D. et al. Characterization of an JY-Methyl-TV-Nitrosourea-Induced Autochthonous Rat Bladder Cancer Model. p. 7, [s.d.]

TARANTINO, G. et al. Oncological Impact of M-Tor Inhibitor Immunosuppressive Therapy after Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Review of the Literature. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 21 out. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00387/full>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

TSAI, W.-B. et al. Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2622–2633, 15 maio 2012.

TUOMINEN, V. J. et al. ImmunoRatio: A Publicly Available Web Application for Quantitative Image Analysis of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and Ki-67. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, ago. 2010. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2615>>. Acesso em: 28 jul. 2019.

WILLIAMS, P. D.; LEE, J. K.; THEODORESCU, D. Molecular Credentialing of Rodent Bladder Carcinogenesis Models. **Neoplasia**, v. 10, n. 8, p. 838-IN21, ago. 2008.

ZAHARIEVA, B. et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis OfCMYC Amplificationin Urinary Bladder Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 952–956, 20 dez. 2005.

ZEEGERS, M. et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk. **Cancer**, v. 89, n. 3, p. 630–639, 2000.

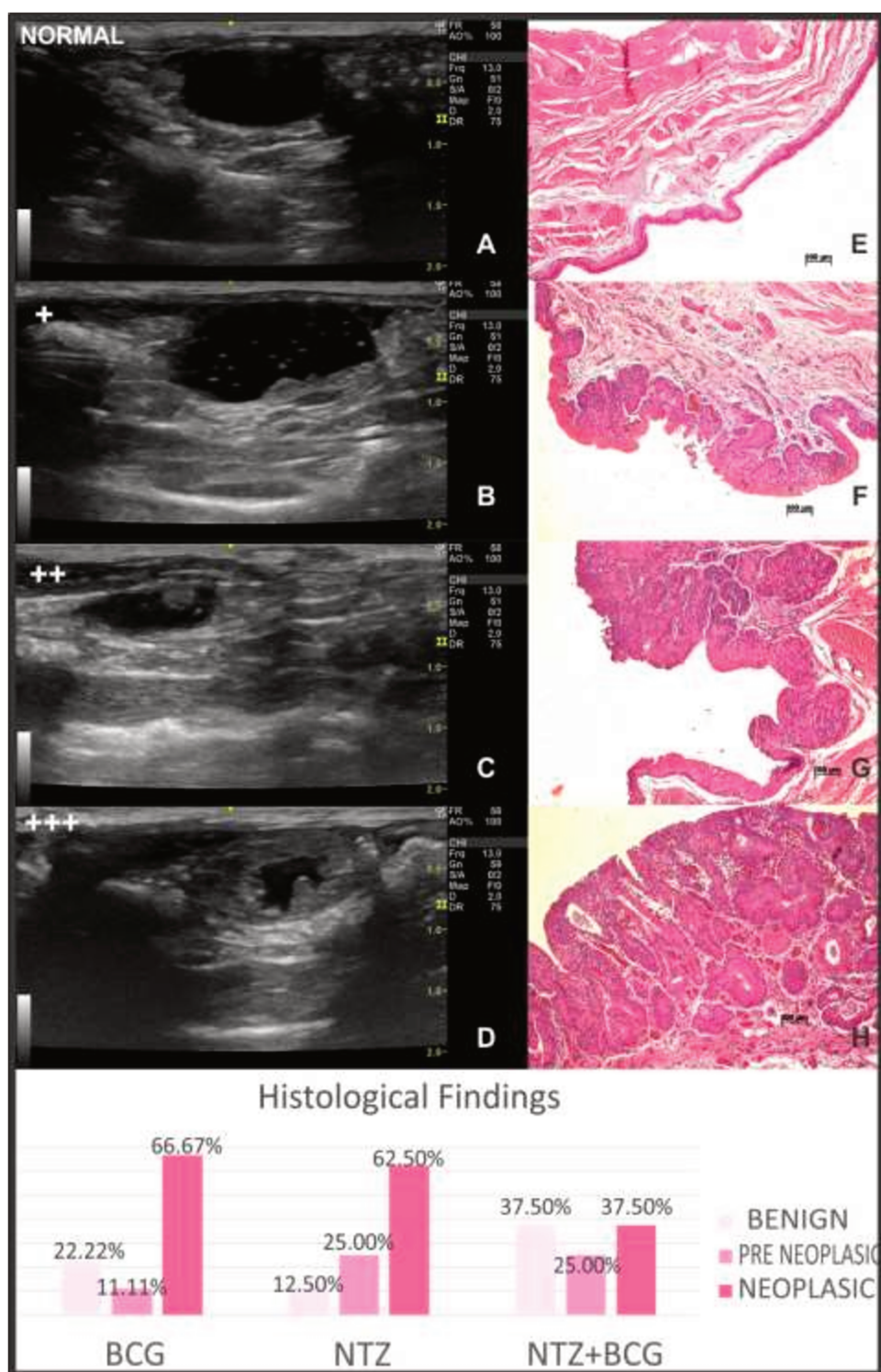


Figure 1. Images A to D are representative from ultrasound evaluation, and are in this setting, put in comparison with corresponding histological findings (E to H) in grade and severity. Below there is a graph representing histological findings.

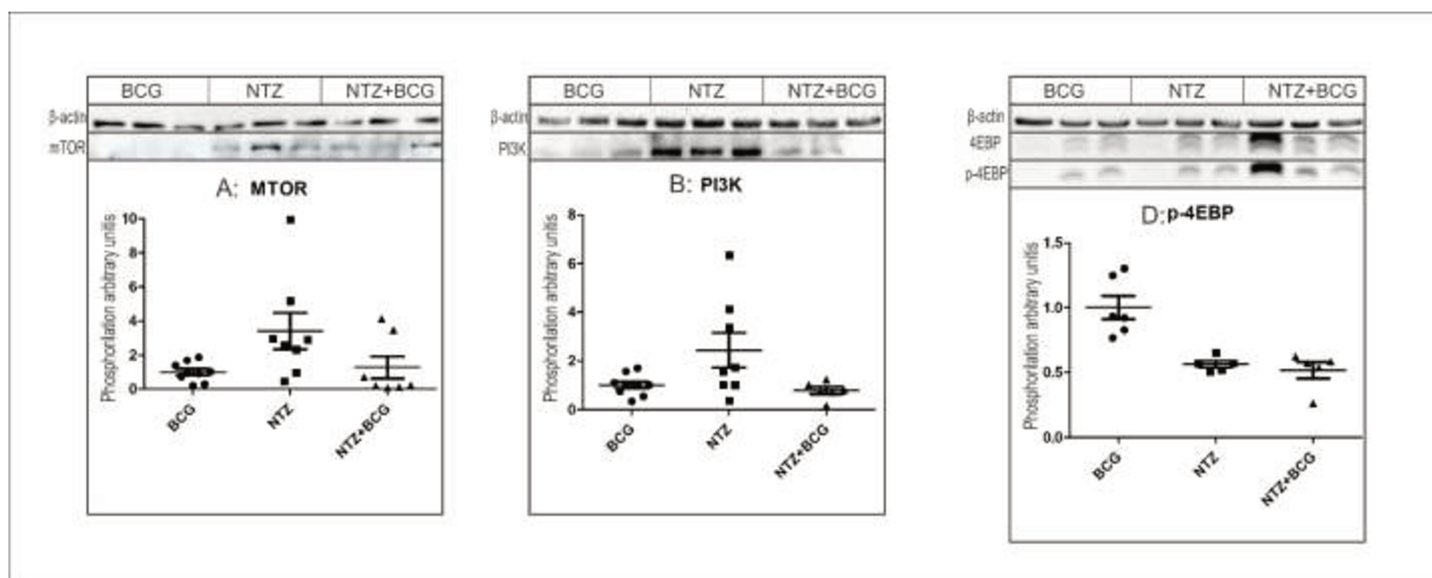


Figure 2. Representative graph of blotting evaluation, for Mtor, PI3K and p-4EBP molecules.

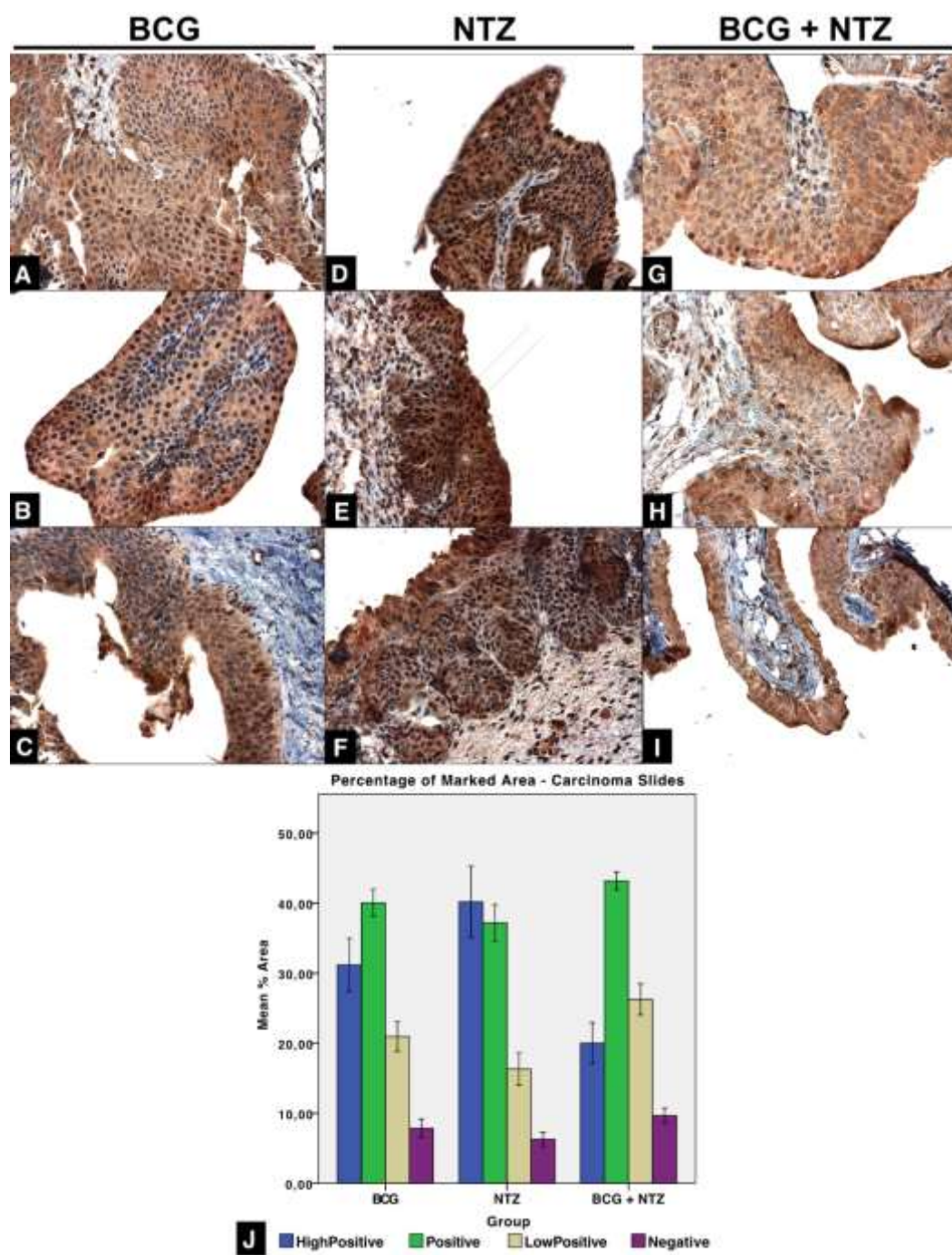


Figure 3. Images of immunohistochemistry slides marked with cMyc (A, B, C, D, E, F, G, H, I), and graph describing findings grouped as High positive, positive, Low positive and Negative (J).

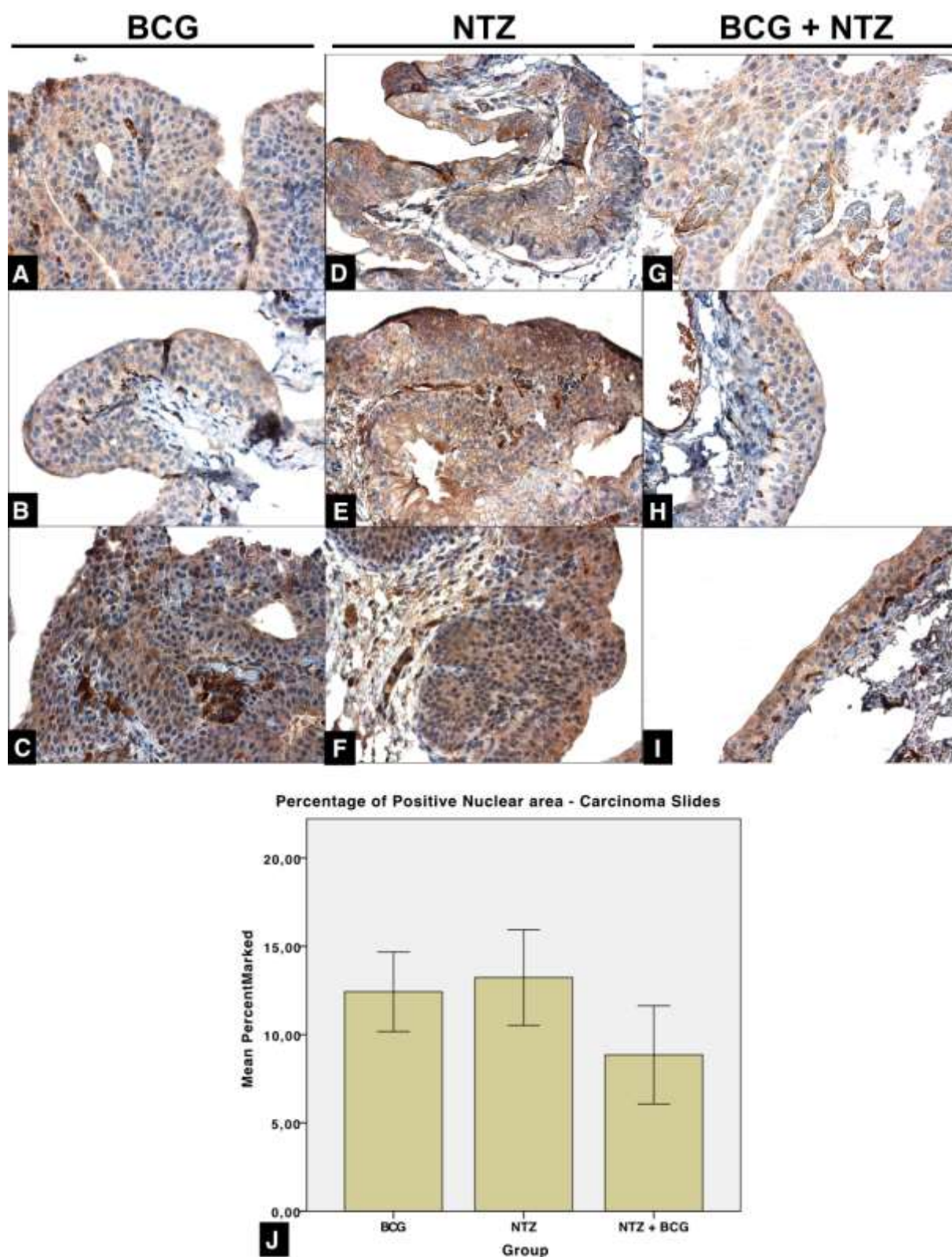
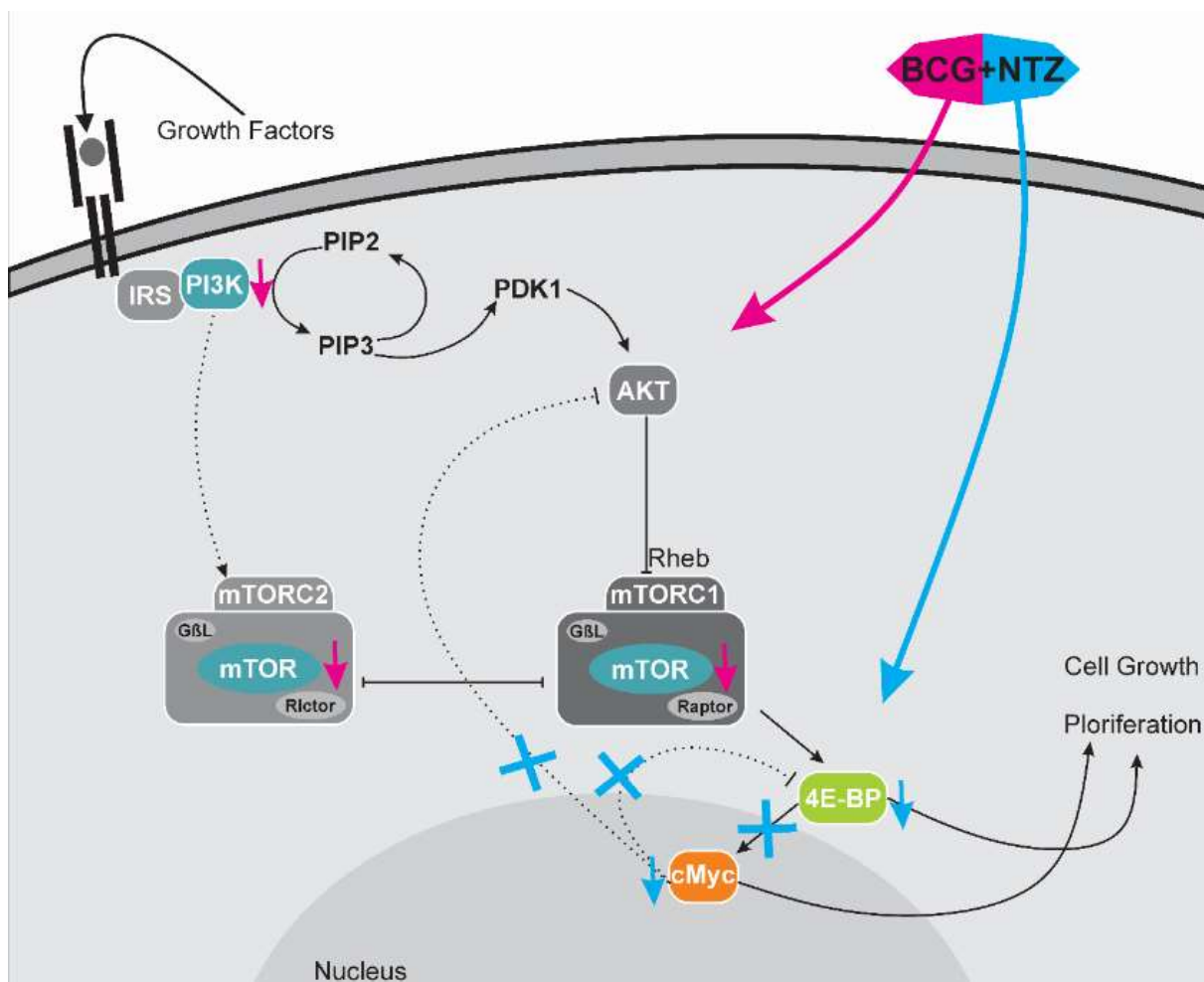


Figure 4. Images of immunohistochemistry slides marked with Ki67 (A, B, C,D,E,F,G,H,I), and graph describing findings grouped as positive and negative (J).



Supplement Figure. Illustration of association treatment effects towards mTOR, PI3K, 4E-BP and cMyc molecules.

6. DISCUSSÃO

Ainda que o mecanismo do tratamento com BCG, e a fisiopatologia do CB, tenham sido aprofundados a longo dos anos, a eficácia no tratamento de CB não teve grandes mudanças. O panorama de tratamento para CB tem mudado dramaticamente ao longo dos anos, conforme há introdução de novos checkpoints de interesse em imunooncologia sendo introduzidos para a vivência clínica (BOEGEMANN et al., 2017).

Outras imunoterapias vem sendo pesquisadas, uma delas é a Nitazoxanide, uma droga cestocida com ação imuno- anti-carcinogênica e efeitos inibidores de via mTOR e cMyc(DI SANTO; EHRISMAN, 2013, 2014; FAN-MINOGUE et al., 2013). Esse estudo é o primeiro a correlacionar NTZ, uma promissora droga, de fácil acesso, com efeito imunogênico para com lesões neoplásicas, e BCG como associação de imunoterapia, para tratamento de CB.

Este é o primeiro estudo a relacionar o NTZ, droga cestocida com ação imuno- anti-carcinogênica e efeitos inibidores de via mTOR e cMyc(DI SANTO; EHRISMAN, 2013, 2014; FAN-MINOGUE et al., 2013), e o BCG, droga de eleição para tratamento de câncer de bexiga, (REIS et al., 2010, 2011, 2012; STEINBERG et al.) em um modelo *in vivo*, autóctone, muito similar ao ambiente de CBNMI.

Nossos resultados histopatológicos e imunohistoquímicos apontam para redução de ocorrência de carcinoma em animais tratados com NTZ+BCG. Essa associação de tratamentos tem percentagem menor de neoplasia (37,50%) comparado com BCG (66,67%), ou NTZ sozinho (62,50%). Esse resultado guia a linha de argumento de que a associação de tratamento é provavelmente capaz de induzir melhores resultados do que BCG sozinho. Os resultados de quantificação de Ki67 suportam o mesmo padrão que a histologia, já que a associação de tratamentos teve uma discreta tendência de mostrar menor quantidade de proliferação celular.

Complementarmente aos nossos achados histológicos e a literatura atual (DI SANTO; EHRISMAN, 2013), NTZ teve sucesso em reduzir a expressão de cMyc em ratos quando adicionado ao tratamento de BCG. Essa supressão do oncogene cMyc tem grande importância para redução de carcinogênese urotelial (CHRISTOPH et al., 1999; MASSARI et al., 2015) e outras neoplasias (LIU et al., 2017). A inibição de cMyc é de possível ocorrência a ser investigada, pois não há molécula de ligação no próprio gene, gerando expectativa de que mais de um mecanismo esteja envolvido (DI SANTO; EHRISMAN, 2014).

A inibição de cMyc pelo NTZ provavelmente ocorre pela *Extracellular Signal-Regulated kinase* (ERK), a molécula *upstream* com possível responsabilidade por evitar a fosforilação e ativação de cMyc (FAN-MINOGUE et al., 2013). Interação *Upstream* pode também ocorrer por ação em via mTOR e GSTP1/MAPK8 com consequente efeito em

expressão de cMyc (POURDEHNAD et al., 2013). A via mTOR regular uma série de moléculas (assim como 4EBP) que culminam em síntese proteica, crescimento e divisão celular, estando fortemente associada à malignidade em células neoplásicas.

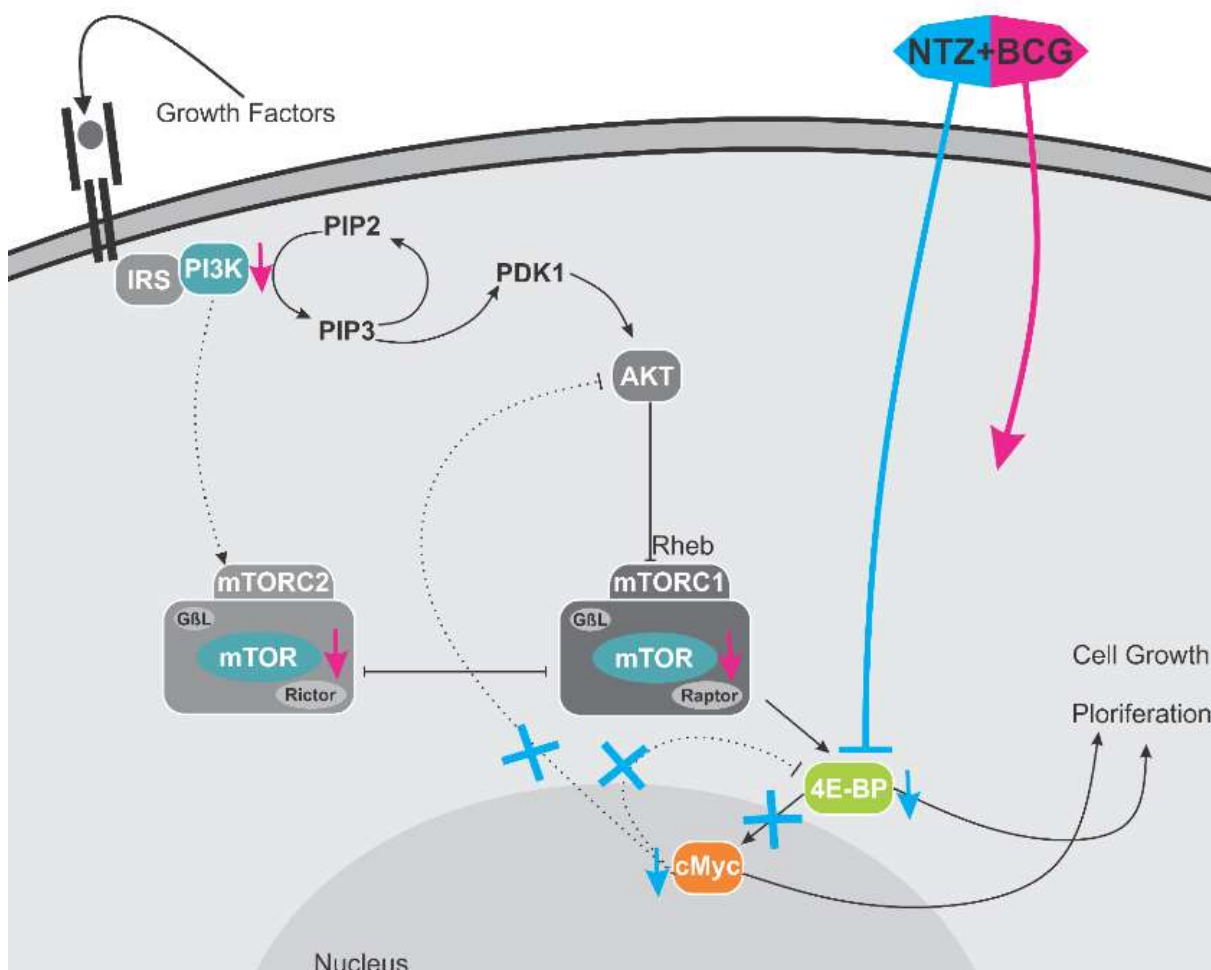


Figura 2: Ilustração do efeito do tratamento associação nos alvos mTOR, PI3K, 4E-BP e cMyc.

Moléculas *Upstream* e *Downstream* de via mTOR (como P53 e 4EBP), tem forte relação com sobrevivência de células tumorais com hiperexpressão de cMyc (FAN-MINOUE et al., 2013; POURDEHNAD et al., 2013). 4EBP é um dos sítios *downstream* da via mTOR fortemente relacionado ao sucesso de tratamento de CB, com papel inclusive de preditor prognóstico (SCHULTZ et al., 2010b; FERRARI et al., 2015).

Tratamento isolado de NTZ teve sucesso em reduzir a fosforilação de 4E-BP, assim como o tratamento associação (NTZ+BCG). Estudos *in vitro* mostraram potencial para reduzir fosforilação de 4EBP em células de câncer colorretal (SENKOWSKI et al., 2015) na presença de altas doses de NTZ, similarmente aos achados *in vivo* presentes no nosso trabalho, sugerindo que a presença de NTZ foi responsável pela menor presença de p-4E-BP quando comparado ao grupo tratado somente com BCG no presente estudo.

A ativação de molécula de mTor, por outro lado se mostrou mais evidente no grupo tratado com NTZ somente, e reduzida na presença de BCG (tanto no grupo tratado com BCG

isolado, como tratamento associação). Seguindo o mesmo padrão, PI3K, um sítio *upstream* e via mTOR, também a segunda via mais alterada em células neoplásicas, teve redução em sua ativação na presença de BCG e NTZ+BCG, quando comparados ao NTZ isolado.

Ao relacionar os resultados encontrados para PI3K com a forte inibição de cMyc no grupo de tratamento NTZ+BCG, o papel de PI3K na regulação de cMyc foi discutido em recentes estudos, mostrando que a inibição de PI3k resulta em amplificação e superexpressão de cMyc. Essa superexpressão pode estar relacionada à resistência de inibição de PI3K (TSAI et al., 2012).

Curiosamente a inibição de cMyc só foi encontrada concomitante com baixa ativação de 4E-BP, mTor e PI3K, cenário evidente somente no grupo de tratamento NTZ+BCG. É possível presumir que é preciso inativação de mTor, PI3K, e 4E-BP para que haja baixa expressão de cMyc e por fim podem estar de alguma forma relacionados com os melhores resultados histológicos deste estudo.

Ainda que NTZ tenha sido descrito na literatura como um eficiente atenuador de cMyc (DI SANTO; EHRISMAN, 2014), um eficiente inibidor de cMyc pode causar estimulação da via mTor via *Feedback Loop* (CHANG et al., 2017), causando resistência da inibição da via mTor. É possível que o tratamento associação seja mais eficiente em atenuar cMyc uma vez que a presença de BCG seja responsável de alguma forma por cancelar o *Feedback Loop* descrito anteriormente (FAN-MINOGUE et al., 2013). Se esta ação sinérgica entre NTZ e BCG foi causada pela inibição do *Feedback Loop* na via mTor, ou se o processo se inicia em mTor para posteriormente causar atenuação de cMyc, os achados presentes não foram suficientes para concluir. Estes e outros mecanismos tem grande potencial de relevância para progredir o cenário do tratamento de CBNMI.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho direciona os horizontes para uma nova possibilidade de sinergismo entre o tratamento padrão ouro para CBNMI e o NTZ. Achados histológicos e imunohistoquímicos (cMyc e Ki67) mostram que a associação é benéfica, reduzindo ocorrência de lesões neoplásicas, reduzindo proliferação celular, inibindo cMyc com maior eficiência. A avaliação de moléculas de mTor, 4E-BP e PI3k, ainda que tenham enriquecido o cenário, não foram suficientes para concluir com exatidão qual o mecanismo responsável por esta melhora. Não foi possível determinar papel de causa e efeito observando a via m-Tor e inativação de cMyc. Novos estudos se fazem necessários para elucidar funcionalidade destas drogas nos sítios de interesse. A atenuação de cMyc tem relação positiva e direta com os achados histopatológicos, e tem grandes chances de ser pontos chaves para o sucesso do tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 72, p. 248-54, 1976.

ALEXANDROFF, A. B. et al. BCG Immunotherapy of Bladder Cancer: 20 Years On. **The Lancet**, v. 353, n. 9165, p. 1689–1694, maio 1999.

BABJUK, M. et al. EAU Guidelines on Non–Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. **European Urology**, v. 71, n. 3, p. 447–461, mar. 2017.

BOEGEMANN, M. et al. Prospects and Progress of Immunotherapy for Bladder Cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, p. 1–15, 23 ago. 2017.

BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 3, p. 964–969, set. 2003a.

BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Immune Mechanisms in Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer. **Journal of Urology**, v. 170, n. 3, p. 964–969, set. 2003b.

CHANG, T.-M. et al. The Regulatory Role of Aberrant Phosphatase and Tensin Homologue and Liver Kinase B1 on AKT/MTOR/c-Myc Axis in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. **Oncotarget**, v. 8, n. 58, 17 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/20956>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

CHRISTOPH, F. et al. Over-expression and amplification of the c-myc gene in human urothelial carcinoma. **International journal of cancer**, v. 84, n. 2, p. 169–173, 1999.

COHEN, S. M. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 6, p. 663–671, 2002.

COLLER, H. A. et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3260–3265, 2000.

CRALLAN, R. A.; GEORGOPOULOS, N. T.; SOUTHGATE, J. Experimental Models of Human Bladder Carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 374–381, 1 mar. 2006.

DANG, C. V. et al. The C-Myc Target Gene Network. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n. 4, p. 253–264, ago. 2006.

DI SANTO, N.; EHRISMAN, J. Research Perspective: Potential Role of Nitazoxanide in Ovarian Cancer Treatment. Old Drug, New Purpose? **Cancers**, v. 5, n. 3, p. 1163–1176, 10 set. 2013.

DI SANTO, N.; EHRISMAN, J. A Functional Perspective of Nitazoxanide as a Potential Anticancer Drug. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 768, p. 16–21, out. 2014.

FAN-MINOQUE, H. et al. A C-Myc Activation Sensor-Based High-Throughput Drug Screening Identifies an Antineoplastic Effect of Nitazoxanide. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 9, p. 1896–1905, 1 set. 2013.

FERRARI, K. L. et al. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Efficiently Reduces P70S6K1 but Not 4E-BP1 Phosphorylation in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. **Journal of Urology**, v. 193, n. 2, p. 682–689, fev. 2015.

GAO, N. et al. Role of PI3K/AKT/MTOR Signaling in the Cell Cycle Progression of Human Prostate Cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 4, p. 1124–1132, out. 2003.

HANSEL, D. E. et al. *HER2* Overexpression and Amplification in Urothelial Carcinoma of the Bladder Is Associated With *MYC* Coamplification in a Subset of Cases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 2, p. 274–281, ago. 2008.

HEMPHILL, A.; MUELLER, J.; ESPOSITO, M. Nitazoxanide, a Broad-Spectrum Thiazolide Anti-Infective Agent for the Treatment of Gastrointestinal Infections. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 7, p. 953–964, maio 2006.

HICKS, R. M.; WAKEFIELD, J. S. J. Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea I. Histology. **Chemico-biological interactions**, v. 5, n. 2, p. 139–152, 1972.

KLUK, M. J. et al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 2, p. 166–179, fev. 2016.

LAM, K. K. Y. et al. Nitazoxanide Stimulates Autophagy and Inhibits MTORC1 Signaling and Intracellular Proliferation of Mycobacterium Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002691, 10 maio 2012.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. MTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, abr. 2012.

LIU, C. et al. In Vivo and in Vitro Efficacies of Mebendazole, Mefloquine and Nitazoxanide against Cyst Echinococcosis. **Parasitology Research**, v. 114, n. 6, p. 2213–2222, jun. 2015.

LIU, P. et al. A Functional MTORC1 Signaling Is Indispensable for C-Myc Driven Hepatocarcinogenesis. **Hepatology**, mar. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.29183>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

MAKHLIN, I. et al. The MTOR Pathway Affects Proliferation and Chemosensitivity of Urothelial Carcinoma Cells and Is Upregulated in a Subset of Human Bladder Cancers: MTOR

PATHWAY AND UROTHELIAL CARCINOMA. **BJU International**, v. 108, n. 2b, p. E84–E90, jul. 2011.

MASSARI, F. et al. Prognostic Value of Beta-Tubulin-3 and c-Myc in Muscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127908, 5 jun. 2015.

MENSSEN, A.; HERMEKING, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6274–6279, 2002.

MONTIRONI, R.; LOPEZ-BELTRAN, A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. **International journal of surgical pathology**, v. 13, n. 2, p. 143–153, 2005.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. **Journal of Urology**, v. 167, n. 2 Part 2, p. 891–894, fev. 2002.

MURPHY, J. R.; FRIEDMANN, J.-C. Pre-clinical toxicology of nitazoxanide—a new antiparasitic compound. **Journal of Applied Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 49–52, 1985.

NAWROTH, R. et al. S6K1 and 4E-BP1 Are Independent Regulated and Control Cellular Growth in Bladder Cancer. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27509, 15 nov. 2011.

ONODERA, T.; HASHIMOTO, Y.; YAGIHASHI, S. C-Myc, c-ErbB-1 and c-ErbB-2 Expressions in Urothelial Carcinoma. **Pathology International**, v. 47, n. 4, p. 209–216, abr. 1997.

OYASU, R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in humans and rodents. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 9, p. 747–755, 1995.

PASSOS, G. R. et al. Intravesical Thalidomide Boosts Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Treatment. **Medical Oncology**, v. 35, n. 1, jan. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12032-017-1067-2>>. Acesso em: 28 jul. 2019.

PERABO, F. G. et al. Superantigen-activated mononuclear cells induce apoptosis in transitional cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 25, n. 5, p. 3565–3573, 2005.

POURDEHNAD, M. et al. Myc and MTOR Converge on a Common Node in Protein Synthesis Control That Confers Synthetic Lethality in Myc-Driven Cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 29, p. 11988–11993, 16 jul. 2013.

REIS, L. O. et al. Experimental Animal Model and RNA Interference: A Promising Association for Bladder Cancer Research. **World Journal of Urology**, v. 27, n. 3, p. 353–361, jun. 2009.

REIS, L. O. et al. Evolution on Experimental Animal Model for Upper Urothelium Carcinogenesis. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 4, p. 499–505, ago. 2010a.

REIS, L. O. et al. Evolution on Experimental Animal Model for Upper Urothelium Carcinogenesis. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 4, p. 499–505, ago. 2010b.

REIS, L. O. et al. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An essential translational tool. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 106–110, 2011.

REIS, L. O. et al. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy for Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, v. 187, n. 2, p. 438–445, fev. 2012.

SAMANT, R. S.; SHEVDE, L. A. Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 3, p. 122–134, 2011.

SCHMITZ-DRÄGER, B. J. et al. C-Myc in Bladder Cancer. Clinical Findings and Analysis of Mechanism. **Urological Research**, v. 25 Suppl 1, p. S45-49, 1997.

SCHULTZ, L. et al. Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder after Cystectomy. **Cancer**, v. 116, n. 23, p. 5517–5526, 1 dez. 2010a.

SCHULTZ, L. et al. Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder after Cystectomy. **Cancer**, v. 116, n. 23, p. 5517–5526, 1 dez. 2010b.

SEAGER, C. M. et al. Intravesical Delivery of Rapamycin Suppresses Tumorigenesis in a Mouse Model of Progressive Bladder Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 12, p. 1008–1014, 1 dez. 2009.

SENKOWSKI, W. et al. Three-Dimensional Cell Culture-Based Screening Identifies the Anthelmintic Drug Nitazoxanide as a Candidate for Treatment of Colorectal Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 6, p. 1504–1516, 1 jun. 2015.

SHE, Q.-B. et al. 4E-BP1 Is a Key Effector of the Oncogenic Activation of the AKT and ERK Signaling Pathways That Integrates Their Function in Tumors. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 39–51, jul. 2010.

SHI, Z. et al. Nitazoxanide inhibits the replication of Japanese encephalitis virus in cultured cells and in a mouse model. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 10, 2014.

SISSON, G. et al. Enzymes Associated with Reductive Activation and Action of Nitazoxanide, Nitrofurans, and Metronidazole in Helicobacter Pylori. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2116–2123, 1 jul. 2002.

STEINBERG, G. D. et al. Characterization of an N-methyl-N-nitrosourea-induced autochthonous rat bladder cancer model. **Cancer research**, v. 50, n. 20, p. 6668–6674, 1990.

STEINBERG, G. D. et al. Characterization of an JY-Methyl-TV-Nitrosourea-Induced Autochthonous Rat Bladder Cancer Model. p. 7, [s.d.]

TARANTINO, G. et al. Oncological Impact of M-Tor Inhibitor Immunosuppressive Therapy after Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Review of the Literature. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 21 out. 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00387/full>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

TSAI, W.-B. et al. Activation of Ras/PI3K/ERK Pathway Induces c-Myc Stabilization to Upregulate Argininosuccinate Synthetase, Leading to Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2622–2633, 15 maio 2012.

TUOMINEN, V. J. et al. ImmunoRatio: A Publicly Available Web Application for Quantitative Image Analysis of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and Ki-67. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, ago. 2010. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2615>>. Acesso em: 28 jul. 2019.

WILLIAMS, P. D.; LEE, J. K.; THEODORESCU, D. Molecular Credentialing of Rodent Bladder Carcinogenesis Models. **Neoplasia**, v. 10, n. 8, p. 838-IN21, ago. 2008.

ZAHARIEVA, B. et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis OfCMYC Amplificationin Urinary Bladder Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 952–956, 20 dez. 2005.

ZEEGERS, M. et al. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk. **Cancer**, v. 89, n. 3, p. 630–639, 2000.

9. ANEXOS

9.1 CERTIFICADO CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação do Tratamento do Câncer de Bexiga Urinária de Ratos Utilizando BCG, Nitazoxanide em associação via oral e intravesical, registrada com o nº 4540-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis, Isis Gallani Avansini Kiehl e Eduardo Riccetto, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 27 de junho de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/08/2017-15/08/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/08/2017-15/08/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Rato isogênico / F344/NTacUnib (Fischer 344)
No. de animais:	50
Peso / Idade:	03 semanas / 50g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 27 de junho de 2017.

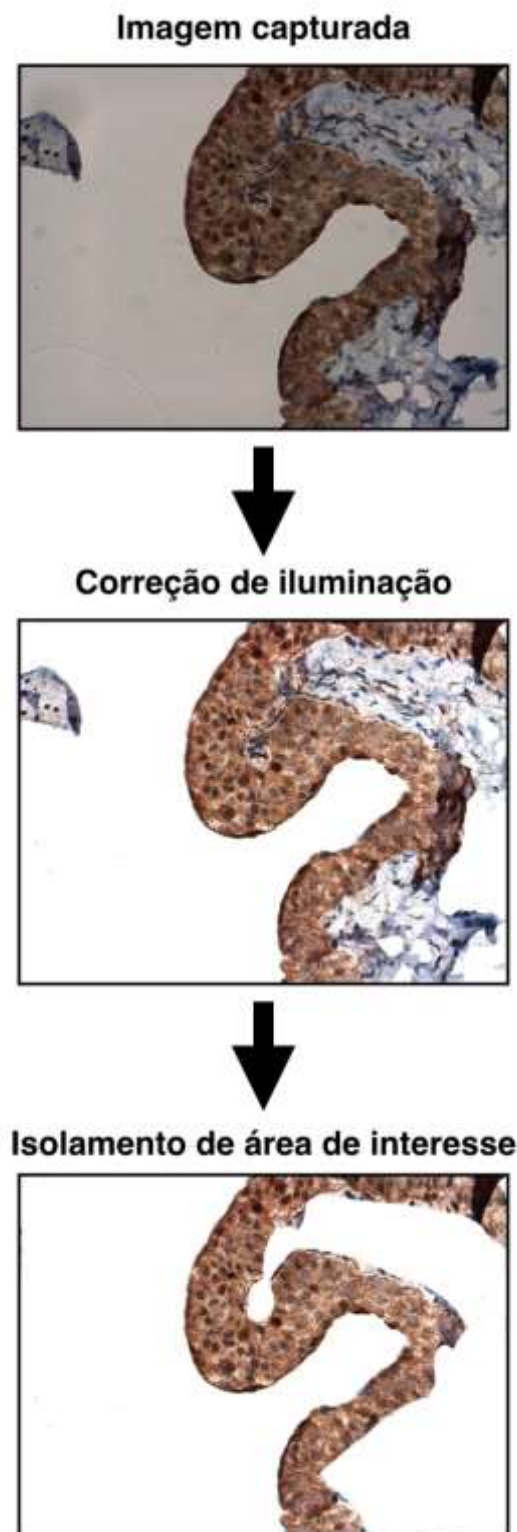
Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

9.2 IMUNOHISTOQUIMICA- Imagens representativas e Análise estatística

Figura 1: Esquema de processamento de imagem e isolamento de porção epitelial da lâmina.



cMyc- Número de imagens por grupo (Somente Carcinoma)

Statistics

Group

N	Valid	130
	Missing	0
Mode		0
Range		2
Minimum		0
Maximum		2

Group

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	BCG	53	40,8	40,8	40,8
	NTZ	47	36,2	36,2	76,9
	BCG + NTZ	30	23,1	23,1	100,0
	Total	130	100,0	100,0	

cMyc-ANOVA Altamente Positivo(Somente Carcinoma)

Descriptives

HighPositive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BCG	53	31,1719	13,67670	1,87864	27,4021	34,9416	3,78	66,62
NTZ	47	40,1937	17,33624	2,52875	35,1036	45,2838	10,07	72,11
BCG + NTZ	30	19,9962	7,93050	1,44790	17,0349	22,9575	3,02	35,40
Total	130	31,8546	15,96688	1,40039	29,0839	34,6253	3,02	72,11

Test of Homogeneity of Variances

HighPositive

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12,434	2	127	,000

ANOVA

HighPositive

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7511,746	2	3755,873	18,797	,000
Within Groups	25375,671	127	199,808		
Total	32887,417	129			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HighPositive

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BCG	NTZ	-9,02182*	2,83217	,005	-15,7384	-2,3053
	BCG + NTZ	11,17566*	3,22959	,002	3,5167	18,8347
NTZ	BCG	9,02182*	2,83217	,005	2,3053	15,7384
	BCG + NTZ	20,19748*	3,30326	,000	12,3638	28,0312
BCG + NTZ	BCG	-11,17566*	3,22959	,002	-18,8347	-3,5167
	NTZ	-20,19748*	3,30326	,000	-28,0312	-12,3638

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

HighPositive

Tukey HSD^{a,b}

Group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
BCG + NTZ	30	19,9962		
BCG	53		31,1719	
NTZ	47			40,1937
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.829.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

cMyc-ANOVA Positivo (Somente Carcinoma)

Descriptives

Positive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BCG	53	40,0172	6,98298	,95919	38,0925	41,9420	22,77	52,09
NTZ	47	37,2075	8,93542	1,30337	34,5840	39,8310	19,34	59,74
BCG + NTZ	30	43,1830	3,40204	,62112	41,9127	44,4534	36,09	49,41
Total	130	39,7320	7,47353	,65547	38,4351	41,0288	19,34	59,74

Test of Homogeneity of Variances

Positive

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10,906	2	127	,000

ANOVA

Positive

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	661,135	2	330,568	6,415	,002
Within Groups	6543,988	127	51,527		
Total	7205,124	129			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Positive

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BCG	NTZ	2,80973	1,43824	,128	-,6011	6,2205
	BCG + NTZ	-3,16579	1,64006	,134	-7,0552	,7236
NTZ	BCG	-2,80973	1,43824	,128	-6,2205	,6011
	BCG + NTZ	-5,97553*	1,67747	,001	-9,9537	-1,9974
BCG + NTZ	BCG	3,16579	1,64006	,134	-,7236	7,0552
	NTZ	5,97553*	1,67747	,001	1,9974	9,9537

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Positive

Tukey HSD^{a,b}

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
NTZ	47	37,2075	
BCG	53	40,0172	40,0172
BCG + NTZ	30		43,1830
Sig.		,184	,118

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.829.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

cMyc-ANOVA Fracamente Positivo(Somente Carcinoma)

Descriptives

LowPositive

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BCG	53	20,9501	7,70413	1,05824	18,8266	23,0736	7,13	45,21
NTZ	47	16,3108	7,83568	1,14295	14,0101	18,6114	4,89	36,85
BCG + NTZ	30	26,2476	5,93747	1,08403	24,0305	28,4647	15,10	36,96
Total	130	20,4953	8,24041	,72273	19,0654	21,9252	4,89	45,21

Test of Homogeneity of Variances

LowPositive

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,315	2	127	,272

ANOVA

LowPositive

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1826,623	2	913,312	16,730	,000
Within Groups	6933,044	127	54,591		
Total	8759,668	129			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LowPositive

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BCG	NTZ	4,63937*	1,48038	,006	1,1286	8,1501
	BCG + NTZ	-5,29748*	1,68811	,006	-9,3008	-1,2941
NTZ	BCG	-4,63937*	1,48038	,006	-8,1501	-1,1286
	BCG + NTZ	-9,93685*	1,72662	,000	-14,0315	-5,8422
BCG + NTZ	BCG	5,29748*	1,68811	,006	1,2941	9,3008
	NTZ	9,93685*	1,72662	,000	5,8422	14,0315

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

LowPositive

Tukey HSD^{a,b}

Group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
NTZ	47	16,3108		
BCG	53		20,9501	
BCG + NTZ	30			26,2476
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.829.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

cMyc-ANOVA Negativo(Somente Carcinoma)

Descriptives

Negative

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BCG	53	7,8608	4,76502	,65453	6,5474	9,1742	2,62	27,87
NTZ	47	6,2881	3,39973	,49590	5,2899	7,2863	1,42	13,51
BCG + NTZ	30	9,6668	2,87802	,52545	8,5921	10,7414	3,34	15,47
Total	130	7,7090	4,09544	,35919	6,9983	8,4196	1,42	27,87

Test of Homogeneity of Variances

Negative

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,304	2	127	,275

ANOVA

Negative

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	211,100	2	105,550	6,865	,001
Within Groups	1952,565	127	15,375		
Total	2163,666	129			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Negative

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BCG	NTZ	1,57274	,78562	,116	-,2904	3,4359
	BCG + NTZ	-1,80594	,89586	,113	-3,9305	,3186
NTZ	BCG	-1,57274	,78562	,116	-3,4359	,2904
	BCG + NTZ	-3,37868*	,91630	,001	-5,5517	-1,2057
BCG + NTZ	BCG	1,80594	,89586	,113	-,3186	3,9305
	NTZ	3,37868*	,91630	,001	1,2057	5,5517

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Negative

Tukey HSD^{a,b}

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
NTZ	47	6,2881	
BCG	53	7,8608	7,8608
BCG + NTZ	30		9,6668
Sig.		,170	,098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.829.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Ki67-ANOVA (Somente Carcinoma)**Descriptives**

PercentMarked

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BCG	50	12,4260	7,93699	1,12246	10,1703	14,6817	,80	32,00
NTZ	40	13,2275	8,47095	1,33937	10,5184	15,9366	1,70	36,40
NTZ + BCG	30	8,8533	7,44301	1,35890	6,0741	11,6326	,80	35,70
Total	120	11,8000	8,12376	,74159	10,3316	13,2684	,80	36,40

Test of Homogeneity of Variances

PercentMarked

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,066	2	117	,348

ANOVA

PercentMarked

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	361,589	2	180,795	2,823	,063
Within Groups	7491,871	117	64,033		
Total	7853,460	119			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: PercentMarked

Tukey HSD

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BCG	NTZ	-,80150	1,69749	,885	-4,8312	3,2282
	NTZ + BCG	3,57267	1,84800	,134	-,8143	7,9597
NTZ	BCG	,80150	1,69749	,885	-3,2282	4,8312
	NTZ + BCG	4,37417	1,93268	,065	-,2139	8,9622
NTZ + BCG	BCG	-3,57267	1,84800	,134	-7,9597	,8143
	NTZ	-4,37417	1,93268	,065	-8,9622	,2139

Homogeneous Subsets**PercentMarked**Tukey HSD^{a,b}

Group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
NTZ + BCG	30	8,8533	
BCG	50	12,4260	12,4260
NTZ	40		13,2275
Sig.		,128	,900

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 38.298.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

9.3 WESTERN BLOTTING- mTOR- Fotos e Análise estatística

Tabelas de análise estatística para Western Blotting- mTOR;

Table Analyzed	MTOR
One-way analysis of variance	
P value	0,0473
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
F	3,541
R square	0,2522

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	14,9
P value	0,0006
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	28,32	2	14,16
Residual (within columns)	83,98	21	3,999
Total	112,3	23	

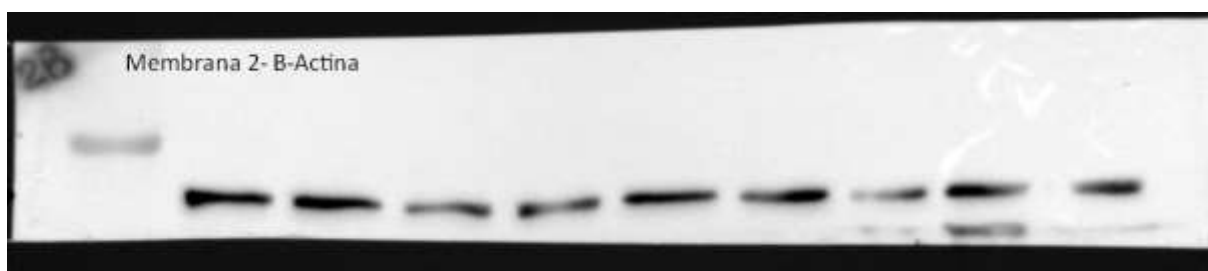
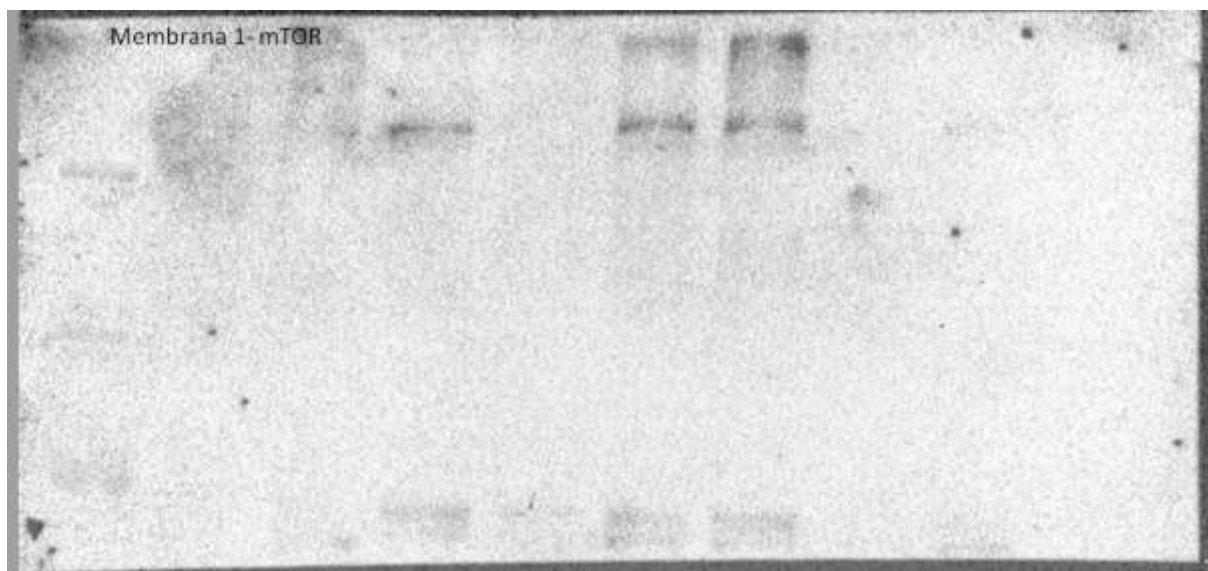
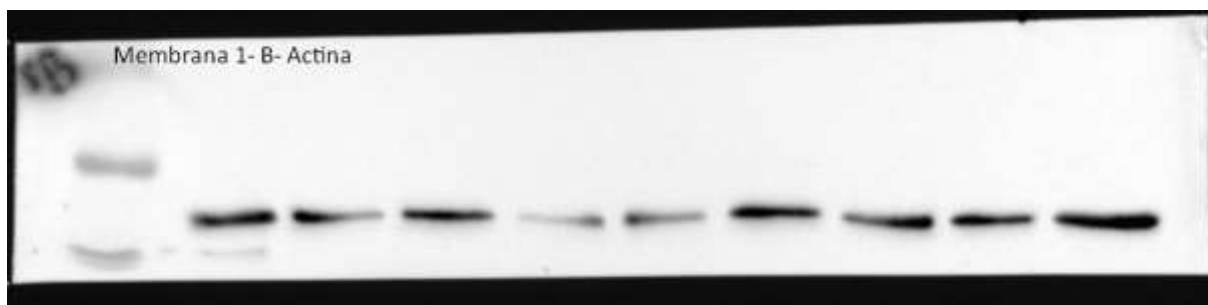
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
BCG vs NTZ	-2,412	2,483	No	ns	-4,940 to 0,1153
BCG vs NTZ+BCG	-0,2745	0,2724	No	ns	-2,896 to 2,347
NTZ vs NTZ+BCG	2,138	2,066	No	ns	-0,5544 to 4,830

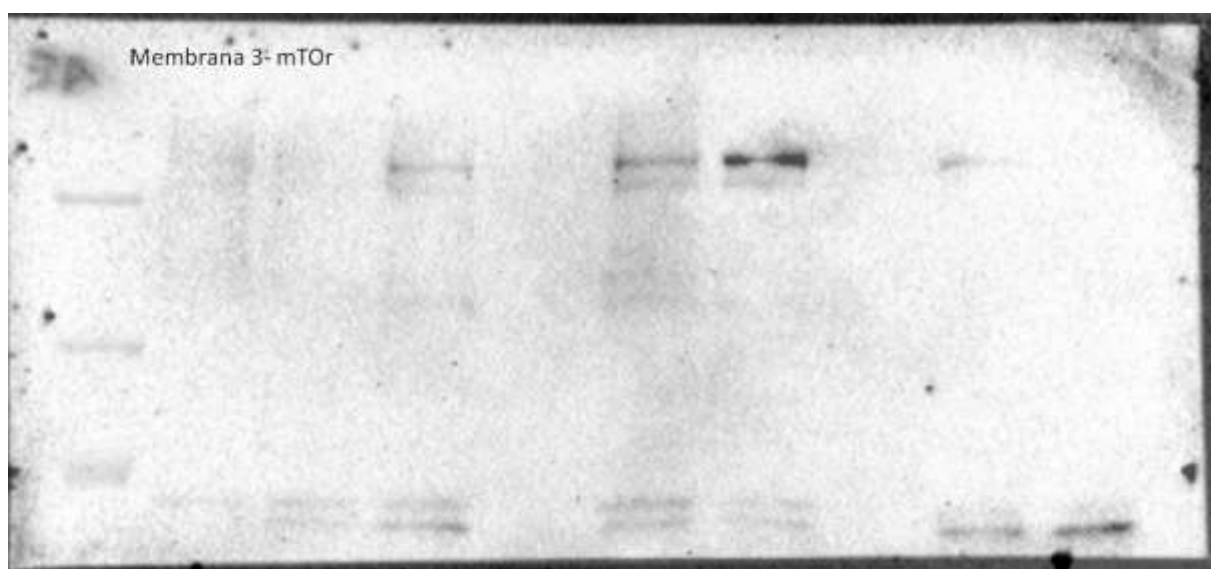
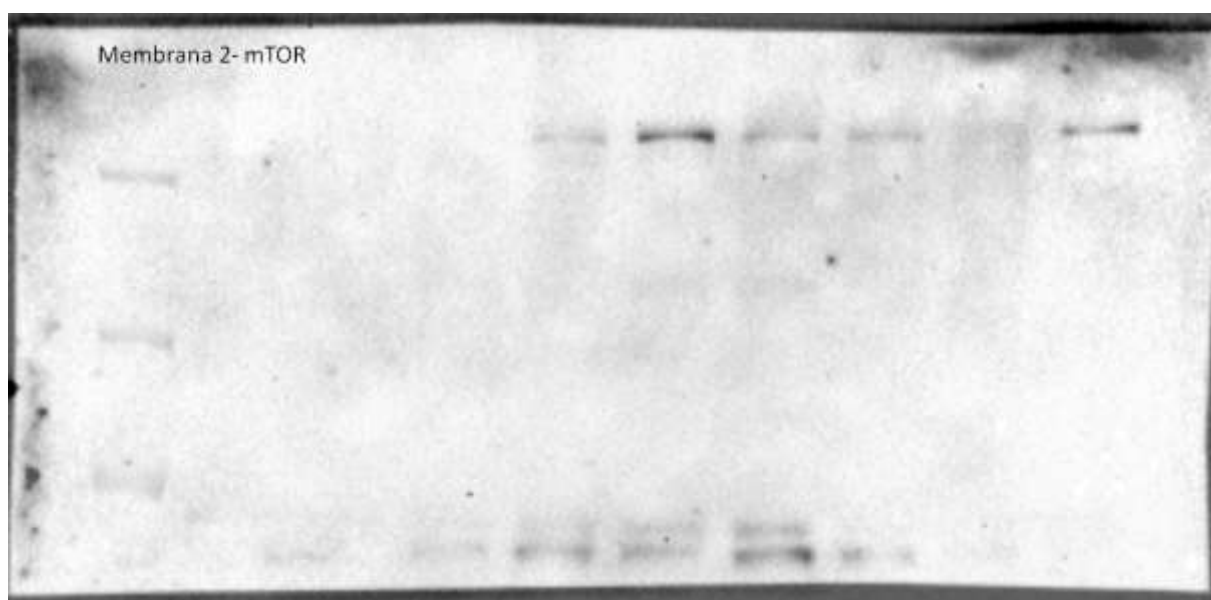
Number of values	9	8	7
Minimum	0,1989	0,4646	0,07684
25% Percentile	0,4987	1,302	0,1221
Median	0,9319	2,732	0,22
75% Percentile	1,539	4,623	3,481
Maximum	1,869	9,947	4,136
Mean	1	3,412	1,275
Std. Deviation	0,5747	2,997	1,754
Std. Error	0,1916	1,06	0,6629
Lower 95% CI	0,5583	0,9068	-0,3476
Upper 95% CI	1,442	5,918	2,897

Organização das membranas e arranjo das amostras- mTOR;

mTor (Gel 6,5%)									
Membrana 1	033I	032I	031I	055I	054I	053I	081I	072I	071I
mTor 07-231 Upstate Rabbit 289 Kda									
Membrana 2	041I	035I	034I	062I	061I	056I	092I	091I	082I*
Membrana 3	044I	043I	042I		064I	063I		102I	101I

Membranas de Western Blotting –mTOR;





9.4. WESTERN BLOTTING- PI3K- Fotos e Análise estatística

Tabelas de análise estatística para Western Blotting – PI3K;

Table Analyzed	PI3K
One-way analysis of variance	
P value	0,0349
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
F	3,985
R square	0,2849

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	20,94
P value	< 0,0001
P value summary	***
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	12,25	2	6,125
Residual (within columns)	30,74	20	1,537
Total	42,99	22	

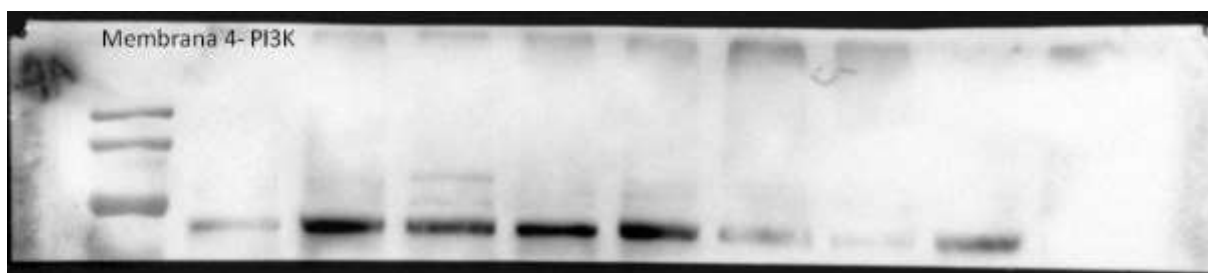
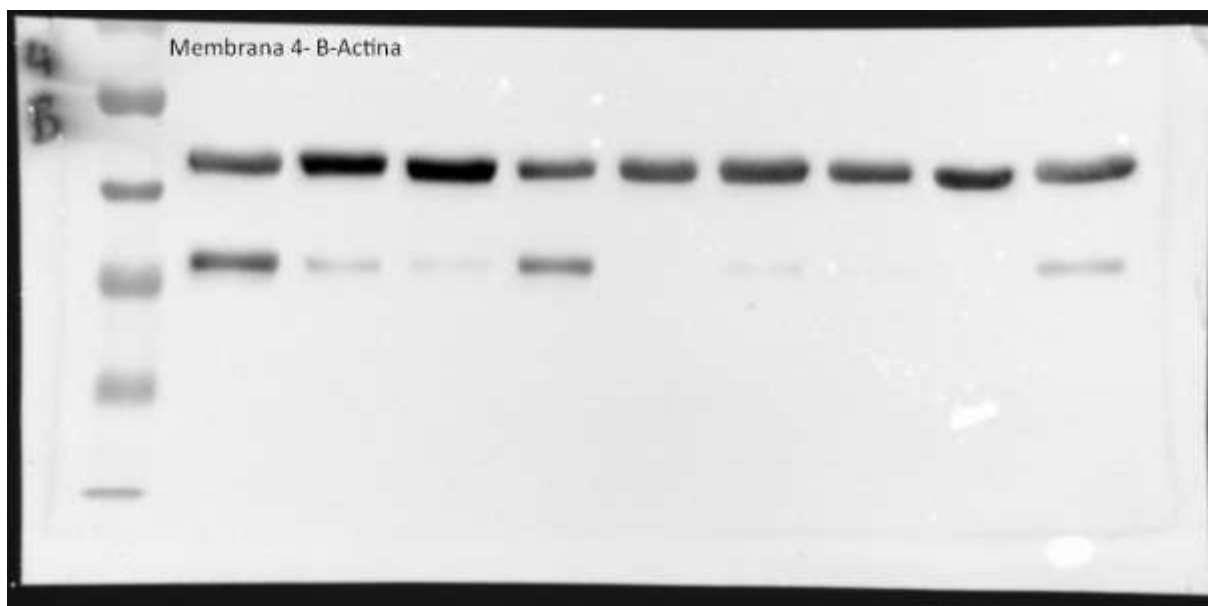
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
BCG vs NTZ	-1,436	2,383	No	ns	-3,010 to 0,1383
BCG vs NTZ+BCG	0,2154	0,3297	No	ns	-1,492 to 1,923
NTZ vs NTZ+BCG	1,651	2,466	No	ns	-0,09821 to 3,400

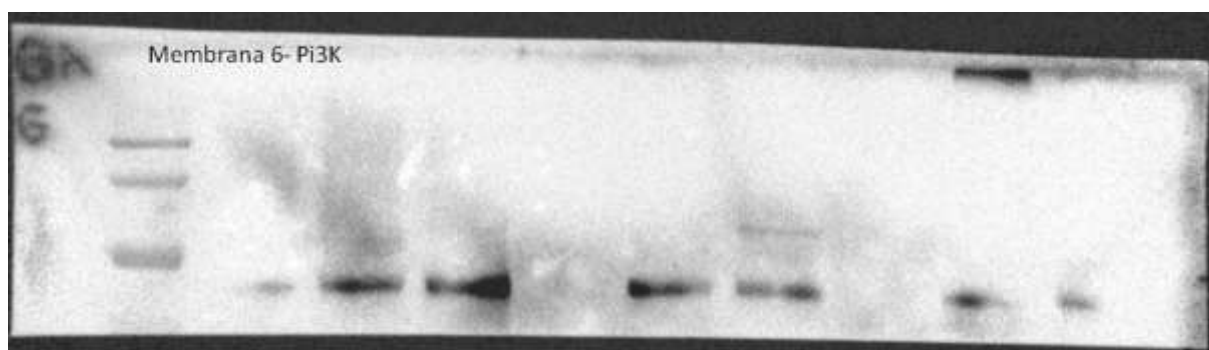
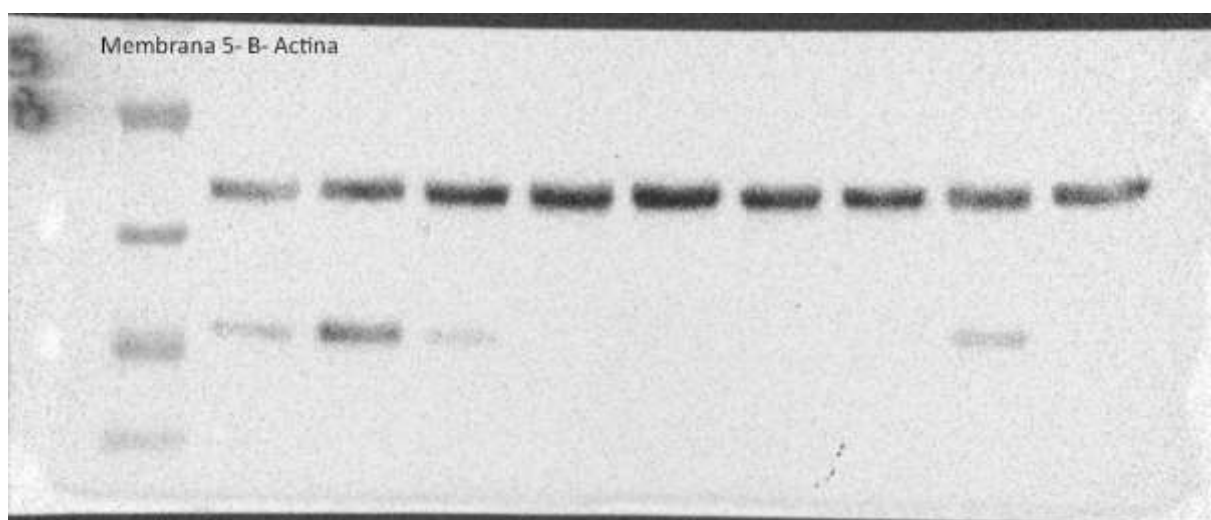
Number of values	9	8	6
Minimum	0,3418	0,3747	0,172
25% Percentile	0,6503	1,006	0,59
Median	0,9996	1,64	0,7797
75% Percentile	1,329	3,921	1,069
Maximum	1,699	6,352	1,233
Mean	1	2,436	0,7846
Std. Deviation	0,4349	2,021	0,3559
Std. Error	0,145	0,7146	0,1453
Lower 95% CI	0,6657	0,7459	0,4111
Upper 95% CI	1,334	4,125	1,158

Organização das membranas e arranjo das amostras- PI3K;

	pi3k (Gel 10%)								
Membrana 4	071I	072I	081I	053I	054I	055I	031I	032I	033I
	pi3k 06-195U Upstate Rabbit 85Kda								
Membrana 5	082I*	091I	092I	056I	061I	062I	034I	035I	041I
Membrana 6	101I	102I	NA	063I	064I	NA	042I	043I	044I

Membranas de Western Blotting – PI3K;





9.5. WESTERN BLOTTING - p-4E-BP- Fotos e Análise estatística

Tabelas de análise estatística para Western Blotting –p-4E-BP;

Table Analyzed	p-4EBP
One-way analysis of variance	
P value	0,0004
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
F	15,02
R square	0,6979

Bartlett's test for equal variances	
Bartlett's statistic (corrected)	5,633
P value	0,0598
P value summary	ns
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0,7959	2	0,3979
Residual (within columns)	0,3445	13	0,0265
Total	1,14	15	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
BCG vs NTZ	0,4352	4,415	Yes	**	0,1646 to 0,7059
BCG vs NTZ+BCG	0,4829	4,899	Yes	***	0,2122 to 0,7535
NTZ vs NTZ+BCG	0,04766	0,4629	No	ns	-0,2350 to 0,3304

Number of values	6	5	5
Minimum	0,7661	0,5083	0,2649
25% Percentile	0,8128	0,5143	0,4015
Median	0,9271	0,5702	0,5735
75% Percentile	1,263	0,6125	0,6046
Maximum	1,301	0,6528	0,6245
Mean	1	0,5648	0,5171
Std. Deviation	0,2228	0,05702	0,1443
Std. Error	0,09095	0,0255	0,06454
Lower 95% CI	0,7662	0,494	0,3379
Upper 95% CI	1,234	0,6356	0,6963

Organização das membranas e arranjo das amostras- p-4E-BP1;

4E-BP1 e p-4E-BP1 (t70) (Gel 15%)									
Membrana 7	071I	072I	081I	053I	054I	055I	031I	032I	033I
	9455/ 9452 Cell Rabbit <20kda e 70kda								
Membrana 9	101I	102I	NA	063I	064I	NA	042I	043I	044I

Membranas de Western Blotting –p-4E-BP1;

